(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-515573
(P2023-515573A)
(43)公表日　令和5年4月13日(2023.4.13)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/13 (2006.01)*	C12N	15/13	ZNA	4B063
C12N	*15/62 (2006.01)*	C12N	15/62	Z	4B064
C12N	*15/63 (2006.01)*	C12N	15/63	Z	4B065
C07K	*16/00 (2006.01)*	C07K	16/00		4C076
C07K	*16/28 (2006.01)*	C07K	16/28		4C085

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全152頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-551284(P2022-551284)
(86)(22)出願日　令和3年2月24日(2021.2.24)
(85)翻訳文提出日　令和4年10月24日(2022.10.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/019331
(87)国際公開番号　WO2021/173612
(87)国際公開日　令和3年9月2日(2021.9.2)
(31)優先権主張番号　62/981,782
(32)優先日　令和2年2月26日(2020.2.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　517284522
ソレント・セラピューティクス・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９２１２１、サン・ディエゴ、ディレクターズ・プレイス・４９５５
(74)代理人　100107489
弁理士　大塩 竹志
(72)発明者　ジャン， ヤンリャン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１２１， サンディエゴ， ディレクターズ プレイス ４９５５， ソレント セラピューティクス， インコーポレイテッド
気付
(72)発明者　カウフマン， ガナー エフ．
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　普遍的な遮蔽性部分を有する活性化可能な抗原結合性タンパク質

(57)【要約】
本開示は、普遍的な遮蔽性部分にペプチドリンカーによって付着した抗原結合性タンパク質を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。普遍的な遮蔽性部分は、互いと二量体化して、抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を遮断する二量体化した遮蔽性複合体を形成する。個々の遮蔽性部分および二量体化した遮蔽性複合体は、抗原結合性ドメインには特異的に結合しない。遮蔽性部分は、それらの互いとの会合が、天然に存在する免疫グロブリンまたは細胞受容体分子において見いだされるホモ二量体またはヘテロ二量体を模倣するものであるので、安定な二量体を形成する。遮蔽性部分の二量体化には共有結合が伴わず、ノブインホールなどの構造相補性を通じた鎖間の会合を工学的に作製することによって最適化することができる。

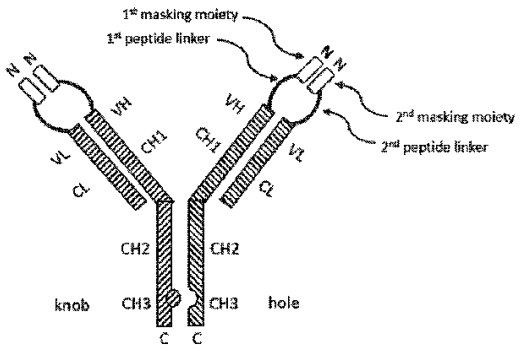


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＩｇＧ型抗体構造を有する活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、
ａ）第１の重鎖可変領域および第１の軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合性ドメイン、ならびに
ｂ）第２の重鎖可変領域および第２の軽鎖可変領域を含む第２の抗原結合性ドメイン
を含み、
（ｉ）前記第１の重鎖可変領域のＮ末端が、第１の遮蔽性部分と、第１の切断可能部位を有する第１のペプチドリンカーを介して接合しており、
（ｉｉ）前記第１の軽鎖可変領域のＮ末端が、第２の遮蔽性部分と、第２の切断可能部位を有する第２のペプチドリンカーを介して接合しており、
（ｉｉｉ）前記第１および第２の遮蔽性部分が、前記第１の抗原結合性ドメインには特異的に結合せず、
（ｉｖ）前記第１の切断可能部位が、第１のプロテアーゼで切断可能であり、
（ｖ）前記第２の切断可能部位が、第２のプロテアーゼで切断可能であり、
（ｖｉ）前記第２の重鎖可変領域のＮ末端が、第３の遮蔽性部分と、第３の切断可能部位を有する第３のペプチドリンカーを介して接合しており、
（ｖｉｉ）前記第２の軽鎖可変領域のＮ末端が、第４の遮蔽性部分と、第４の切断可能部位を有する第４のペプチドリンカーを介して接合しており、
（ｖｉｉｉ）前記第３および第４の遮蔽性部分が、前記第２の抗原結合性ドメインには特異的に結合せず、
（ｉｘ）前記第３の切断可能部位が、第３のプロテアーゼで切断可能であり、
（ｘ）前記第４の切断可能部位が、第４のプロテアーゼで切断可能であり、
前記第１、第２、第３および第４の切断可能部位が、同じプロテアーゼまたは異なるプロテアーゼで切断可能である、
活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項２】
標的抗原に結合し得る（例えば、単一特異性抗体である）、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項３】
２種の異なる標的抗原に結合し得る（例えば、二重特異性抗体である）、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項４】
前記第１および第２の遮蔽性部分が、前記第１の抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を低減するように互いに会合している、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項５】
前記第１および第２の遮蔽性部分が、前記第１の抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を低減するように、共有結合を形成せずに互いに会合している、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項６】
前記第１の遮蔽性部分のアミノ酸配列が、ノブまたはホールを形成するように変異している、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項７】
前記第２の遮蔽性部分のアミノ酸配列が、ホールまたはノブを形成するように変異している、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項８】
前記第１および／または第２の遮蔽性部分が、ＣＬ（ラムダ）、ＣＬ（カッパ）、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３からなる群から選択される免疫グロブリン定常領域に由来する、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。

【請求項９】
前記第１および第２の遮蔽性部分が、Ｔ細胞受容体アルファ（α）およびベータ（β）定常領域に由来する、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項１０】
前記第１および第２の遮蔽性部分が、ホモ二量体またはヘテロ二量体として互いに会合している、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項１１】
前記第１および第２の切断可能部位が、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項１２】
前記第３および第４の遮蔽性部分が、前記第２の抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を低減するように互いに会合している、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項１３】
前記第３および第４の遮蔽性部分が、前記第２の抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を低減するように、共有結合を形成せずに互いに会合している、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項１４】
前記第３の遮蔽性部分のアミノ酸配列が、ノブまたはホールを形成するように変異している、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項１５】
前記第４の遮蔽性部分のアミノ酸配列が、ホールまたはノブを形成するように変異している、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項１６】
前記第３および／または第４の遮蔽性部分が、ＣＬ（ラムダ）、ＣＬ（カッパ）、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３からなる群から選択される免疫グロブリン定常領域に由来する、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項１７】
前記第３および第４の遮蔽性部分が、Ｔ細胞受容体アルファ（α）およびベータ（β）定常領域に由来する、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項１８】
前記第３および第４の遮蔽性部分が、ホモ二量体またはヘテロ二量体として互いに会合している、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項１９】
前記第３および第４の切断可能部位が、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項２０】
前記第１、第２、第３および第４の切断可能部位が、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項２１】
不活性の状態の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を含み、前記第１、第２、第３および第４の切断可能部位が、インタクトな状態（切断されていない）であり、前記不活性の状態の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質が、切断された状態の前記第１、第２、第３および／または第４の切断可能部位のうちの任意の１つ、または２つもしくはそれよりも多くの任意の組合せを有する活性化された状態の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質と比較して低下したレベルで、その標的抗原に結合する、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項２２】
ＥＧＦＲ抗原に結合し得る、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。

【請求項２３】
ＣＤ３８抗原に結合し得る、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項２４】
前記第１および／または第２の重鎖可変領域が、配列番号２または４の一部または全長に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＥＧＦＲ重鎖可変領域を含む、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項２５】
前記第１および／または第２の重鎖可変領域が、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０の一部または全長に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＣＤ３８重鎖可変領域を含む、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項２６】
前記第１および／または第２の軽鎖可変領域が、配列番号３または５の一部または全長に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＥＧＦＲ軽鎖可変領域を含む、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項２７】
前記第１および／または第２の軽鎖可変領域が、配列番号８、１０、１２または１９の一部または全長に対して少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＣＤ３８軽鎖可変領域を含む、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項２８】
前記第１および／または第３の遮蔽性部分が、配列番号２１～３１のアミノ酸配列のいずれか１つを含む、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項２９】
前記第２および／または第４の遮蔽性部分が、配列番号２１～３１のアミノ酸配列のいずれか１つを含む、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項３０】
前記第１および／または第３のペプチドリンカーが、配列番号３２～４０のアミノ酸配列のいずれか１つを含む、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項３１】
前記第２および／または第４のペプチドリンカーが、配列番号３２～４０のアミノ酸配列のいずれか１つを含む、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項３２】
毒素と接合した化学的リンカーをさらに含む、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項３３】
請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。
【請求項３４】
検出可能部分と接合した請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質、または検出可能部分と接合していない請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を含む、プロテアーゼの存在を検出することができる診断剤であって、前記検出可能部分が、放射性部分、比色定量部分、抗原性部分、酵素部分、ビオチン部分、ストレプトアビジン部分またはプロテインＡ部分を含む、診断剤。
【請求項３５】
請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を含む、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよび／またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける使用のためのキット。

【請求項３６】
請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の第１のポリペプチドをコードする第１の核酸であって、前記第１のポリペプチドが、前記第１のペプチドリンカーと接合した前記第１の重鎖可変領域および前記第１の遮蔽性部分を含み、前記第１のペプチドリンカーが、前記第１の切断可能部位を含む、第１の核酸。
【請求項３７】
請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の第２のポリペプチドをコードする第２の核酸であって、前記第２のポリペプチドが、前記第２のペプチドリンカーと接合した前記第１の軽鎖可変領域および前記第２の遮蔽性部分を含み、前記第２のペプチドリンカーが、前記第２の切断可能部位を含む、第２の核酸。
【請求項３８】
請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の第３のポリペプチドをコードする第３の核酸であって、前記第３のポリペプチドが、前記第３のペプチドリンカーと接合した前記第２の重鎖可変領域および前記第３の遮蔽性部分を含み、前記第３のペプチドリンカーが、前記第３の切断可能部位を含む、第３の核酸。
【請求項３９】
請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の第４のポリペプチドをコードする第４の核酸であって、前記第４のポリペプチドが、前記第４のペプチドリンカーと接合した前記第２の軽鎖可変領域および前記第４の遮蔽性部分を含み、前記第４のペプチドリンカーが、前記第３の切断可能部位を含む、第４の核酸。
【請求項４０】
請求項３６から３９までのいずれか一項に記載の第１、第２、第３または第４の核酸を含む発現ベクター。
【請求項４１】
請求項３６から３９までのいずれかに記載の第１、第２、第３および／または第４の核酸のうちの任意の１つ、または２つもしくはそれよりも多くの任意の組合せを含む、発現ベクター。
【請求項４２】
請求項４０に記載の発現ベクターを有する宿主細胞または宿主細胞の集団。
【請求項４３】
請求項４１に記載の発現ベクターのうちの任意の１つ、または２つもしくはそれよりも多くの任意の組合せを有する宿主細胞または宿主細胞の集団。
【請求項４４】
ポリペプチドを調製するための方法であって、請求項４２に記載の宿主細胞の集団を、前記宿主細胞の集団による前記第１、第２、第３または第４のポリペプチドの発現に適した条件下で培養するステップを含み、前記宿主細胞の集団内の個々の宿主細胞が、前記活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の前記第１、第２、第３または第４のポリペプチドをコードする核酸に作動可能に連結した発現ベクターを有する、方法。
【請求項４５】
発現された第１、第２、第３または第４のポリペプチドを前記宿主細胞の集団から単離するステップをさらに含む、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記発現された第１、第２、第３または第４のポリペプチドを回収するステップをさらに含む、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
少なくとも１つのポリペプチドを調製するための方法であって、請求項４３に記載の宿主細胞の集団を、前記宿主細胞の集団による前記第１、第２、第３および／または第４のポリペプチドのうちの任意の１つ、または２つもしくはそれよりも多くの任意の組合せの発現に適した条件下で培養するステップを含み、前記宿主細胞の集団内の個々の宿主細胞が、前記活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の前記第１、第２、第３および／

または第４のポリペプチドのうちの任意の１つ、または２つもしくはそれよりも多くの任意の組合せをコードする核酸にそれぞれが作動可能に連結した１つまたは複数の発現ベクターを有する、方法。

【請求項４８】

前記第１、第２、第３および／または第４のポリペプチドを前記宿主細胞の集団から単離するステップをさらに含む、請求項４７に記載の方法。

【請求項４９】

培養条件が、第１の二量体化した遮蔽性複合体が形成されるように、および第１の抗原結合性ドメインが形成されるように、前記第１および第２のポリペプチドが互いに会合するのに適した条件、ならびに／または第２の二量体化した遮蔽性複合体が形成されるように、および第２の抗原結合性ドメインが形成されるように、前記第３および第４のポリペプチドが互いに会合するのに適した条件である、請求項４７に記載の方法。

【請求項５０】

会合した第１および第２のポリペプチドを回収するステップ、または会合した第３および第４のポリペプチドを回収するステップ、または前記第１、第２、第３および第４のポリペプチドを回収するステップをさらに含む、請求項４８に記載の方法。

【請求項５１】

請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の少なくとも１つのペプチドリンカーを切断するための方法であって、

ａ）少なくとも１種のプロテアーゼを不活性形態の前記活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質と接触させるステップであって、前記第１、第２、第３および第４のペプチドリンカーが切断されていない状態である、ステップと、

ｂ）前記ペプチドリンカーのうちの少なくとも１つを切断して、前記活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を活性化された形態に変換するステップと

を含む方法。

【請求項５２】

今や活性化された状態である前記活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を標的抗原に結合させるステップをさらに含む、請求項５１に記載の方法。

【請求項５３】

対象由来の腫瘍によって産生されたプロテアーゼの存在を検出するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法であって、

ａ）（ｉ）前記対象から得られた腫瘍を（ｉｉ）切断されていない状態の請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質と接触させるステップであって、腫瘍試料により、前記第１、第２、第３および／または第４のペプチドリンカーのうちの少なくとも１つを切断するプロテアーゼが産生される、ステップと、

ｂ）前記第１、第２、第３および／または第４のペプチドリンカーの切断による切断産物を検出するステップと、

ｃ）前記第１、第２、第３および／または第４の切断産物を検出し、前記切断産物と前記第１、第２、第３および／または第４のペプチドリンカーのアミノ酸配列の相互関係を明らかにすることにより、前記対象由来の前記腫瘍によって産生されるプロテアーゼの型を同定するステップと

を含む方法。

【請求項５４】

腫瘍関連抗原の発現または過剰発現に関連する疾患を有する対象を処置する方法であって、前記対象に、請求項１に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を含む治療用組成物を有効量で投与するステップを含み、前記第１、第２、第３および第４のペプチドリンカーが切断されていない状態である、方法。

【請求項５５】

前記疾患が、血液のがん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、頭頸部がん、肺がん、膀胱がん、黒色腫、結腸直腸がん、膵がん、肺がん、肝がん、腎がん、食道がん、平滑筋腫、

平滑筋肉腫、神経膠腫、および神経膠芽腫からなる群から選択される、請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記血液のがんが、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、バーキットリンパ腫（ＢＬ）、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病（Ｂ－ＣＬＬ）、Ｂ細胞およびＴ細胞急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、Ｔ細胞リンパ腫（ＴＣＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、ホジキンリンパ腫（ＨＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）および多発性骨髄腫（ＭＭ）からなる群から選択される、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
第１および第２のポリペプチド鎖を含む二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構造を有する活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、
ａ）第１のポリペプチド鎖が、（ｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、（ｉｖ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）、（ｖ）必要に応じたヒンジ領域、（ｖｉ）膜貫通領域（ＴＭ）、および（ｖｉｉ）細胞内シグナル伝達領域を含み、
ｂ）第２のポリペプチド鎖が、（ｉ）第２の遮蔽性部分、（ｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、および（ｉｖ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含み、
前記抗体重鎖可変領域（ＶＨ）と前記抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）が、標的抗原に結合する抗原結合性ドメインを形成する、
活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項５８】
前記第１および第２の遮蔽性部分が、前記抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を低減するように互いに会合している、請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項５９】
前記第１および第２の遮蔽性部分が、前記抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を低減するように、共有結合を形成せずに互いに会合している、請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項６０】
前記第１の遮蔽性部分のアミノ酸配列が、ノブまたはホールを形成するように変異している、請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項６１】
前記第２の遮蔽性部分のアミノ酸配列が、ホールまたはノブを形成するように変異している、請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項６２】
前記第１および／または第２の遮蔽性部分が、ＣＬ（ラムダ）、ＣＬ（カッパ）、ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３からなる群から選択される免疫グロブリン定常領域に由来する、請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項６３】
前記第１および第２の遮蔽性部分が、ホモ二量体またはヘテロ二量体として互いに会合している、請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項６４】
前記第１および第２の遮蔽性部分が、Ｔ細胞受容体アルファ（α）およびベータ（β）定常領域に由来する、請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項６５】
前記第１および第２の切断可能部位が、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である、請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項６６】

ＥＧＦＲ抗原に結合し得る、請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項６７】
ＣＤ３８抗原に結合し得る、請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項６８】
毒素と接合した化学的リンカーをさらに含む、請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質。
【請求項６９】
請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。
【請求項７０】
検出可能部分と接合した請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質、または検出可能部分と接合していない請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を含む、プロテアーゼの存在を検出することができる診断剤であって、前記検出可能部分が、放射性部分、比色定量部分、抗原性部分、酵素部分、ビオチン部分、ストレプトアビジン部分またはプロテインＡ部分を含む、診断剤。
【請求項７１】
請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を含む、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよび／またはｉｎ　ｖｉｖｏにおける使用のためのキット。
【請求項７２】
請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の第１のポリペプチド鎖をコードする第１の核酸。
【請求項７３】
請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の第２のポリペプチドをコードする第２の核酸。
【請求項７４】
請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の第１のポリペプチド鎖をコードする第１の核酸および請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の第２のポリペプチドをコードする第２の核酸。
【請求項７５】
請求項７２に記載の第１の核酸を含む発現ベクター。
【請求項７６】
請求項７３に記載の第２の核酸を含む発現ベクター。
【請求項７７】
請求項７４に記載の第１および第２の核酸を含む発現ベクター。
【請求項７８】
請求項７５に記載の発現ベクターを有する宿主細胞または宿主細胞の集団。
【請求項７９】
請求項７６に記載の発現ベクターを有する宿主細胞または宿主細胞の集団。
【請求項８０】
個々の宿主細胞が請求項７５および７６に記載の発現ベクターを有する、宿主細胞または宿主細胞の集団。
【請求項８１】
個々の宿主細胞が請求項７７に記載の発現ベクターを有する、宿主細胞または宿主細胞の集団。
【請求項８２】
請求項８０に記載の宿主細胞の集団を、前記宿主細胞の集団による前記第１または第２のポリペプチド鎖の発現に適した条件下で培養するステップを含む、ポリペプチドを調製するための方法。

【請求項８３】
発現された第１または第２のポリペプチド鎖を前記宿主細胞の集団から単離するステップをさらに含む、請求項８２に記載の方法。
【請求項８４】
前記発現された第１または第２のポリペプチド鎖を回収するステップをさらに含む、請求項８３に記載の方法。
【請求項８５】
請求項８１に記載の宿主細胞の集団を、前記宿主細胞の集団による前記第１および第２のポリペプチド鎖の発現に適した条件下で培養するステップを含む、ポリペプチドを調製するための方法。
【請求項８６】
発現された第１および第２のポリペプチド鎖を前記宿主細胞の集団から単離するステップをさらに含む、請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】
前記発現された第１および第２のポリペプチド鎖を回収するステップをさらに含む、請求項８６に記載の方法。
【請求項８８】
培養条件が、二量体化した遮蔽性複合体が形成されるように、および抗原結合性ドメインが形成されるように、前記第１および第２のポリペプチド鎖が互いに会合するのに適した条件である、請求項８５に記載の方法。
【請求項８９】
会合した第１および第２のポリペプチド鎖を回収するステップをさらに含む、請求項８７に記載の方法。
【請求項９０】
請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の少なくとも１つのペプチドリンカーを切断するための方法であって、
ａ）少なくとも１種のプロテアーゼを不活性形態の前記活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質と接触させるステップであって、前記第１および第２のペプチドリンカーが切断されていない状態である、ステップと、
ｂ）前記ペプチドリンカーのうちの少なくとも１つを切断して、前記活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を活性化された形態に変換するステップと
を含む方法。
【請求項９１】
今や活性化された状態である前記活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を標的抗原に結合させるステップをさらに含む、請求項９０に記載の方法。
【請求項９２】
対象由来の腫瘍によって産生されたプロテアーゼの存在を検出するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法であって、
ａ）（ｉ）前記対象から得られた腫瘍を、（ｉｉ）請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質と接触させるステップであって、腫瘍試料により、前記第１および／または第２のペプチドリンカーのうちの少なくとも１つを切断するプロテアーゼが産生される、ステップと、
ｂ）前記第１および／または第２のペプチドリンカーの切断による切断産物を検出するステップと、
ｃ）前記第１および／または第２の切断産物を検出し、前記切断産物と前記第１および／または第２のペプチドリンカーのアミノ酸配列の相互関係を明らかにすることにより、前記対象由来の前記腫瘍によって産生されるプロテアーゼの型を同定するステップと
を含む方法。
【請求項９３】
腫瘍関連抗原の発現または過剰発現に関連する疾患を有する対象を処置する方法であっ

て、前記対象に、請求項５７に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を含む治療用組成物を有効量で投与するステップを含み、前記第１および第２のペプチドリンカーが切断されていない状態である、方法。
【請求項９４】
前記疾患が、血液のがん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、頭頸部がん、肺がん、膀胱がん、黒色腫、結腸直腸がん、膵がん、肺がん、肝がん、腎がん、食道がん、平滑筋腫、平滑筋肉腫、神経膠腫、および神経膠芽腫からなる群から選択される、請求項９３に記載の方法。
【請求項９５】
前記血液のがんが、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、バーキットリンパ腫（ＢＬ）、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病（Ｂ－ＣＬＬ）、Ｂ細胞およびＴ細胞急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、Ｔ細胞リンパ腫（ＴＣＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、ホジキンリンパ腫（ＨＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）および多発性骨髄腫（ＭＭ）からなる群から選択される、請求項９４に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願との相互参照
本出願は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、２０２０年２月２６日出願の米国仮出願第６２／９８１，７８２号の優先権を主張するものである。
【０００２】
本出願全体を通して、種々の刊行物、特許、および／または特許出願が参照される。刊行物、特許および／または特許出願の開示は、本開示が関係する最先端技術をより詳細に記載するために、これによりそれらの全体が参照により本出願に組み込まれる。
【０００３】
技術分野
本開示は、免疫グロブリン様抗原結合活性を有する活性化可能な抗原結合性タンパク質であって、普遍的な遮蔽性部分を含み、普遍的な遮蔽性部分が、抗原結合性ドメインを遮断することから解除されるまで、抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を遮断する、活性化可能な抗原結合性タンパク質を提供する。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００４】
緒言および概要
抗体は、種々のがんに対する治療用試薬として首尾よく使用されている。抗体は、対象に投与された場合、健康な組織および患部組織のどちらにも結合し、それにより、有害な副作用が導かれる。オフターゲットの効果を克服するために、抗体は、ペプチドリンカーに付着した遮蔽性部分を含むように工学的に操作されている。遮蔽性部分は、抗体と標的抗原の結合を妨げ、ここで、遮蔽性部分は、抗原結合性ドメインに直接結合するか、または、抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を立体的に妨害する。ペプチドリンカーは、患部組織によって分泌されるプロテアーゼによって切断されるように設計され、それにより、疾患部位において抗原結合性ドメインの遮蔽が外され、オフターゲット活性が低下する。
【０００５】
他の遮蔽された抗体様分子（時には「プロボディ」と称される）を超える多くの利点をもたらす、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質が本明細書に記載される。本明細書に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、普遍的な遮蔽性部分にペプチドリンカーによって付着した抗原結合性タンパク質を含む。普遍的な遮蔽性部分は、互いと二量体化して、抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を遮断する二量体化した遮蔽性複合体を形成する。個々の遮蔽性部分および二量体化した遮蔽性複合体は、抗原結

合性ドメインには特異的に結合しない。遮蔽性部分は、それらの互いとの会合が、天然に存在する免疫グロブリンまたは細胞受容体分子において見いだされるホモ二量体またはヘテロ二量体を模倣するものであるので、安定な二量体を形成する。遮蔽性部分の二量体化には共有結合が伴わず、ノブインホールなどの構造相補性を通じた鎖間の会合を工学的に作製することによって最適化することができる。遮蔽性部分は、免疫グロブリン様分子の定常ドメイン（例えば、ＣＨ１、ＣＨ３カッパ、ＣＨ３ラムダ）またはＴ細胞受容体（例えば、ＴＣＲアルファ定常ドメインおよびＴＣＲベータ定常ドメイン）に由来するものであるので、潜在的に免疫原性の低下を示し得る。

【０００６】

遮蔽性部分を、プロテアーゼ、例えば、疾患組織部位に局在するプロテアーゼによって切断することができるペプチドリンカーに付着させる。遮蔽性部分とペプチドリンカーは一緒に作動して、抗体の抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を立体的に妨害する遮蔽物として作用する。ペプチドリンカーの柔軟性および／または切断されやすさの改善のために、そのアミノ酸の長さおよび配列を改変することができる。ペプチドリンカーの長さおよび／または配列を改変することにより、遮蔽性部分の立体的妨害およびペプチドリンカーの切断されやすさを増大または低減することができる（例えば、調整可能な切断性）。

【０００７】

遮蔽性部分による立体的妨害および腫瘍関連プロテアーゼによる最適な切断されやすさを可能にするために、ペプチドリンカーの長さを延長または短縮してリンカー柔軟性との最適なバランスを得ることができる。例えば、より短いペプチドリンカーは、立体的妨害の改善（遮蔽性の改善）を示し得るが、プロテアーゼ消化の受けやすさの減少も示す。ペプチドリンカーを、リンカー柔軟性を付与するアミノ酸（例えば、グリシン）が含まれるように設計することができる。ペプチドリンカー内の切断可能部位を、プロテアーゼによる影響の受けやすさのモジュレーションが付与されるように設計することができる。一実施例では、ペプチドリンカーを、プロテアーゼによる影響の受けやすさを増大または低減するために、ペプチドリンカーのＣ末端および／またはＮ末端にグリシンが１～５個含まれるように設計することができる。別の例では、ある特定のアミノ酸配列は、ＭＭＰ９プロテアーゼでは容易に切断可能であるが、ＭＭＰ２プロテアーゼでは切断レベルの低下を示す。さらに、プロテアーゼによる影響の受けやすさをモジュレートするために、ペプチドリンカーのＣ末端と重鎖または軽鎖可変領域のＮ末端の接合部の配列を、１つまたは複数のアミノ酸置換、欠失および／または挿入が含まれるように変異させることができる。

【０００８】

活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、不活性の状態では、低レベルの腫瘍関連プロテアーゼを発現する健康な組織への結合の減少を示す。活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、腫瘍関連プロテアーゼを高レベルで発現する患部組織部位でペプチドリンカーが切断されると不活性の状態から活性化された状態に変換され、それにより、オフターゲット活性が著しく低下し、毒性が低減する。本明細書に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質には、治療域を広げる潜在性がある。

【０００９】

活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を化学的リンカーによって毒素と接合し、それにより、免疫コンジュゲートを形成することができる。毒素は、細胞および組織に対して細胞傷害性であり得る。免疫コンジュゲートを使用して毒素を標的腫瘍に送達することができる。

【図面の簡単な説明】

【００１０】

【図１】図１は、ＩｇＧ型構造を有する活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の非限定的な実施形態を示す概略図である。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、１つの標的抗原に結合する（例えば、単一特異性）。

【図２】図２は、ＩｇＧ型構造を有する活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の

非限定的な実施形態を示す概略図である。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、２種の異なる標的抗原に結合する（例えば、二重特異性）。
【図３Ａ】図３Ａは、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）型構造を有する活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の非限定的な実施形態を示す概略図である。
【図３Ｂ】図３Ｂは、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）型構造を有する活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の非限定的な実施形態を示す概略図である。
【図４－１】図４Ａは、前駆体がプロセシングされて成熟二量体抗原受容体（ＤＡＲ）型構造になり得る、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の前駆体ポリペプチドの非限定的な実施形態を示す概略図である。図４Ｂは、前駆体がプロセシングされて成熟二量体抗原受容体（ＤＡＲ）型構造になり得る、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の前駆体ポリペプチドの非限定的な実施形態を示す概略図である。
【図４－２】図４Ｃは、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）型構造を有する活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を形成し得る２つのポリペプチドの非限定的な実施形態を示す概略図である。
【図４－３】図４Ｄは、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）型構造を有する活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を形成し得る２つのポリペプチドの非限定的な実施形態を示す概略図である。
【図５】図５Ａは、実施例３および表１４に記載のＭＭＰ２プロテアーゼを用いた消化によって生じた、ＭＭＰ２／９またはｕＰＡ１ペプチドリンカーを含む種々の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体の切断産物のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。図５Ｂは、実施例３および表１５に記載のＭＭＰ９プロテアーゼを用いた消化によって生じた、ＭＭＰ２／９またはｕＰＡ１ペプチドリンカーを含む種々の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体の切断産物のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。
【図６－１】図６Ａは、実施例４に記載の通り、ＭＭＰ９またはＭＭＰ２プロテアーゼを用いて０．５時間、１時間、２時間、６時間または２４時間にわたって消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨノブＭＭＰ２／９］の切断産物のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。図６Ｂは、実施例４に記載の通り、ＭＭＰ９またはＭＭＰ２プロテアーゼを用いて０．５時間、１時間、２時間、６時間または２４時間にわたって消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨノブ欠失］の切断産物のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。
【図６－２】図６Ｃは、実施例４に記載の通り、ＭＭＰ９またはＭＭＰ２プロテアーゼを用いて０．５時間、１時間、２時間、６時間または２４時間にわたって消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨノブ切断不可能］の切断産物のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。図６Ｄは、実施例４に記載の通り、ＭＭＰ９またはＭＭＰ２プロテアーゼを用いて０．５時間、１時間、２時間、６時間または２４時間にわたって消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨノブ伸長］の切断産物のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。
【図６－３】図６Ｅは、実施例４に記載の通り、ＭＭＰ９またはＭＭＰ２プロテアーゼを用いて０．５時間、１時間、２時間、６時間または２４時間にわたって消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホール欠失、ＬＣ－ＣＨノブ欠失］の切断産物のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。
【図７－１】図７Ａは、実施例５に記載の通り、ＭＭＰ９、ＭＭＰ２またはｕＰＡプロテアーゼを用いて１時間、３時間、５時間または２０時間にわたって消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨノブＭＭＰ２／９］の切断産物のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。
【図７－２】図７Ｂは、実施例５に記載の通り、ＭＭＰ９、ＭＭＰ２またはｕＰＡプロテアーゼを用いて１時間、３時間、５時間または２０時間にわたって消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ９、ＬＣ－ＣＨノブＧ

Ｓ］の切断産物のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。図７Ｃは、実施例５に記載の通り、ＭＭＰ９、ＭＭＰ２またはｕＰＡプロテアーゼを用いて１時間、３時間、５時間または２０時間にわたって消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ９、ＬＣ－ＣＨノブｕＰＡ１］の切断産物のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。

【図８－１】図８Ａは、実施例６および表１６に記載の、消化されていない活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］のＬＣ－ＭＳ分析からのペプチドトレースを示す。分析前に抗体を脱グリコシル化した。図８Ｂは、実施例６および表１７に記載の、ＭＭＰ９を用いて消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］のＬＣ－ＭＳ分析からのペプチドトレースを示す。分析前に抗体を脱グリコシル化した。

【図８－２】図８Ｃは、実施例６および表１７に記載の、ＭＭＰ９を用いて消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］のＬＣ－ＭＳ分析からのペプチドトレースを示す。分析前に抗体を脱グリコシル化した。

【図９－１】図９Ａは、実施例６および表１８に記載の、消化されていない活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］のＬＣ－ＭＳ分析からのペプチドトレースを示す。分析前に抗体を脱グリコシル化した。

【図９－２】図９Ｂは、実施例６および表１９に記載の、ＭＭＰ９を用いて消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］のＬＣ－ＭＳ分析からのペプチドトレースを示す。分析前に抗体を脱グリコシル化した。図９Ｃは、実施例６および表１９に記載の、ＭＭＰ９を用いて消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］のＬＣ－ＭＳ分析からのペプチドトレースを示す。分析前に抗体を脱グリコシル化した。

【図１０Ａ】図１０Ａは、実施例７および表２０に記載の、ＥＧＦＲ発現細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１）の、カットされていない（黒塗りの丸）またはＭＭＰ９を用いてカットされた（黒塗りの四角）活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］との結合、または対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りの三角形）との結合を比較する用量反応を示す。

【図１０Ｂ】図１０Ｂは、実施例７および表２０に記載の、ＥＧＦＲ発現細胞（Ａ４３１）の、カットされていない（黒塗りの丸）またはＭＭＰ９を用いてカットされた（黒塗りの四角）活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］との結合、または対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りの三角形）との結合を比較する用量反応を示す。

【図１０Ｃ】図１０Ｃは、実施例７および表２０に記載の、ＥＧＦＲ発現細胞（ＭＤＡ－ＭＢ－４６８）の、カットされていない（黒塗りの丸）またはＭＭＰ９を用いてカットされた（黒塗りの四角）活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］との結合、または対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りの三角形）との結合を比較する用量反応を示す。

【図１１－１】図１１Ａは、実施例８に記載の、カットされていない活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］（黒塗りのひし形）および［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ１ラムダＭＭＰ２／９］（黒塗りの三角形）および対照抗ＥＧＦＲ抗体（白抜きの三角形）の、組換えＥＧＦＲタンパク質との結合活性を比較する、ＥＬＩＳＡアッセイからの結合曲線を示す。ＥＣ５０値を表２１に列挙する。

【図１１－２】図１１Ｂは、実施例８に記載の、カットされていない活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ欠失］（黒塗りの丸）および［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］（黒

塗りの四角）および［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］（黒塗りの三角形）および［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］（黒塗りの逆さの三角形）および対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りのひし形）の、組換えＥＧＦＲタンパク質との結合活性を比較する、ＥＬＩＳＡアッセイからの結合曲線を示す。ＭＭＰ９を用いてカットされた［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］についての結合曲線も示されている（「カットされた」）。ＥＣ５０値を表２２に列挙する。

【図１１－３】図１１Ｃは、実施例８に記載の、カットされていない活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ欠失］（黒塗りの丸）および［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］（黒塗りの四角）および［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］（黒塗りの三角形）および［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］（黒塗りの逆さの三角形）および対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りのひし形）の、組換えＥＧＦＲタンパク質との結合活性を比較する、ＥＬＩＳＡアッセイからの結合曲線を示す。ＥＣ５０値を表２３に列挙する。

【図１１－４】図１１Ｄは、実施例８に記載の、カットされていない活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホール欠失、ＬＣ－ＣＨ３ノブ欠失］（黒塗りの丸）および［ＨＣ－ＣＨ３ホール欠失、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］（黒塗りの四角）および［ＨＣ－ＣＨ３ホール欠失、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］（黒塗りの三角形）および［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］（黒塗りの逆さの三角形）および対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りのひし形）の、組換えＥＧＦＲタンパク質との結合活性を比較する、ＥＬＩＳＡアッセイからの結合曲線を示す。ＥＣ５０値を表２４に列挙する。

【図１１－５】図１１Ｅは、実施例８に記載の、カットされていない状態の（黒塗りの丸）またはＭＭＰ９を用いてカットされた（黒塗りの逆さの三角形）活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］、および対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りの三角形）の、組換えＥＧＦＲタンパク質との結合活性を比較する、ＥＬＩＳＡアッセイからの結合曲線を示す。ＥＣ５０値を表２５に列挙する。

【図１１－６】図１１Ｆは、実施例８に記載の、カットされていない状態の（黒塗りの四角）またはＭＭＰ９を用いてカットされた（黒塗りのひし形）活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］、および対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りの三角形）の、組換えＥＧＦＲタンパク質との結合活性を比較する、ＥＬＩＳＡアッセイからの結合曲線を示す。ＥＣ５０値を表２６に列挙する。

【図１１－７】図１１Ｇは、実施例８に記載の、カットされていない状態の（黒塗りの四角）またはＭＭＰ９を用いてカットされた（「カットされた」、黒塗りの丸）活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］、および対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りのひし形）の、組換えＥＧＦＲタンパク質との結合活性を比較する、ＥＬＩＳＡアッセイからの結合曲線を示す。ＥＣ５０値を表２７に列挙する。

【図１１－８】図１１Ｈは、実施例８に記載の、カットされていない状態の（黒塗りの三角形）またはＭＭＰ９を用いてカットされた（「カットされた」、黒塗りの丸）活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］、および対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りのひし形）の、組換えＥＧＦＲタンパク質との結合活性を比較する、ＥＬＩＳＡアッセイからの結合曲線を示す。ＥＣ５０値を表２８に列挙する。

【図１２－１】図１２Ａは、実施例９に記載の、対照抗ＥＧＦＲ抗体、またはカットされていない状態もしくはカットされた状態のいずれかの活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］とのヒトＥＧＦＲ抗原結合のバイオレイヤー干渉法のトレースを示す。図１２Ｂは、実施例９に記載の

、対照抗ＥＧＦＲ抗体、またはカットされていない状態もしくはカットされた状態のいずれかの活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］とのヒトＥＧＦＲ抗原結合のバイオレイヤー干渉法のトレースを示す。

【図１２－２】図１２Ｃは、実施例９に記載の、対照抗ＥＧＦＲ抗体、またはカットされていない状態もしくはカットされた状態のいずれかの活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］とのヒトＥＧＦＲ抗原結合のバイオレイヤー干渉法のトレースを示す。結合速度論値を表２９に列挙する。

【図１３－１】図１３Ａは、実施例１４に記載の、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ１）ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ１）ＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞の、抗ヒトカッパＡＰＣおよびフルオロフォアで標識されたＥＧＦＲ抗原への結合についてのＦＡＣＳ分析の結果を示す。陽性対照ＨｅＬａ細胞は遮蔽物を有さない抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲを発現するものであり、陰性対照は非トランスジェニックＨｅＬａ細胞である。

【図１３－２】図１３Ｂは、実施例１４に記載の、抗ヒトカッパＡＰＣおよびフルオロフォアで標識されたＥＧＦＲ抗原に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣＳ分析の結果を示す。陽性対照ＨｅＬａ細胞は遮蔽物を有さない抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲを発現するものであり、陰性対照は非トランスジェニックＨｅＬａ細胞である。図１３Ｃは、実施例１４に記載の、抗ヒトカッパＡＰＣおよびフルオロフォアで標識されたＥＧＦＲ抗原に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣＳ分析の結果を示す。陽性対照ＨｅＬａ細胞は遮蔽物を有さない抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲを発現するものであり、陰性対照は非トランスジェニックＨｅＬａ細胞である。

【図１３－３】図１３Ｄは、実施例１４に記載の、抗ヒトカッパＡＰＣおよびフルオロフォアで標識されたＥＧＦＲ抗原に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣＳ分析の結果を示す。陽性対照ＨｅＬａ細胞は遮蔽物を有さない抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲを発現するものであり、陰性対照は非トランスジェニックＨｅＬａ細胞である。図１３Ｅは、実施例１４に記載の、抗ヒトカッパＡＰＣおよびフルオロフォアで標識されたＥＧＦＲ抗原に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－３８Ｃ２－ＶＨ　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－３８Ｃ２－ＶＬ　ＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣＳ分析の結果を示す。陽性対照ＨｅＬａ細胞は遮蔽物を有さない抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲを発現するものであり、陰性対照は非トランスジェニックＨｅＬａ細胞である。

【図１４】図１４Ａは、実施例１３に記載の、抗ヒトカッパＡＰＣおよびフルオロフォアで標識されたＥＧＦＲ抗原に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。図１４Ｂは、実施例１３に記載の、抗ヒトカッパＡＰＣおよびフルオロフォアで標識されたＥＧＦＲ抗原に結合する、ＭＭＰ９を用いて消化された活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。図１４Ｃは、実施例１４に記載の、抗ヒトカッパＡＰＣおよびフルオロフォアで標識されたＥＧＦＲ抗原に結合する、活性化可能な遮蔽性部分を有さない抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現する陽性対照トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。図１４Ｄは、実施例１３に記載の、抗ヒトカッパＡＰＣおよびフルオロフォアで標識されたＥＧＦＲ抗原に

結合する、抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現せず、活性化可能な遮蔽性部分も有さない、陰性対照非トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。

【図１５－１】図１５Ａは、実施例１４に記載の、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。図１５Ｂは、実施例１４に記載の、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、活性化可能な遮蔽性部分を欠く抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。図１５Ｃは、実施例１４に記載の、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、活性化可能な遮蔽性部分を欠く抗ＣＤ３８　ＣＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。図１５Ｄは、実施例１４に記載の、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体の結合する、非トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。

【図１５－２】図１５Ｅは、実施例１４に記載の、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。図１５Ｆは、実施例１４に記載の、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、活性化可能な遮蔽性部分を欠く抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞である図１５Ｂに示されているものと同じＦＡＣ結果を示す。図１５Ｇは、実施例１４に記載の、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、活性化可能な遮蔽性部分を欠く抗ＣＤ３８　ＣＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞である図１５Ｃに示されているものと同じＦＡＣ結果を示す。図１５Ｈは、実施例１４に記載の、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、非トランスジェニックＨｅＬａ細胞である図１５Ｄに示されているものと同じＦＡＣ結果を示す。

【図１６－１】図１６Ａは、実施例１４に記載の、ＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体およびＰＥで標識されたＣＤ３８　Ｆｃに結合する、活性化可能な遮蔽性部分を欠く抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。図１６Ｂは、実施例１４に記載の、ＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体およびＰＥで標識されたＣＤ３８　Ｆｃに結合する、活性化可能な遮蔽性部分を欠く抗ＣＤ３８　ＣＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。図１６Ｃは、実施例１４に記載の、ＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体およびＰＥで標識されたＣＤ３８　Ｆｃに結合する、活性化可能な遮蔽性部分を欠く抗ＢＣＭＡ　ＣＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。図１６Ｄは、実施例１４に記載の、ＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体およびＰＥで標識されたＣＤ３８　Ｆｃに結合する非トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。

【図１６－２】図１６Ｅは、実施例１４に記載の、ＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体およびＰＥで標識されたＣＤ３８　Ｆｃに結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。図１６Ｆは、実施例１４に記載の、ＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体およびＰＥで標識されたＣＤ３８　Ｆｃに結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＦＡＣ分析の結果を示す。

【図１７】図１７は、ＭＭ１Ｒ多発性骨髄腫細胞からの馴化培地の存在下または非存在下

での、標的細胞の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］との結合を検出する固定細胞画像化アッセイの顕微鏡画像を示す。

【図１８】図１８は、実施例１６に記載の、遮蔽性部分を有さない対照抗ＥＧＦＲ抗体と種々の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗ＥＧＦＲ抗体を比較するＡＤＣＣアッセイの結果を示す。ＥＣ５０値を表３４に列挙する。

【図１９】図１９は、実施例１８に記載の、カットされていない状態の、活性化可能な遮蔽性部分を有し、４－１ＢＢおよびＣＤ３ゼータを有する細胞内シグナル伝達ドメインを有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ［ＨＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９］を発現し、抗ヒトカッパＡＰＣおよびフルオロフォアで標識されたＥＧＦＲ抗原に結合するヒトＴ細胞を検出するために使用したフローサイトメトリーアッセイの結果を示す。試験細胞は、リンカーＭＭＰ２／９、切断不可能、またはｕＰＡを有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲを発現する。陽性対照Ｔ細胞は、遮蔽物を有さない抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲを発現するものであり、陰性対照は非トランスジェニックＧＦＰ　Ｔ細胞である。

【図２０Ａ】図２０Ａは、対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ　Ｔ細胞（Ａ）、活性化Ｔ細胞（Ｅ）、およびエフェクターなし（Ｆ）と、ＭＭＰ９（Ｂ）またはｕＰＡ（Ｃ）で切断可能なリンカー、または切断不可能なリンカー（Ｄ）を有する遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ　Ｔ細胞を比較する細胞傷害性アッセイの結果を示す。標的細胞はＡ５４９である。Ｅ：Ｔ比は５：１である。

【図２０Ｂ】図２０Ｂは、８時間時点および４８時間時点での細胞死滅レベルを比較する、上記の図２０Ａに示されている細胞傷害性データの棒グラフを示す。

【図２１Ａ】図２１Ａは、対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ　Ｔ細胞（Ａ）、活性化Ｔ細胞（Ｅ）、およびエフェクターなし（Ｆ）と、ＭＭＰ９（Ｂ）またはｕＰＡ（Ｃ）で切断可能なリンカー、または切断不可能なリンカー（Ｄ）を有する遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ　Ｔ細胞を比較する細胞傷害性アッセイの結果を示す。標的細胞はＡ５４９である。Ｅ：Ｔ比は２０：１である。

【図２１Ｂ】図２１Ｂは、８時間時点および４８時間時点での細胞死滅レベルを比較する、上記の図２１Ａに示されている細胞傷害性データの棒グラフを示す。

【図２２Ａ】図２２Ａは、実施例２０に記載のインターフェロンガンマ放出アッセイの標準曲線を示す。

【図２２Ｂ】図２２Ｂは、ＭＭＰ９またはｕＰＡで切断可能なリンカー、または切断不可能なリンカーを有する遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ　Ｔ細胞を比較する、インターフェロンガンマ放出アッセイの棒グラフである。陰性対照には、抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ　Ｔ細胞、活性化Ｔ細胞（ＧＦＰ）、およびＤＡＲ　Ｔ細胞なしを含めた。

【図２３】図２３は、第１のポリペプチド鎖、自己切断性配列（例えば、Ｔ２Ａ）、および第２のポリペプチド鎖を含有する対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲの前駆体ポリペプチド鎖であって、Ｉｇガンマ－１　ＣＨ３遮蔽性部分を欠き、切断可能なリンカーを欠き、また、４－１ＢＢおよびＣＤ３ゼータ由来の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前駆体ポリペプチド鎖のアミノ酸配列を示す。予測される第１および第２のポリペプチド鎖のアミノ酸配列も示されている。前駆体、ならびに第１および第２のポリペプチド鎖を発現するトランスジェニックＴ細胞の調製は、実施例１７に記載されている。これらのトランスジェニックＴ細胞の分析が図１９～２２Ｂに示されている。

【図２４】図２４は、第１のポリペプチド鎖、自己切断性配列（例えば、Ｔ２Ａ）、および第２のポリペプチド鎖を含有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲの前駆体ポリペプチド鎖であって、ＭＭＰ２／９で切断可能なリンカーと連結したＩｇガンマ－１　ＣＨ３遮蔽性部分を含み、かつ、４－１ＢＢおよびＣＤ３ゼータ由来の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前駆体ポリペプチド鎖のアミノ酸配列を示す。予測される第１および第２のポリペプチド鎖のアミノ酸配列も示されている。前駆体、ならびに第１および第２のポリペプチド鎖を発現するトランスジェニックＴ細胞の調製は、実施例１７に記載されている。これらのトランスジェニックＴ細胞の分析が図１９～２２Ｂに示されている。

【図２５】図２５は、第１のポリペプチド鎖、自己切断性配列（例えば、Ｔ２Ａ）、および第２のポリペプチド鎖を含有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲの前駆体ポリペプチド鎖であって、ｕＰＡで切断可能なリンカーと連結したＩｇガンマ－１　ＣＨ３遮蔽性部分を含み、かつ、４－１ＢＢおよびＣＤ３ゼータ由来の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前駆体ポリペプチド鎖のアミノ酸配列を示す。予測される第１および第２のポリペプチド鎖のアミノ酸配列も示されている。前駆体、ならびに第１および第２のポリペプチド鎖を発現するトランスジェニックＴ細胞の調製は、実施例１７に記載されている。これらのトランスジェニックＴ細胞の分析が図１９～２２Ｂに示されている。
【図２６】図２６は、第１のポリペプチド鎖、自己切断性配列（例えば、Ｔ２Ａ）、および第２のポリペプチド鎖を含有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲの前駆体ポリペプチド鎖であって、切断不可能なリンカーと連結したＩｇガンマ－１　ＣＨ３遮蔽性部分を含み、また、４－１ＢＢおよびＣＤ３ゼータ由来の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、前駆体ポリペプチド鎖のアミノ酸配列を示す。予測される第１および第２のポリペプチド鎖のアミノ酸配列も示されている。前駆体、ならびに第１および第２のポリペプチド鎖を発現するトランスジェニックＴ細胞の調製は、実施例１７に記載されている。これらのトランスジェニックＴ細胞の分析が図１９～２２Ｂに示されている。
【発明を実施するための形態】
【００１１】
詳細な説明
定義：
別段の定義のない限り、本明細書で使用される科学技術用語は、別段の定義のない限り当業者に一般に理解される意味を有する。一般に、本明細書に記載の細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、トランスジェニック細胞作製、タンパク質化学および核酸化学ならびにハイブリダイゼーションの技法に関する用語法は周知であり、当技術分野で一般に使用されるものである。本明細書に提示される方法および技法は、別段の指定のない限り、一般に、当技術分野で周知の従来の手順に従って、また、本明細書で引用され、考察されている種々の一般的なおよびより詳細な参考文献に記載されている通り、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)およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)を参照されたい。Borrebaeck (ed) Antibody Engineering, 2nd Edition Freeman and Company, NY,1995；McCafferty et al. Antibody Engineering, A Practical Approach IRL at Oxford Press, Oxford, England, 1996；およびPaul (1995) Antibody Engineering Protocols Humana Press, Towata, N.J. ,1995；Paul (ed.), Fundamental Immunology, Raven Press, N.Y, 1993；Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY；Harlow and Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, NY；Stites et al. (eds.) Basic and Clinical Immunology (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, Califを含めた多数の基礎テキスト、およびそこで引用されている参考文献；Coding Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2nd ed.) Academic Press, New York, N.Y., 1986、およびKohler and Milstein Nature 256: 495-497, 1975に標準の抗体産生プロセスが記載されている。本明細書において引用されている参考文献は全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。酵素反応および富化／精製技法も周知であり、当技術分野において一般に実現されるまたは本明細書に記載の通り、製造者の仕様書に従って実施される。本明細書に記載の分析化学、合成有機化学、および薬学および製薬化学に関連する用語法、ならびにそれらの実験手順および技法は周知であり、当技術分野で一般に使用されるものである。化学合成、化学分析、医薬調製、製剤、および送達、ならびに患者の処置のために標準の

技法を使用することができる。

【００１２】

本明細書に提示される表題は、本開示の種々の態様を限定するものではなく、その態様は本明細書全体を参照することによって理解することができる。

【００１３】

本明細書において文脈により必要とされない限り、単数の用語は複数を含むものとし、複数の用語は単数を含むものとする。単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」および「その（ｔｈｅ）」、ならびにあらゆる単語の単数での使用は、１つの指示対象に明白におよび明確に限定される場合を除き、複数の指示対象を包含する。

【００１４】

選択（例えば、「または（ｏｒ）」）の使用は、本明細書では、選択の一方または両方のいずれかまたはこれらの任意の組合せを意味すると解釈されることが理解される。

【００１５】

本明細書で使用される「および／または」という用語は、指定された特色または構成成分のそれぞれの、他の特色または構成成分を伴うまたは伴わない具体的な開示を意味すると解釈されるべきである。例えば、本明細書において「Ａおよび／またはＢ」などの句で使用される「および／または」という用語は、「ＡおよびＢ」、「ＡまたはＢ」、「Ａ」（単独）、および「Ｂ」（単独）を含むことが意図されている。同様に、「および／または」という用語は、「Ａ、Ｂ、および／またはＣ」などの句で使用される場合、以下の態様のそれぞれを包含することが意図されている：Ａ、Ｂ、およびＣ；Ａ、Ｂ、またはＣ；ＡまたはＣ；ＡまたはＢ；ＢまたはＣ；ＡおよびＣ；ＡおよびＢ；ＢおよびＣ；Ａ（単独）；Ｂ（単独）；ならびにＣ（単独）。

【００１６】

本明細書で使用される場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」および「含有する（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」という用語、およびそれらの文法上の変形は、本明細書で使用される場合、非限定的であることが意図されており、したがって、一覧内の１つの項目または複数の項目は、列挙された項目を置換することまたはそれに追加することができる他の項目を排除するものではない。本明細書において態様が「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という言葉と共に記載されている場合は必ず、「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」および／または「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」という用語で記載される他の類似の態様も提示されることが理解される。

【００１７】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、値または組成が、当業者によって決定される、その値または組成がどのように測定または決定されるか、すなわち、測定系の限界に一部依存する、特定の値または組成に対する許容される誤差範囲内に入ることを指す。例えば、「約」または「およそ」は、当技術分野における慣習に従って１標準偏差または１よりも大きい標準偏差の範囲内に入ることを意味し得る。あるいは、「約」または「およそ」は、測定系の限界に応じて、１０％まで（すなわち、±１０％）またはそれよりも大きい範囲を意味し得る。例えば、約５ｍｇは、４．５ｍｇから５．５ｍｇの間の任意の数を含み得る。さらに、特に生物系またはプロセスに関して、この用語は、値の１桁までまたは５倍までを意味し得る。特定の値または組成が本開示に提示されている場合、別段の指定のない限り、「約」または「およそ」の意味は、その特定の値または組成に関して許容される誤差範囲内に入ることが想定されるものとする。

【００１８】

本明細書で使用される「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語ならびに他の関連する用語は、互換的に使用され、アミノ酸のポリマーを指し、いかなる特定の長さにも限定されない。ポリペプチドは、天然アミノ酸および非天然アミノ酸を包含し得る。ポリペプチドは、組換え形態または化学的に合成された形態を包含する。ポリペプチドはまた、ある特定のアミノ酸残基における切断、例えば、分泌シグナルペプチ

ドによる切断または非酵素的切断による切断をまだ受けていない、前駆体分子も包含する。ポリペプチドは、切断を受けた成熟分子を包含する。これらの用語は、ネイティブなタンパク質および人工的なタンパク質、タンパク質配列のタンパク質断片およびポリペプチド類似体（例えば、変異タンパク質、バリアント、キメラタンパク質および融合タンパク質など）、ならびに、翻訳後にもしくは他のように、共有結合によりもしくは非共有結合により、修飾されたタンパク質を包含する。２つまたはそれよりも多くのポリペプチド（例えば、３つのポリペプチド鎖）は、共有結合性および／または非共有結合性の会合によって互いに会合して、ポリペプチド複合体を形成し得る。ポリペプチド鎖の会合は、ペプチドフォールディングも含み得る。したがって、ポリペプチド複合体は、複合体を形成するポリペプチド鎖の数に応じて、二量体、三量体、四量体、またはより高次の複合体であり得る。

【００１９】

本明細書で使用される「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語ならびに他の関連する用語は、互換的に使用され、ヌクレオチドのポリマーを指し、いかなる特定の長さにも限定されない。核酸は、組換え形態および化学的に合成された形態を包含する。核酸は、ＤＮＡ分子（ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡ）、ＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）、ヌクレオチド類似体（例えば、ペプチド核酸および天然に存在しないヌクレオチド類似体）を使用して生成されたＤＮＡまたはＲＮＡの類似体、およびそのハイブリッドを包含する。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得る。一実施形態では、本開示の核酸分子は、抗体、またはその断片もしくはｓｃＦｖ、誘導体、変異タンパク質、またはバリアントをコードする連続的なオープンリーディングフレームを含む。一実施形態では、核酸は、１つの型のポリヌクレオチドまたは２つもしくはそれよりも多くの異なる型のポリヌクレオチドの混合物を含む。活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分をコードする核酸が本明細書に記載されている。

【００２０】

「回収する（ｒｅｃｏｖｅｒ）」または「回収（ｒｅｃｏｖｅｒｙ）」または「回収する（ｒｅｃｏｖｅｒｉｎｇ）」という用語、および他の関連する用語は、タンパク質（例えば、抗体またはその抗原結合性部分）を、宿主細胞培養培地から、または宿主細胞溶解物から、または宿主細胞膜から得ることを指す。一実施形態では、タンパク質を、発現されたタンパク質の宿主細胞からの（例えば、哺乳動物宿主細胞からの）分泌を媒介する分泌シグナルペプチド配列（リーダーペプチド配列）と融合した組換えタンパク質として宿主細胞に発現させる。分泌されたタンパク質を宿主細胞培地から回収することができる。一実施形態では、タンパク質を、宿主細胞溶解物から回収することができる、分泌シグナルペプチド配列を欠く組換えタンパク質として宿主細胞に発現させる。一実施形態では、タンパク質を、発現されたタンパク質を宿主細胞膜から放出させる界面活性剤を使用して回収することができる、膜に結合したタンパク質として宿主細胞に発現させる。一実施形態では、タンパク質を回収するために使用される方法とは無関係に、タンパク質を、回収されたタンパク質から細胞デブリを除去する手順に供することができる。例えば、回収されたタンパク質を、クロマトグラフィー、ゲル電気泳動および／または透析に供することができる。一実施形態では、クロマトグラフィーは、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーおよび／またはシリカでのクロマトグラフィーを含めた任意の１つまたは任意の組合せまたは２つもしくはそれよりも多くの手順を含む。一実施形態では、アフィニティークロマトグラフィーは、プロテインＡまたはＧ（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ由来の細胞壁構成成分）を含む。

【００２１】

「単離された」という用語は、他の細胞性材料を実質的に含まないタンパク質（例えば、抗体またはその抗原結合性部分）またはポリヌクレオチドを指す。当技術分野で周知のタンパク質精製技法を使用して単離することにより、タンパク質を、天然では付随する構

成成分（または抗体を作製するために使用される細胞の発現系もしくは化学合成法に付随する構成成分）を実質的に含まないものにすることができる。単離されたという用語はまた、一部の実施形態では、同じ種の他の分子、例えば、それぞれ異なるアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を有する他のタンパク質またはポリヌクレオチドを実質的に含まないタンパク質またはポリヌクレオチドも指す。所望の分子の均一性の純度は、ゲル電気泳動などの分解能が低い方法およびＨＰＬＣまたは質量分析などの分解能が高い方法を含めた、当技術分野で周知の技法を使用してアッセイすることができる。一実施形態では、本開示の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分を単離する。

【００２２】

「リーダー配列」または「リーダーペプチド」または「ペプチドシグナル配列」または「シグナルペプチド」または「分泌シグナルペプチド」という用語は、ポリペプチドのＮ末端に位置するペプチド配列を指す。リーダー配列は、ポリペプチド鎖を細胞分泌経路に方向づけ、また、細胞膜の脂質二重層へのポリペプチドの組込みおよび繋ぎとめを方向づけ得る。一般には、リーダー配列は、約１０～５０アミノ酸の長さである。リーダー配列は、前駆体ポリペプチドの、細胞質基質から小胞体への輸送を方向づけ得る。一実施形態では、リーダー配列は、ＣＤ８α、ＣＤ２８またはＣＤ１６リーダー配列を含むシグナル配列を含む。一実施形態では、シグナル配列は、例えば、マウスまたはヒトＩｇガンマ分泌シグナルペプチドを含めた哺乳動物の配列を含む。一実施形態では、リーダー配列は、マウスＩｇガンマリーダーペプチド配列ＭＥＷＳＷＶＦＬＦＦＬＳＶＴＴＧＶＨＳを含む。

【００２３】

本明細書で使用される「抗原結合性タンパク質」および関連する用語は、抗原に結合する部分、および、必要に応じて、抗原結合性部分が、抗原結合性タンパク質と抗原の結合を促進するコンフォメーションをとることを可能にする、足場またはフレームワーク部分、を含む、タンパク質を指す。抗原結合性タンパク質の例としては、抗体、抗体断片（例えば、抗体の抗原結合性部分）、抗体誘導体、および抗体類似体が挙げられる。抗原結合性タンパク質は、例えば、ＣＤＲまたはＣＤＲ誘導体が移植された、代替タンパク質足場または人工足場を含み得る。そのような足場としては、これだけに限定されないが、例えば、抗原結合性タンパク質の三次元構造を安定化するために導入された変異を含む、抗体由来足場、ならびに、例えば生体適合性ポリマーを含む、完全に合成の足場、が挙げられる。例えば、Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1:121-129; Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654を参照されたい。さらに、ペプチド抗体模倣物（「ＰＡＭ」）、ならびに、フィブロネクチン構成成分を利用した抗体模倣物に基づく足場を、足場として使用することができる。活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分を含む、抗原結合性タンパク質が本明細書に記載されている。

【００２４】

抗原結合性タンパク質は、例えば、天然に存在する免疫グロブリンの構造を有し得る。一実施形態では、「免疫グロブリン」は、各対が１本の「軽」鎖（約２５ｋＤａ）と１本の「重」鎖（約５０～７０ｋＤａ）を有する、ポリペプチド鎖の２つの同一の対で構成される天然に存在する四量体分子を指す。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識を主に担う約１００～１１０またはそれを超えるアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主に担う定常領域を規定する。ヒト軽鎖は、カッパまたはラムダ軽鎖に分類される。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンに分類され、それぞれ、抗体のアイソタイプがＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、およびＩｇＥと定義される。軽鎖および重鎖内で、可変領域と定常領域は約１２個またはそれよりも多くのアミノ酸の「Ｊ」領域によって接合しており、重鎖はまた、約１０個またはそれよりも多くのアミノ酸の「Ｄ」領域も含む。一般に、Fundamental Immunology C

h. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) を参照されたい（その全体があらゆる目的に関して参照により組み込まれる）。重鎖および／または軽鎖は、分泌のためのリーダー配列を含んでもよく、含まなくてもよい。各軽／重鎖対の可変領域が抗体結合性部位を形成し、したがって、インタクトな免疫グロブリンは抗原結合性部位を２つ有する。一実施形態では、抗原結合性タンパク質は、四量体免疫グロブリン分子とは異なるが、それでもなお標的抗原に結合するまたは２つもしくはそれよりも多くの標的抗原に結合する構造を有する合成分子であり得る。例えば、合成抗原結合性タンパク質は、抗体断片、１～６もしくはそれよりも多くのポリペプチド鎖、ポリペプチドの非対称アセンブリ、または他の合成分子を含み得る。ＥＧＦＲまたはＣＤ３８に特異的に結合する免疫グロブリン様特性を有する抗原結合性タンパク質が本明細書に記載されている。

【００２５】

免疫グロブリン鎖の可変領域は、比較的保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）と、３つの、相補性決定領域またはＣＤＲとも称される超可変領域が接合した、同じ一般構造を示す。Ｎ末端からＣ末端へ、軽鎖および重鎖はどちらもドメインＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３およびＦＲ４を含む。

【００２６】

１つまたは複数のＣＤＲを分子に共有結合によりまたは非共有結合により組み入れて、その分子を抗原結合性タンパク質にすることができる。抗原結合性タンパク質にＣＤＲ（複数可）をより大きなポリペプチド鎖の一部として組み入れることもでき、ＣＤＲ（複数可）を別のポリペプチド鎖に共有結合により連結することもでき、あるいは、ＣＤＲ（複数可）を非共有結合により組み入れることもできる。ＣＤＲにより、抗原結合性タンパク質が特定の目的の抗原に特異的に結合することが可能になる。

【００２７】

各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabat et al. in Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991（「Ｋａｂａｔ番号付け」）の定義に従う。免疫グロブリン鎖内のアミノ酸に対する他の番号付け体系としては、ＩＭＧＴ（登録商標）（ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＩｍＭｕｎｏＧｅｎｅＴｉｃｓ ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍ；Lefranc et al, Dev. Comp. Immunol. 29: 185-203; 2005）およびＡＨｏ（Honegger and Pluckthun, J. Mol. Biol. 309 (3): 657-670; 2001）；Ｃｈｏｔｈｉａ（Al-Lazikani et al., 1997 Journal of Molecular Biology 273: 927-948；接触（Ｃｏｎｔａｃｔ）（Maccallum et al., 1996 Journal of Molecular Biology 262: 732-745、およびＡｈｏ（Honegger and Pluckthun 2001 Journal of Molecular Biology 309: 657-670が挙げられる。

【００２８】

本明細書で使用される「抗体（ａｎｔｉｂｏｄｙ）」および「抗体（ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ）」および関連する用語は、抗原に特異的に結合するインタクトな免疫グロブリンまたはその抗原結合性部分を指す。抗原結合性部分は、組換えＤＮＡ技法によって、またはインタクトな抗体の酵素的もしくは化学的切断によって作製することができる。抗原結合性部分としては、とりわけ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ドメイン抗体（ｄＡｂ）、および相補性決定領域（ＣＤＲ）断片、単鎖抗体（ｓｃＦｖ）、キメラ抗体、ダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）、トリアボディ、テトラボディ、および、ポリペプチドに特異的抗原結合を付与するために十分である、免疫グロブリンの少なくとも一部分を含有するポリペプチドが挙げられる。

【００２９】

抗体は、組換えによって作製された抗体および抗原結合性部分を包含する。抗体は、非ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および完全ヒト抗体を包含する。抗体は、単一特異性、多重特異性（例えば、二重特異性、三重特異性およびより高次の特異性）を包含する。

抗体は、四量体抗体、軽鎖単量体、重鎖単量体、軽鎖二量体、重鎖二量体を包含する。抗体は、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片、Ｆａｂ‘断片およびＦａｂ断片を包含する。抗体は、単一ドメイン抗体、一価抗体、単鎖抗体、単鎖可変性断片（ｓｃＦｖ）、ラクダ化抗体、アフィボディ（ａｆｆｉｂｏｄｙ）、ジスルフィド連結したＦｖ（ｓｄＦｖ）、抗イディオタイプ抗体（抗Ｉｄ）、ミニボディ（ｍｉｎｉｂｏｄｙ）を包含する。抗体は、モノクローナル集団およびポリクローナル集団を包含する。活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分を含む抗体様分子が本明細書に記載されている。

【００３０】

本明細書で使用される「抗原結合性ドメイン」、「抗原結合性領域」または「抗原結合性部位」および他の関連する用語は、抗原と相互作用し、抗原結合性タンパク質の抗原に対する特異性および親和性に寄与するアミノ酸残基（または他の部分）を含有する、抗原結合性タンパク質の部分を指す。それの抗原に特異的に結合する抗体に関しては、この部分は、そのＣＤＲドメインのうちの少なくとも１つの少なくとも一部を含む。抗ＥＧＦＲ抗体または抗ＣＤ３８抗体由来の抗原結合性ドメインが本明細書に記載されている。

【００３１】

「特異的結合」、「特異的に結合する」または「特異的に結合すること」という用語および他の関連する用語は、抗体または抗原結合性タンパク質または抗体断片に関して本明細書で使用される場合、抗原に、他の分子または部分よりも優先的に非共有結合または共有結合性により結合することを指す（例えば、抗体は、他の利用可能な抗原と比べて、特定の抗原に特異的に結合する）。一実施形態では、抗体は、抗原に10^{-5}Ｍもしくはそれ未満、または10^{-6}Ｍもしくはそれ未満、または10^{-7}Ｍもしくはそれ未満、または10^{-8}Ｍもしくはそれ未満、または10^{-9}Ｍもしくはそれ未満、または10^{-10}Ｍもしくはそれ未満、または10^{-11}Ｍもしくはそれ未満の解離定数K_Dで結合する場合、標的抗原に特異的に結合する。一実施形態では、それらの標的抗原（例えば、ＥＧＦＲまたはＣＤ３８抗原）に特異的に結合する、活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分が本明細書に記載されている。

【００３２】

一実施形態では、結合特異性を、ＥＬＩＳＡ、放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、電気化学発光アッセイ（ＥＣＬ）、免疫放射定量測定法（ＩＲＭＡ）、または酵素免疫アッセイ（ＥＩＡ）によって測定することができる。

【００３３】

一実施形態では、解離定数（K_D）を、ＢＩＡＣＯＲＥ表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）アッセイを使用して測定することができる。表面プラズモン共鳴とは、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変更を、例えば、ＢＩＡＣＯＲＥシステム（Ｂｉａｃｏｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ｄｉｖｉｓｉｏｎ ｏｆ ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を使用して検出することによってリアルタイム相互作用の分析を可能にする光学現象を指す。

【００３４】

「エピトープ」および関連する用語は、本明細書で使用される場合、抗原結合性タンパク質（例えば、抗体またはその抗原結合性部分）が結合する、抗原の部分を指す。エピトープは、抗原結合性タンパク質が結合する、２つまたはそれよりも多くの抗原の部分を含み得る。エピトープは、抗原または２つもしくはそれよりも多くの抗原の不連続な部分（例えば、抗原の一次配列では連続していないが、抗原の三次構造および四次構造に関しては、互いに、抗原結合性タンパク質が結合するのに十分に近くにあるアミノ酸残基）を含み得る。一般に、抗体の可変領域、特にＣＤＲがエピトープと相互作用する。一実施形態では、ＥＧＦＲまたはＣＤ３８抗原のエピトープに結合する、活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分が本明細書に記載されている。

【００３５】
本明細書で使用される「抗体断片」、「抗体部分」、「抗体の抗原結合性断片」、または「抗体の抗原結合性部分」および他の関連する用語は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合する、インタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、これだけに限定されないが、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）$_2$；Ｆｄ；およびＦｖ断片、ならびにｄＡｂ；ダイアボディ；直鎖抗体；単鎖抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）；ポリペプチドに特異的抗原結合を付与するために十分である、抗体の少なくとも一部分を含有するポリペプチドが挙げられる。抗体の抗原結合性部分は、組換えＤＮＡ技法によって、またはインタクトな抗体の酵素的もしくは化学的切断によって作製することができる。抗原結合性部分としては、とりわけ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ドメイン抗体（ｄＡｂ）、および相補性決定領域（ＣＤＲ）断片、キメラ抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、および、抗体断片に抗原結合特性を付与するために十分である、免疫グロブリンの少なくとも一部分を含有するポリペプチドが挙げられる。一実施形態では、抗原結合性断片は、本明細書に記載されている、それらの標的抗原（例えば、ＥＧＦＲまたはＣＤ３８抗原）に特異的に結合する活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分の断片を含む。

【００３６】
「Ｆａｂ」、「Ｆａｂ断片」という用語および他の関連する用語は、軽鎖可変領域（V_L）、軽鎖定常領域（C_L）、重鎖可変領域（V_H）、および第１の定常領域（C_{H1}）を含む一価断片を指す。Ｆａｂは、抗原に結合することが可能である。Ｆ（ａｂ’）$_2$断片は、ヒンジ領域においてジスルフィド橋によって連結した２つのＦａｂ断片を含む二価断片である。Ｆ（Ａｂ’）$_2$は抗原結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）を有する。Ｆｄ断片は、V_H領域およびC_{H1}領域を含む。Ｆｖ断片は、V_L領域およびV_H領域を含む。Ｆｖは抗原に結合し得る。ｄＡｂ断片は、V_Hドメイン、V_Lドメイン、またはV_HドメインもしくはV_Lドメインの抗原結合性断片を有する（米国特許第６，８４６，６３４号および同第６，６９６，２４５号；米国公開第２００２／０２５１２号、同第２００４／０２０２９９５号、同第２００４／００３８２９１号、同第２００４／０００９５０７号、同第２００３／００３９９５８号；およびWard et al., Nature 341: 544-546, 1989）。抗ＥＧＦＲ抗体または抗ＣＤ３８抗体由来の抗原結合性部分を含むＦａｂ断片が本明細書に記載されている。

【００３７】
単鎖抗体（ｓｃＦｖ）は、V_L領域とV_H領域がリンカー（例えば、合成アミノ酸残基の配列）を介して接合して、連続したタンパク質鎖を形成している抗体である。リンカーは、タンパク質鎖が折り畳まれ、一価抗原結合性部位を形成することが可能になるのに十分に長いことが好ましい（例えば、Bird et al., 1988、Science 242: 423-26およびHuston et al., 1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83を参照されたい）。抗ＥＧＦＲ抗体または抗ＣＤ３８抗体由来の抗原結合性部分を含む単鎖抗体が本明細書に記載されている。

【００３８】
ダイアボディは、２本のポリペプチド鎖を含む二価抗体であり、各ポリペプチド鎖が、同じ鎖上の２つのドメイン間での対合を可能にするには短すぎ、したがって、各ドメインが別のポリペプチド鎖上の相補的ドメインと対合することを可能にするリンカーによって接合したV_HドメインとV_Lドメインを含む（例えば、Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-48、およびPoljak et al., 1994, Structure 2: 1121-23を参照されたい）。ダイアボディの２本のポリペプチド鎖が同一である場合、それらの対合によって生じたダイアボディは、２つの同一の抗原結合性部位を有することになる。異なる配列を有するポリペプチド鎖を使用して、２種の異なる抗原結合性部位を有するダイアボディを作出することができる。同様に、トリボディおよびテトラボディは、それぞれ３本および４本のポリペプチド鎖を含み、それぞれ３つおよ

び４つの同じあり得るまたは異なり得る抗原結合性部位を形成している抗体である。ダイアボディ、トリボディおよびテトラボディ構築物は、本明細書に記載の抗ＥＧＦＲ抗体または抗ＣＤ３８抗体のいずれか由来の抗原結合性部分を使用して調製することができる。

【００３９】

「ヒト抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する１つまたは複数の可変領域および定常領域を有する抗体を指す。一実施形態では、可変ドメインおよび定常ドメインの全てがヒト免疫グロブリン配列に由来する（例えば、完全ヒト抗体）。これらの抗体は、様々なやり方で調製することができ、その例は、組換え方法体系によるもの、またはヒト重鎖および／または軽鎖をコードする遺伝子に由来する抗体を発現するように遺伝子改変されたマウスを目的の抗原で免疫化することによるものを含め、下に記載されている。完全ヒト抗ＥＧＦＲ抗体または抗ＣＤ３８抗体および抗原結合性タンパク質、またはその一部が本明細書に記載されている。

【００４０】

「ヒト化」抗体は、非ヒト種に由来する抗体の配列とは１つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、および／または付加によって異なる配列を有する抗体を指し、したがって、ヒト化抗体は、ヒト対象に投与された場合に、非ヒト種抗体と比較して、免疫応答を誘導する可能性が低く、かつ／または、重症度の低い免疫応答を誘導する。一実施形態では、非ヒト種抗体の重鎖および／または軽鎖のフレームワークおよび定常ドメイン内のある特定のアミノ酸を変異させて、ヒト化抗体を作製する。別の実施形態では、ヒト抗体由来の定常ドメイン（複数可）を非ヒト種の可変ドメイン（複数可）と融合する。別の実施形態では、非ヒト抗体の、ヒト対象に投与された場合に可能性がある免疫原性が低減するように、非ヒト抗体の１つまたは複数のＣＤＲ配列内の１つまたは複数のアミノ酸残基を変化させ、ここで、変化させるアミノ酸残基が抗体のその抗原への免疫特異的結合に重大なものではないか、または行われるアミノ酸配列の変化が保存的変化であり、したがって、ヒト化抗体の抗原への結合は非ヒト抗体の抗原への結合よりも著しくは悪化しない。ヒト化抗体の作出の仕方の例は、米国特許第６，０５４，２９７号、同第５，８８６，１５２号および同第５，８７７，２９３号に見いだすことができる。

【００４１】

本明細書で使用される「キメラ抗体」という用語および関連する用語は、第１の抗体由来の１つまたは複数の領域と、１つまたは複数の他の抗体由来の１つまたは複数の領域とを含有する抗体を指す。一実施形態では、ＣＤＲの１つまたは複数がヒト抗体に由来する。別の実施形態では、ＣＤＲの全てがヒト抗体に由来する。別の実施形態では、１つよりも多くのヒト抗体由来のＣＤＲを混合し、キメラ抗体において調和させる。例えば、キメラ抗体は、第１のヒト抗体の軽鎖由来のＣＤＲ１、第２のヒト抗体の軽鎖由来のＣＤＲ２およびＣＤＲ３、ならびに第３の抗体由来の重鎖由来のＣＤＲを含み得る。別の例では、ＣＤＲは、例えば、ヒトとマウス、またはヒトとウサギ、またはヒトとヤギなど、異なる種を起源とする。他の組合せも可能であることが当業者には理解されよう。

【００４２】

さらに、フレームワーク領域は、同じ抗体の１つ、ヒト抗体などの１つまたは複数の異なる抗体、またはヒト化抗体に由来し得る。キメラ抗体の一実施例では、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体と同一であるか、相同であるか、もしくはそれに由来するか、または、特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属し、一方、鎖の残りの部分（複数可）は、別の種由来の抗体と同一であるか、相同であるか、もしくはそれに由来するか、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する。所望の生物活性（すなわち、標的抗原に特異的に結合する能力）を示す、そのような抗体の断片も包含される。キメラ抗体は、本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分のいずれかの部分から調製することができる。

【００４３】

本明細書で使用される場合、「バリアント」ポリペプチドおよびポリペプチドの「バリ

アント」という用語は、参照ポリペプチド配列と比べてアミノ酸配列に対して１つまたは複数のアミノ酸残基が挿入、欠失および／または置換されたアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。ポリペプチドバリアントは、融合タンパク質を包含する。同様に、バリアントポリヌクレオチドは、別のポリヌクレオチド配列と比べてヌクレオチド配列に対する１つまたは複数のヌクレオチドの挿入、欠失および／または置換を伴うヌクレオチド配列を含む。ポリヌクレオチドバリアントは、融合ポリヌクレオチドを包含する。

【００４４】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドの「誘導体」という用語は、例えば、例えばポリエチレングリコール、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン）、リン酸化、およびグリコシル化など、別の化学的部分とのコンジュゲーションによって、化学修飾されたポリペプチド（例えば、抗体）である。別段の指定のない限り、「抗体」という用語は、２本の全長重鎖および２本の全長軽鎖を含む抗体に加えて、その誘導体、バリアント、断片、および変異タンパク質を包含し、その例は下に記載されている。

【００４５】

「Ｆｃ」または「Ｆｃ領域」という用語は、本明細書で使用される場合、抗体重鎖定常領域の、ヒンジ領域内またはヒンジ領域の後から始まり、重鎖のＣ末端で終わる部分を指す。Ｆｃ領域は、ＣＨ領域およびＣＨ３領域の少なくとも一部分を含み、ヒンジ領域の一部を含んでもよく、含まなくてもよい。それぞれがＦｃ領域の半分を有する２本のポリペプチド鎖が二量体化してＦｃ領域を形成し得る。Ｆｃ領域は、Ｆｃ細胞表面受容体および免疫補体系のいくつかのタンパク質に結合し得る。Ｆｃ領域は、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、抗体依存性ファゴサイトーシス（ＡＤＰ）、オプソニン化および／または細胞結合を含む２つまたはそれよりも多くの活性のうちの任意の１つまたは任意の組合せを含めたエフェクター機能を示す。Ｆｃ領域は、ＦｃγＲＩ（例えば、ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩ（例えば、ＣＤ３２）および／またはＦｃγＲＩＩＩ（例えば、ＣＤ１６ａ）を含めたＦｃ受容体に結合し得る。

【００４６】

「標識された抗体」という用語または関連する用語は、本明細書で使用される場合、検出のための、非標識のまたは検出可能な標識もしくは部分と接合した抗体およびそれらのその抗原結合性部分を指し、検出可能な標識または部分は、放射性、比色定量、抗原性、酵素的、検出可能なビーズ（例えば、磁気または電子密度の高い（例えば、金）ビーズなど）、ビオチン、ストレプトアビジンまたはプロテインＡである。これだけに限定されないが、放射性核種、蛍光剤、酵素、酵素基質、酵素補助因子、酵素阻害剤およびリガンド（例えば、ビオチン、ハプテン）を含めた種々の標識を使用することができる。本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分のいずれも非標識であってもよく、検出可能な標識または部分と接合することもできる。

【００４７】

本明細書で使用される「パーセント同一性」または「パーセント相同性」および関連する用語は、２つのポリペプチド配列間または２つのポリヌクレオチド配列間の類似性の定量的測定を指す。２つのポリペプチド配列間のパーセント同一性は、２つのポリペプチド配列のアラインメントを最適化するために導入する必要があり得るギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れた、２つのポリペプチド配列間で共有されるアラインメントされた位置における同一のアミノ酸の数の関数である。同様に、２つのポリヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、２つのポリヌクレオチド配列のアラインメントを最適化するために導入する必要があり得るギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れた、２つのポリヌクレオチド配列間で共有されるアラインメントされた位置における同一のヌクレオチドの数の関数である。２つのポリペプチド配列間または２つのポリヌクレオチド配列間の配列の比較およびパーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを使用して実現することができる。例えば、２つのポリペプチド配列または２つのポリヌクレオチド配列の「パーセント同一性」または「パーセント相同性」は、ＧＡＰコンピュータプログラ

ム（ＧＣＧ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｐａｃｋａｇｅ、バージョン１０．３（Ａｃｃｅｌｒｙｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．）の一部）を使用し、そのデフォルトパラメータを使用して配列を比較することによって決定することができる。試験配列に関して「Ｙと少なくともＸ％同一の配列を含む」などの表現は、配列Ｙと上記の通りアラインメントした場合に、試験配列がＹの残基の少なくともＸ％と同一の残基を含むことを意味する。

【００４８】

一実施形態では、試験抗体のアミノ酸配列は、本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分を構成するポリペプチドのアミノ酸配列のいずれかと類似しているが、同一ではない可能性がある。試験抗体とポリペプチドの類似性は少なくとも９５％であり得、または、本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分を構成するポリペプチドのいずれかと９６％もしくは少なくとも９６％同一であり得、または９７％もしくは少なくとも９７％同一であり得、または９８％もしくは少なくとも９８％同一であり得、または９９％もしくは少なくとも９９％同一であり得る。一実施形態では、類似のポリペプチドは、重鎖および／または軽鎖内にアミノ酸置換を含有し得る。一実施形態では、アミノ酸置換は、１つまたは複数の保存的アミノ酸置換を含む。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の化学特性（例えば、電荷または疎水性）を有する側鎖（Ｒ基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されたものである。一般に、保存的アミノ酸置換によりタンパク質の機能特性は実質的に変化しない。２つまたはそれよりも多くのアミノ酸配列が互いに保存的置換によって異なる場合、パーセント配列同一性または類似性の程度を上向きに調整して置換の保存的性質を補正することができる。この調整を行う手段は当業者に周知である。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるPearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331を参照されたい。化学的特性が同様である側鎖を有するアミノ酸の群の例としては、（１）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン；（２）脂肪族ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン；（３）アミドを含有する側鎖：アスパラギンおよびグルタミン；（４）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン；（５）塩基性側鎖：リシン、アルギニン、およびヒスチジン；（６）酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに（７）硫黄含有側鎖：システインおよびメチオニン、が挙げられる。

【００４９】

抗体は、様々な抗原特異性を有する免疫グロブリンを含有する血清または血漿などの供給源から得ることができる。そのような抗体をアフィニティー精製に供すると、それらを特定の抗原特異性について富化することができる。そのような富化された抗体の調製物は、通常、約１０％未満の、特定の抗原に対して特異的な結合活性を有する抗体で構成される。これらの調製物を数ラウンドのアフィニティー精製に供することにより、その抗原に対して特異的な結合活性を有する抗体の割合を増大させることができる。このように調製された抗体は、多くの場合、「単一特異性」と称される。単一特異性抗体調製物は、約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、または９９．９％の、特定の抗原に対して特異的な結合活性を有する抗体で構成され得る。抗体は、下記の組換え核酸技術を使用して作製することができる。

【００５０】

本明細書で使用される「ベクター」および関連する用語は、外来遺伝子材料（例えば、核酸導入遺伝子）に作動可能に連結することができる核酸分子（例えば、ＤＮＡまたはＲＮＡ）を指す。ベクターを、外来遺伝子材料を細胞（例えば、宿主細胞）に導入するためのビヒクルとして使用することができる。ベクターは、導入遺伝子をベクターに挿入するための少なくとも１つの制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含み得る。ベクターは、ベク

ター－導入遺伝子構築物を有する宿主細胞の選択を補助するための抗生物質耐性または選択可能な特徴を付与する少なくとも１つの遺伝子配列を含み得る。ベクターは、一本鎖または二本鎖核酸分子であり得る。ベクターは、直鎖状または環状核酸分子であり得る。ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓを使用する遺伝子編集法に使用されるドナー核酸はベクターの１つの型であり得る。ベクターの１つの型は「プラスミド」であり、これは、導入遺伝子に連結することができ、宿主細胞において複製すること、ならびに導入遺伝子を転写および／または翻訳することが可能である、直鎖状または環状二本鎖染色体外ＤＮＡ分子を指す。ウイルスベクターは、一般には、導入遺伝子に連結することができるウイルスＲＮＡまたはＤＮＡ骨格配列を含有する。ウイルス骨格配列を、感染不能であるが、ウイルス骨格および共連結された導入遺伝子の宿主細胞のゲノムへの挿入は保持されるように改変することができる。ウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、バキュロウイルスベクター、パポバウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクターおよびエプスタイン・バーウイルスベクターが挙げられる。ある特定のベクターは、それらが導入された宿主細胞において自律複製することが可能である（例えば、細菌複製開始点を含む細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞に導入されると宿主細胞のゲノム内に組み込まれ、それにより、宿主ゲノムと一緒に複製される。

【００５１】

「発現ベクター」は、誘導性および／または構成的プロモーターならびにエンハンサーなどの１つまたは複数の調節配列を含有し得る、ベクターの型である。発現ベクターは、リボソーム結合性部位および／またはポリアデニル化部位を含み得る。発現ベクターは、１つまたは複数の複製開始点配列を含み得る。調節配列は、宿主細胞に形質導入される、発現ベクターと連結した導入遺伝子の転写、または転写および翻訳を方向づけるものである。調節配列（複数可）により、導入遺伝子の発現のレベル、タイミングおよび／または位置を制御することができる。調節配列は、例えば、その効果を、導入遺伝子に対して直接、または１つもしくは複数の他の分子（例えば、調節配列および／または核酸に結合するポリペプチド）の作用を通じて発揮し得る。調節配列は、ベクターの一部であり得る。調節配列のさらなる例は、例えば、Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif.およびBaron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23: 3605-3606に記載されている。発現ベクターは、本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分のいずれかの少なくとも一部分をコードする核酸を含み得る。

【００５２】

導入遺伝子とベクターの間に、ベクターに含有される導入遺伝子配列の機能または発現を可能にする連関が存在する場合、導入遺伝子はベクターと「作動可能に連結」している。一実施形態では、調節配列が導入遺伝子の発現（例えば、発現のレベル、タイミング、または位置）に影響を及ぼす場合、導入遺伝子は調節配列と「作動可能に連結」している。

【００５３】

本明細書で使用される「トランスフェクトされた（ｔｒａｎｓｆｅｃｔｅｄ）」または「形質転換された（ｔｒａｎｓｆｏｒｍｅｄ）」または「形質導入された（ｔｒａｎｓｄｕｃｅｄ）」という用語または他の関連する用語は、宿主細胞に外因性核酸（例えば、導入遺伝子）が移入または導入されるプロセスを指す。「トランスフェクトされた（ｔｒａｎｓｆｅｃｔｅｄ）」または「形質転換された（ｔｒａｎｓｆｏｒｍｅｄ）」または「形質導入された（ｔｒａｎｓｄｕｃｅｄ）」宿主細胞は、外因性核酸（導入遺伝子）がトランスフェクト、形質転換または形質導入がされたものである。宿主細胞は、初代対象細胞およびその後代を包含する。本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体およ

び活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分のいずれかの少なくとも一部分をコードする外因性核酸を宿主細胞に導入することができる。本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分のいずれかの少なくとも一部分を含む発現ベクターを宿主細胞に導入することができ、宿主細胞は、本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分の少なくとも一部分を含むポリペプチドを発現し得る。

【００５４】

「宿主細胞」または「または宿主細胞の集団」という用語または関連する用語は、本明細書で使用される場合、外来（外因性または導入遺伝子）核酸が導入された細胞（またはその集団）を指す。外来核酸は、導入遺伝子に作動可能に連結した発現ベクターを含み得、宿主細胞を使用して、外来核酸（導入遺伝子）によってコードされる核酸および／またはポリペプチドを発現させることができる。宿主細胞（またはその集団）は培養細胞であってもよく、対象から抽出することもできる。宿主細胞（またはその集団）は、初代対象細胞、およびその後代を継代の数にかかわらず包含する。後代細胞は、親細胞と比較して同一の遺伝子材料を有する場合もあり、有さない場合もある。宿主細胞は後代細胞を包含する。一実施形態では、宿主細胞とは、本明細書に開示される抗体を発現するように任意のやり方で改変された、トランスフェクトされた、形質導入された、形質転換された、および／または操作された任意の細胞（その後代を含む）を記載するものである。一実施例では、宿主細胞（またはその集団）に、本明細書に記載の所望の抗体またはその抗原結合性部分をコードする核酸に作動可能に連結した発現ベクターを導入することができる。宿主細胞およびその集団は、宿主のゲノムに安定に組み込まれる発現ベクターを有し得る、または、染色体外発現ベクターを有し得る。一実施形態では、宿主細胞およびその集団は、数回の細胞分裂後に存在するか、または一過性に存在し、数回の細胞分裂後に消失する、染色体外ベクターを有し得る。

【００５５】

トランスジェニック宿主細胞は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮＳまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓを含む周知のデザイナーヌクレアーゼを含めたウイルスによらない方法を使用して調製することができる。ジンクフィンガーヌクレアーゼなどのゲノム編集技術を使用して、導入遺伝子を宿主細胞のゲノムに導入することができる。ジンクフィンガーヌクレアーゼは、工学的に操作されたジンクフィンガーモチーフ由来のＤＮＡ結合性ドメインと融合した制限エンドヌクレアーゼ（例えば、ＦｏｋＩ）の非特異的エンドヌクレアーゼドメインをそれぞれが含有する、キメラタンパク質の対を含む。ＤＮＡ結合性ドメインを、宿主のゲノム内の特定の配列に結合するように工学的に操作することができ、エンドヌクレアーゼドメインにより、二本鎖切断がなされる。ドナーＤＮＡは、導入遺伝子、例えば、本明細書に記載のＣＡＲまたはＤＡＲ構築物をコードする核酸のいずれか、および、宿主細胞のゲノム内の意図された挿入部位の両側の領域と相同な、両側に位置する配列を有する。宿主細胞のＤＮＡ修復機構により、相同ＤＮＡ修復による導入遺伝子の正確な挿入が可能になる。トランスジェニック哺乳動物宿主細胞は、ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用して調製されている（米国特許第９，５９７，３５７号、同第９，６１６，０９０号、同第９，８１６，０７４号および同第８，９４５，８６８号）。トランスジェニック宿主細胞は、正確な導入遺伝子挿入物を送達することができるＤＮＡ結合性ドメインと融合した非特異的エンドヌクレアーゼドメインを含むという点でジンクフィンガーヌクレアーゼと同様であるＴＡＬＥＮ（転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ）を使用して調製することができる。ジンクフィンガーヌクレアーゼと同様に、ＴＡＬＥＮでも宿主のＤＮＡに二本鎖切断を導入することができる。トランスジェニック宿主細胞は、ＣＲＩＳＰＲ（クラスター化された規則的な配置の短い回文配列リピート（Ｃｌｕｓｔｅｒｅｄ Ｒｅｇｕｌａｒｌｙ Ｉｎｔｅｒｓｐａｃｅｄ Ｓｈｏｒｔ Ｐａｌｉｎｄｒｏｍｉｃ Ｒｅｐｅａｔ））を使用して調製することができる。ＣＲＩＳＰＲでは、標的

特異的ドナーＤＮＡ組込みのためにガイドＲＮＡとカップリングしたＣａｓエンドヌクレアーゼを使用する。ガイドＲＮＡは、標的ＤＮＡ内のｇＲＮＡ結合性領域の上流の保存された多ヌクレオチド含有プロトスペーサー隣接モチーフ（ＰＡＭ）配列を含有し、宿主細胞標的部位とハイブリダイズし、そこでＣａｓエンドヌクレアーゼにより二本鎖標的ＤＮＡが切断される。ガイドＲＮＡを、特定の標的部位にハイブリダイズするように設計することができる。ジンクフィンガーヌクレアーゼおよびＴＡＬＥＮと同様に、ＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を使用して、挿入部位に対する相同性を有する、両側に位置する配列を有するドナーＤＮＡの部位特異的挿入を導入することができる。ゲノムを改変するために使用されるＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系の例は、例えば、米国特許第８，６９７，３５９号、同第１０，０００，７７２号、同第９，７９０，４９０号、および米国特許出願公開第ＵＳ２０１８／０３４６９２７号に記載されている。一実施形態では、トランスジェニック宿主細胞を、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系を使用して調製することができ、宿主標的部位は、ＴＲＡＣ遺伝子（Ｔ細胞受容体アルファ定常（Ｔ Ｃｅｌｌ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ａｌｐｈａ Ｃｏｎｓｔａｎｔ））であってよい。ドナーＤＮＡとしては、例えば、本明細書に記載のＣＡＲまたはＤＡＲ構築物をコードする核酸のいずれかを挙げることができる。電気穿孔、ヌクレオフェクションまたはリポフェクションを使用して、宿主細胞にドナーＤＮＡをジンクフィンガーヌクレアーゼ、ＴＡＬＥＮまたはＣＲＩＳＰＲ／Ｃａｓ系と共送達することができる。

【００５６】

宿主細胞は、原核生物、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉであってもよく、真核生物、例えば、単細胞真核生物（例えば、酵母もしくは他の真菌）、植物細胞（例えば、タバコもしくはトマト植物細胞）、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞、もしくは昆虫細胞）またはハイブリドーマであってもよい。一実施形態では、宿主細胞に、所望の抗体をコードする核酸に作動可能に連結した発現ベクターを導入し、それにより、トランスフェクトされた／形質転換された宿主細胞を生成することができ、そのトランスフェクトされた／形質転換された宿主細胞を、それらによる抗体の発現に適した条件下で培養し、必要に応じて、抗体を、トランスフェクトされた／形質転換された宿主細胞から回収するか（例えば、宿主細胞溶解物からの回収）または培養培地から回収する。一実施形態では、宿主細胞は、ＣＨＯ、ＢＨＫ、ＮＳ０、ＳＰ２／０、およびＹＢ２／０を含めた非ヒト細胞を含む。一実施形態では、宿主細胞は、ＨＥＫ２９３、ＨＴ－１０８０、Ｈｕｈ－７およびＰＥＲ．Ｃ６を含めたヒト細胞を含む。宿主細胞の例としては、サル腎臓細胞のＣＯＳ－７株（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １６５１）（Gluzman et al., 1981, Cell 23: 175を参照されたい）、Ｌ細胞、Ｃ１２７細胞、３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ ＣＣＬ １６３）、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞またはそれらの誘導体、例えば、血清を含まない培地で成長するＶｅｇｇｉｅ ＣＨＯおよび関連する細胞株（Rasmussen et al., 1998 Cytotechnology 28: 31を参照されたい）もしくはＤＨＦＲが欠損しているＣＨＯ ＤＸ－Ｂ １１株（Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20を参照されたい）、ＨｅＬａ細胞、ＢＨＫ（ＡＴＣＣ ＣＲＬ １０）細胞株、アフリカミドリザル腎細胞株ＣＶ１に由来するＣＶ１／ＥＢＮＡ細胞株（ＡＴＣＣ ＣＣＬ ７０）（McMahan et al., 1991、EMBO J. 10: 2821を参照されたい）、２９３、２９３ ＥＢＮＡまたはＭＳＲ ２９３などのヒト胎児由来腎臓細胞、ヒト表皮Ａ４３１細胞、ヒトＣｏｌｏ ２０５細胞、他の形質転換された霊長類細胞株、正常二倍体細胞、一次組織、一次外植片、ＨＬ－６０、Ｕ９３７、ＨａＫまたはジャーカット細胞のｉｎ ｖｉｔｒｏにおける培養から引き出された株化細胞が挙げられる。一実施形態では、宿主細胞は、Ｙ０、ＮＳ０またはＳｐ２０などのリンパ系細胞を含む。一実施形態では、宿主細胞は哺乳動物宿主細胞であるが、ヒト宿主細胞ではない。一般には、宿主細胞は、ポリペプチドコード核酸を用いて形質転換またはトランスフェクトすることができる培養細胞であり、次いで、そのポリペプチドコード核酸を宿主細胞において発現させることができる。「トランスジェニック宿主細胞」または「組換え宿主細胞」という句は、発現させる核酸を用いて形質転換ま

たはトランスフェクトされた宿主細胞を示すために使用することができる。宿主細胞はまた、核酸を含むが、調節配列が宿主細胞に導入され、その結果、その調節配列が核酸に作動可能に連結するまで、核酸を所望のレベルは発現しない細胞であってもよい。宿主細胞という用語は、特定の対象の細胞を指すだけでなく、そのような細胞の後代または潜在的な後代も指すことが理解される。次世代には、例えば変異または環境の影響に起因して、ある特定の改変が生じる可能性があるので、そのような後代は、実際は親細胞と同一ではない可能性があるが、それでも本明細書で使用されるこの用語の範囲に含まれる。１つまたは複数の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分をコードする少なくとも１つの核酸に作動可能に連結したベクター（例えば、発現ベクター）を有する宿主細胞または宿主細胞の集団が本明細書に記載されている。

【００５７】

本開示のポリペプチド（例えば、抗体および抗原結合性タンパク質）は、当技術分野で公知の任意の方法を使用して作製することができる。一実施例では、ポリペプチドを、ポリペプチドをコードする核酸配列（例えば、ＤＮＡ）を組換え発現ベクターに挿入し、それを宿主細胞に導入し、発現を促進する条件下で宿主細胞に発現させることによる組換え核酸法によって作製する。

【００５８】

組換え核酸操作のための一般的な技法は、例えば、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、Sambrook et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed., 1989、またはF. Ausubel et al., in Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing and Wiley-Interscience: New York, 1987)および定期改訂版に記載されている。ポリペプチドをコードする核酸（例えば、ＤＮＡ）を、哺乳動物遺伝子、ウイルス遺伝子、または昆虫遺伝子に由来する１つまたは複数の適切な転写または翻訳調節エレメントを有する発現ベクターに作動可能に連結する。そのような調節エレメントとしては、転写プロモーター、転写を制御するための必要に応じたオペレーター配列、適切なｍＲＮＡリボソーム結合性部位をコードする配列、ならびに転写および翻訳の終結を制御する配列が挙げられる。発現ベクターは、宿主細胞における複製能を付与する複製開始点を含み得る。発現ベクターは、トランスジェニック宿主細胞（例えば、形質転換体）の認識を容易にするために選択を付与する遺伝子を含み得る。

【００５９】

組換えＤＮＡはまた、タンパク質の精製のために有用であり得る任意の型のタンパク質タグ配列もコードし得る。タンパク質タグの例としては、これだけに限定されないが、ヒスチジンタグ、ＦＬＡＧタグ、ｍｙｃタグ、ＨＡタグ、またはＧＳＴタグが挙げられる。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞宿主での使用に適したクローニングおよび発現ベクターは、Cloning Vectors: A Laboratory Manual (Elsevier, N.Y., 1985)に見いだすことができる。

【００６０】

発現ベクター構築物を、宿主細胞に適した方法を使用して宿主細胞に導入することができる。これだけに限定されないが、電気穿孔；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、ＤＥＡＥ－デキストラン、または他の物質を使用するトランスフェクション；ウイルスによるトランスフェクション；非ウイルストランスフェクション；微粒子銃；リポフェクション；および感染（例えば、ベクターが感染因子である場合）を含めた核酸を宿主細胞に導入するための種々の方法が当技術分野で公知である。適切な宿主細胞としては、原核生物、酵母、哺乳動物細胞、または細菌細胞が挙げられる。

【００６１】

適切な細菌としては、グラム陰性またはグラム陽性生物体、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉまたはＢａｃｉｌｌｕｓ　ｓｐｐ．が挙げられる。Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ種由来であることが好ましい酵母、例えばＳ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅなども、ポリペプチドの作製のた

めに使用することができる。種々の哺乳動物または昆虫細胞培養系を使用して組換えタンパク質を発現させることもできる。昆虫細胞において異種タンパク質を産生するためのバキュロウイルス系は、Luckow and Summers (Bio/Technology, 6:47, 1988)によって概説されている。適切な哺乳動物宿主細胞株の例としては、内皮細胞、ＣＯＳ－７サル腎臓細胞、ＣＶ－１、Ｌ細胞、Ｃ１２７、３Ｔ３、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）、ヒト胎児由来腎臓細胞、ＨｅＬａ、２９３、２９３Ｔ、およびＢＨＫ細胞株が挙げられる。精製されたポリペプチドは、適切な宿主／ベクター系を培養して組換えタンパク質を発現させることによって調製される。多くの適用に関して、本明細書に開示されるポリペプチドの多くのサイズが小さいことから、Ｅ．ｃｏｌｉにおける発現が発現のため好ましい方法になる。次いで、タンパク質を培養培地または細胞抽出物から精製する。活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分のいずれもトランスジェニック宿主細胞によって発現させることができる。

【００６２】

本明細書に開示される抗体および抗原結合性タンパク質は、細胞翻訳系を使用して作製することもできる。そのような目的のためには、ｍＲＮＡを作製するため、および、利用される特定の無細胞系（哺乳動物もしくは酵母などの真核生物無細胞翻訳系または細菌などの原核生物無細胞翻訳系）におけるｍＲＮＡの無細胞翻訳を可能にするために、ポリペプチドをコードする核酸を、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおける転写が可能になるように改変しなければならない。

【００６３】

種々の本明細書に開示されるポリペプチドのいずれかをコードする核酸は、化学的に合成されたものであってよい。細胞における発現を改善するために、コドン使用を選択することができる。そのようなコドン使用は、選択される細胞型に依存する。Ｅ．ｃｏｌｉおよび他の細菌、ならびに哺乳動物細胞、植物細胞、酵母細胞および昆虫細胞に対する特殊化されたコドン使用パターンが開発されている。例えば、Mayfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003 100 (2): 438-42；Sinclair et al. Protein Expr. Purif. 2002 (1): 96-105；Connell N D. Curr. Opin. Biotechnol. 2001 12 (5): 446-9；Makrides et al. Microbiol. Rev. 1996 60 (3): 512-38；およびSharp et al. Yeast. 1991 7 (7): 657-78を参照されたい。

【００６４】

本明細書に記載の抗体および抗原結合性タンパク質を化学合成によって作製することもできる（例えば、Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. に記載されている方法によって）。タンパク質に対する修飾も化学合成によって生じさせることができる。

【００６５】

本明細書に記載の抗体および抗原結合性タンパク質は、タンパク質化学の分野で一般に知られているタンパク質の単離／精製方法によって精製することができる。非限定的な例としては、抽出、再結晶、塩析（例えば、硫酸アンモニウムもしくは硫酸ナトリウムを用いる）、遠心分離、透析、限外濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲル濾過、ゲル浸透クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動、向流分配またはこれらの任意の組合せが挙げられる。精製後、ポリペプチドを、これだけに限定されないが、濾過および透析を含めた当技術分野で公知の種々の方法のいずれかにより、異なる緩衝剤に交換して入れる、および／または濃縮することができる。

【００６６】

本明細書に記載の精製された抗体および抗原結合性タンパク質は、少なくとも６５％純粋である、少なくとも７５％純粋である、少なくとも８５％純粋である、より好ましくは少なくとも９５％純粋である、および最も好ましくは少なくとも９８％純粋であることが

好ましい。純度の厳密な数値にかかわらず、ポリペプチドは医薬製品として使用するために十分に純粋なものである。本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分のいずれかをトランスジェニック宿主細胞によって発現させ、次いで、当技術分野で公知の任意の方法を使用して約６５～９８％の純度または高レベルの純度まで精製することができる。

【００６７】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体および抗原結合性タンパク質は、翻訳後修飾をさらに含み得る。例示的な翻訳後タンパク質修飾としては、リン酸化、アセチル化、メチル化、ＡＤＰ－リボシル化、ユビキチン化、グリコシル化、カルボニル化、ＳＵＭＯ化、ビオチン化またはポリペプチド側鎖もしくは疎水性基の付加が挙げられる。結果として、修飾されたポリペプチドは、脂質、多糖または単糖、およびリン酸塩などの非アミノ酸要素を含有し得る。グリコシル化の好ましい形態は、１つまたは複数のシアル酸部分がポリペプチドにコンジュゲートする、シアリル化である。シアル酸部分により、溶解性および血清中半減期が改善される一方で、タンパク質の可能性のある免疫原性も低減する。Raju et al. Biochemistry. 2001 31; 40 (30): 8868-76を参照されたい。

【００６８】

一実施形態では、本明細書に記載の抗体および抗原結合性タンパク質を、抗体および抗原結合性タンパク質と非タンパク質性ポリマーの連結を含む可溶性ポリペプチドになるように改変することができる。一実施形態では、非タンパク質性ポリマーは、ポリエチレングリコール（「ＰＥＧ」）、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンを、米国特許第４，６４０，８３５号；同第４，４９６，６８９号；同第４，３０１，１４４号；同第４，６７０，４１７号；同第４，７９１，１９２号または同第４，１７９，３３７号に記載されている様式で含む。

【００６９】

ＰＥＧは、水溶性ポリマーであり、商業的に入手できる、または、当技術分野で周知の方法に従ったエチレングリコールの開環重合によって調製することができる（Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161）。「ＰＥＧ」という用語は、サイズまたはＰＥＧの末端の修飾にかかわらず、あらゆるポリエチレングリコール分子が包含されるように広範に使用され、式：Ｘ－Ｏ（CH_2CH_2O）$_n$－CH_2CH_2OH（１）（式中、ｎは２０～２３００であり、ＸはＨまたは末端修飾、例えば、$C_{1\sim4}$アルキルである）によって表すことができる。一実施形態では、ＰＥＧの一方の末端がヒドロキシまたはメトキシで終わる、すなわち、ＸはＨまたはCH_3である（「メトキシＰＥＧ」）。ＰＥＧは、結合反応のために必要である；分子の化学合成によって生じた；または、分子の部分の最適な距離のためのスペーサーである、さらなる化学基を含有し得る。さらに、そのようなＰＥＧは、連結し合わさった１つまたは複数のＰＥＧ側鎖からなり得る。１つよりも多くのＰＥＧ鎖を有するＰＥＧは、マルチアームまたは分枝ＰＥＧと称される。分枝ＰＥＧは、例えば、グリセロール、ペンタエリスリトール（pentaerythriol）、およびソルビトールを含めた種々のポリオールにポリエチレンオキシドを付加することによって調製することができる。例えば、４アーム分枝ＰＥＧをペンタエリスリトールおよびエチレンオキシドから調製することができる。分枝ＰＥＧは、例えば、ＥＰ－Ａ ０ ４７３ ０８４および米国特許第５，９３２，４６２号に記載されている。ＰＥＧの１つの型として、リシンの第一級アミノ基を介した連結した２つのＰＥＧ側鎖（ＰＥＧ２）が含まれる（Monfardini et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69）。

【００７０】

ＰＥＧ修飾されたポリペプチドの血清クリアランス速度を、修飾されていないポリペプチドのクリアランス速度と比べて、約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、またはさらには９０％モジュレートする（例えば、増大させるまたは減少させる）ことができる。ＰＥＧ修飾された抗体および抗原結合性タンパク質は、修飾

されていないポリペプチドの半減期と比べて増強された半減期（ｔ１／２）を有し得る。ＰＥＧ修飾されたポリペプチドの半減期を、修飾されていない抗体および抗原結合性タンパク質の半減期と比べて少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１２５％、１５０％、１７５％、２００％、２５０％、３００％、４００％または５００％、またはさらには１０００％増強することができる。一実施形態では、タンパク質半減期は、例えば、緩衝生理食塩溶液中または血清中など、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて決定される。他の実施形態では、タンパク質半減期は、動物の血清または他の体液中のタンパク質の半減期などの、ｉｎ　ｖｉｖｏ半減期である。

【００７１】

本開示は、本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分のいずれかを薬学的に許容される賦形剤との混和物として含む治療用組成物を提供する。賦形剤は、担体、安定剤および賦形剤を包含する。薬学的に許容される賦形剤の賦形剤としては、例えば、不活性な希釈剤もしくは充填剤（例えば、スクロースおよびソルビトール）、平滑剤、滑剤、および付着防止剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、シリカ、硬化植物油、またはタルク）が挙げられる。さらなる例としては、緩衝剤、安定化剤、保存剤、非イオン性界面活性剤、抗酸化剤および等張化剤（ｉｓｏｔｏｎｉｆｉｅｒ）が挙げられる。

【００７２】

治療用組成物およびそれらを調製するための方法は当技術分野で周知であり、例えば、"Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20th ed., ed. A. R. Gennaro A R., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.）に見いだされる。治療用組成物は、非経口投与用に製剤化することができ、例えば、賦形剤、滅菌水、生理食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、野菜起源の油、または水素化されたナフタレンを含有し得る。生体適合性、生分解性ラクチドポリマー、ラクチド／グリコリド共重合体、またはポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレン共重合体を使用して、本明細書に記載の抗体（またはその抗原結合性タンパク質）放出を制御することができる。ナノ粒子製剤（例えば、生分解性ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、リポソーム）を使用して、抗体（またはその抗原結合性タンパク質）の体内分布を制御することができる。他の潜在的に有用な非経口送達系としては、エチレン－酢酸ビニル共重合体粒子、浸透圧ポンプ、埋め込み型注入系、およびリポソームが挙げられる。製剤中の抗体（またはその抗原結合性タンパク質）の濃度は、投与される薬物の投薬量、および投与の経路を含めた多数の因子に応じて変動する。

【００７３】

本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分のいずれかを、必要に応じて、医薬品産業において一般に使用される無毒性の酸付加塩または金属錯体などの薬学的に許容される塩として投与することができる。酸付加塩の例としては、有機酸、例えば、酢酸、乳酸、パモン酸、マレイン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、安息香酸、パルミチン酸、スベリン酸、サリチル酸、酒石酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、またはトリフルオロ酢酸など；ポリマー酸、例えば、タンニン酸、カルボキシメチルセルロースなど；および無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などが挙げられる。金属錯体としては、亜鉛、鉄などが挙げられる。一実施例では、熱安定性を増大させるために、抗体（またはその抗原結合性タンパク質）を酢酸ナトリウムの存在下で製剤化する。

【００７４】

本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分のいずれかを、活性成分（複数可）を無毒性の薬学的に許容される賦形剤との混合物として含有する錠剤を含めた経口使用のために製剤化することができる。経口使用のための製剤はまた、咀嚼錠として

、または、活性成分を不活性な固体希釈剤と混合した硬ゼラチンカプセルとして、または、活性成分を水または油媒体と混合した軟ゼラチンカプセルとして、提供することもできる。

【００７５】

「対象」という用語は、本明細書で使用される場合、脊椎動物、哺乳動物および非哺乳動物を含めたヒトおよび非ヒト動物を指す。一実施形態では、対象は、ヒト、非ヒト霊長類、サル、類人猿、ネズミ科動物（例えば、マウスおよびラット）、ウシ亜科動物、ブタ、ウマ科動物、イヌ科動物、ネコ科動物、ヤギ、オオカミ、カエルまたは魚類であり得る。

【００７６】

「投与する（ａｄｍｉｎｉｓｔｅｒｉｎｇ）」、「投与された（ａｄｍｉｎｉｓｔｅｒｅｄ）」という用語および文法上の変形は、当業者に公知の様々な方法および送達系のいずれかを使用して薬剤を対象に物理的に導入することを指す。本明細書に開示される製剤の例示的な投与経路としては、例えば注射または注入による、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、脊髄または他の非経口投与経路が挙げられる。「非経口投与」という句は、本明細書で使用される場合、通常は注射による、経腸および局所投与以外の投与形式を意味し、それらとして、これだけに限定することなく、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、リンパ内、病巣内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および注入、ならびにｉｎ　ｖｉｖｏ電気穿孔が挙げられる。一実施形態では、製剤を注射によらない（ｎｏｎ－ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ）経路によって、例えば、経口的に投与する。他の注射によらない経路としては、局所、表皮または粘膜投与経路、例えば、鼻腔内、膣内、直腸内、舌下または局所が挙げられる。投与はまた、例えば、１回、複数回、および／または１つもしくは複数の延長期間にわたって実施することができる。本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分のいずれかを、当技術分野で公知の方法および送達経路を使用して対象に投与することができる。

【００７７】

「有効量」、「治療有効量」または「有効用量」という用語または関連する用語は、互換的に使用され得、対象に投与された場合に、腫瘍またはがん抗原の発現に関連する疾患または障害の測定可能な改善または予防をもたらすために十分である、活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体および活性化可能な遮蔽性部分を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）またはその抗原結合性部分の量を指す。本明細書で提供される抗体を単独でまたは組合せで使用する場合の治療有効量は、抗体および組合せの相対的な活性（例えば、細胞成長の阻害に関して）に応じて変動し、また、処置される対象および疾患状態、対象の体重および年齢および性別、対象の疾患状態の重症度、投与様式などに依存し、当業者が容易に決定することができる。

【００７８】

一実施形態では、治療有効量は、処置される対象および処置される障害のある特定の態様に依存し、当業者が公知の技法を使用して確認することができる。一般に、ポリペプチドは、１日当たり約０．０１ｇ／ｋｇ～約５０ｍｇ／ｋｇ、好ましくは１日当たり０．０１ｍｇ／ｋｇ～約３０ｍｇ／ｋｇ、最も好ましくは１日当たり０．１ｍｇ／ｋｇ～約２０ｍｇ／ｋｇで投与される。ポリペプチドを毎日（例えば、１日１回、２回、３回、または４回）または好ましくはより低頻度で（例えば、１週間に１回、２週間に１回、３週間に１回、月に１回、または年に４回）投与することができる。さらに、当技術分野で公知の通り、年齢ならびに体重、全体的な健康、性別、食事、投与時間、薬物相互作用、および疾患の重症度に対する調整が必要であり得る。

【００７９】

本開示は、１つまたは複数の腫瘍関連抗原の発現に関連する疾患を有する対象を処置するための方法を提供する。疾患は、腫瘍関連抗原、例えば、ＥＧＦＲまたはＣＤ３８抗原

などを発現するがんまたは腫瘍細胞を含む。一実施形態では、がんまたは腫瘍は、前立腺、乳房、卵巣、頭頸部、膀胱、皮膚、結腸直腸、肛門、直腸、膵臓、肺（非小細胞肺がんおよび小細胞肺がんを含む）、平滑筋腫、脳、神経膠腫、神経膠芽腫、食道、肝臓、腎臓、胃、結腸、子宮頸部、子宮、子宮内膜、外陰部、喉頭、膣、骨、鼻腔、副鼻腔、上咽頭、口腔、中咽頭、喉頭、下咽頭、唾液腺、尿管、尿道、陰茎および精巣のがんを含む。

【００８０】

一実施形態では、がんは、白血病、リンパ腫、骨髄腫およびＢ細胞リンパ腫を含めた血液がんを含む。血液のがんとしては、多発性骨髄腫（ＭＭ）、バーキットリンパ腫（ＢＬ）を含めた非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病（Ｂ－ＣＬＬ）、全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）、Ｂ細胞およびＴ細胞急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、濾胞性リンパ腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、マントル細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫（ＨＬ）、形質細胞骨髄腫、前駆Ｂリンパ芽球性白血病／リンパ腫、形質細胞腫、巨細胞骨髄腫、形質細胞骨髄腫、重鎖骨髄腫、軽鎖またはベンス・ジョーンズ骨髄腫、リンパ腫様肉芽腫症、移植後リンパ増殖性障害、免疫調節障害、関節リウマチ、重症筋無力症、特発性血小板減少性紫斑病、抗リン脂質症候群、シャーガス病、グレーブス病、ウェゲナー肉芽腫症、結節性多発動脈炎、シェーグレン症候群、尋常性天疱瘡、強皮症、多発性硬化症、抗リン脂質症候群、ＡＮＣＡ関連血管炎、グッドパスチャー病、川崎病、自己免疫性溶血性貧血、および急速進行性糸球体腎炎、重鎖病、原発性または免疫細胞関連アミロイドーシス、および意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症が挙げられる。

【００８１】

「タンデム」という用語は、ポリペプチド鎖またはタンパク質複合体内の領域、例えばＦａｂ領域などに関して本明細書で使用される場合、Ｆａｂ領域の間に異なる領域（例えば、Ｆｃ領域）が介在せずに、領域がヘッドトゥーテールに配置されていることを意味する。タンデムなＦａｂ領域は、リンカーによって隔てられていてもよい。図１に例示されている例示的な構造はタンデムなＦａｂ領域を含む。

【００８２】

「非タンデム」という用語は、ポリペプチド鎖またはタンパク質複合体内の領域、例えばＦａｂ領域などに関して本明細書で使用される場合、領域が「タンデムな」配置にないことを意味する。図３に例示されている例示的な構造は非タンデムＦａｂ領域を含む。

【００８３】

活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質

本開示は、第１の重鎖可変領域および第１の軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合性ドメインを少なくとも含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、（ｉ）第１の重鎖可変領域が、第１の遮蔽性部分と、第１のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉ）第１の軽鎖可変領域が、第２の遮蔽性部分と、第２のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉｉ）第１および第２の遮蔽性部分が、共有結合を伴わずに互いに会合して、第１の二量体化した遮蔽性複合体を形成しており、（ｉｖ）個々の第１および第２の遮蔽性部分が、第１の抗原結合性ドメインには特異的に結合せず、（ｖ）第１の二量体化した遮蔽性複合体が、第１の抗原結合性ドメインには特異的に結合しない、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分が、第１の抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を低減するように互いに会合している。一実施形態では、第１のペプチドリンカーは、第１の切断可能部位を含む。一実施形態では、第２のペプチドリンカーは、第２の切断可能部位を含む。

【００８４】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、第２の重鎖可変領域および第２の軽鎖可変領域を含む第２の抗原結合性ドメインをさらに含み、ここで、（ｉ）第２の重鎖可変領域は、第３の遮蔽性部分と、第３のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉ）第２の軽鎖可変領域は、第４の遮蔽性部分と、第４のペプチドリンカ

ーを介して接合しており、（ｉｉｉ）第３および第４の遮蔽性部分は、共有結合を伴わずに互いに会合して、第２の二量体化した遮蔽性複合体を形成しており、（ｉｖ）個々の第３および第４の遮蔽性部分は、第２の抗原結合性ドメインには特異的に結合せず、（ｖ）第２の二量体化した遮蔽性複合体は、第２の抗原結合性ドメインには特異的に結合しない。一実施形態では、第３および第４の遮蔽性部分が、第２の抗原結合性ドメインと、第１の抗原結合性ドメインが結合する標的抗原と比較して同じまたは異なる標的抗原であり得るその標的抗原との結合を低減するように互いに会合している。一実施形態では、第３のペプチドリンカーは、第３の切断可能部位を含む。一実施形態では、第４のペプチドリンカーは、第４の切断可能部位を含む。

【００８５】

一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の切断可能部位は、プロテアーゼ、エステラーゼ、還元条件、または酸化条件を含む切断条件で切断可能である。一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の切断可能部位は、同じまたは異なる切断条件で切断可能である。一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の切断可能部位は、腫瘍微小環境中に存在するプロテアーゼで切断可能である、または、腫瘍微小環境中に存在する還元条件もしくは酸化条件で切断可能である。一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の切断可能部位は、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である。

【００８６】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を化学的リンカーによって毒素と接合し、それにより、免疫コンジュゲートを形成する。一実施形態では、毒素を化学的リンカーと接合し、今度はその化学的リンカーを、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のリシン残基と、リシンの側鎖とアミド結合を形成することによって接合する。一実施形態では、米国特許第９，９８１，０４６号に記載されている方法および化学反応に従って、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のリシン残基をリンカーと選択的に接合する。一実施形態では、毒素は、細胞および組織に対して細胞傷害性である。一実施形態では、免疫コンジュゲートを使用して、毒素を標的細胞または組織（例えば、標的腫瘍）に送達することができる。

【００８７】

本開示は、第１の重鎖可変領域および第１の軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合性ドメインを少なくとも含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、（ｉ）第１の重鎖可変領域のＮ末端が、第１の遮蔽性部分と、第１の切断可能部位を有する第１のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉ）第１の軽鎖可変領域のＮ末端が、第２の遮蔽性部分と、第２の切断可能部位を有する第２のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉｉ）第１および第２の遮蔽性部分が、ジスルフィド結合を伴わずに互いに会合して、第１の二量体化した遮蔽性複合体を形成しており、（ｉｖ）第１および第２の遮蔽性部分が、少なくとも第１の抗原結合性ドメインには特異的に結合せず、（ｖ）第１の二量体化した遮蔽性複合体が、少なくとも第１の抗原結合性ドメインには特異的に結合せず、（ｖｉ）第１の切断可能部位が、第１のプロテアーゼで切断可能であり（例えば、第１のプロテアーゼは腫瘍関連プロテアーゼを含む）、（ｖｉｉ）第２の切断可能部位が、第２のプロテアーゼで切断可能であり（例えば、第２のプロテアーゼは腫瘍関連プロテアーゼを含む）、第１および第２の切断可能部位が、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分が、第１の抗原結合性ドメインの、その標的抗原に結合する能力を低下させるように互いに会合している。一実施形態では、第１の組換えポリペプチドは、第１の遮蔽性部分と接合した第１のペプチドリンカーと接合した第１の重鎖可変領域を含む。一実施形態では、第２の組換えポリペプチドは、第２の遮蔽性部分と接合した第２のペプチドリンカーと接合した第１の軽鎖可変領域を含む。

【００８８】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、第２の重鎖可変領

域および第２の軽鎖可変領域を含む第２の抗原結合性ドメインをさらに含み、ここで、（ｉ）第２の重鎖可変領域のＮ末端は、第３の遮蔽性部分と、第３の切断可能部位を有する第３のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉ）第２の軽鎖可変領域のＮ末端は、第４の遮蔽性部分と、第４の切断可能部位を有する第４のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉｉ）第３および第４の遮蔽性部分は、ジスルフィド結合を伴わずに互いに会合して、第２の二量体化した遮蔽性複合体を形成しており、（ｉｖ）第３および第４の遮蔽性部分は、第２の抗原結合性ドメインには特異的に結合せず、（ｖ）第２の二量体化した遮蔽性複合体は、第２の抗原結合性ドメインに特異的に結合し、（ｖｉ）第３の切断可能部位は、第３のプロテアーゼで切断可能であり（例えば、第３のプロテアーゼは腫瘍関連プロテアーゼを含む）、（ｖｉｉ）第４の切断可能部位は、第４のプロテアーゼで切断可能であり（例えば、第４のプロテアーゼは腫瘍関連プロテアーゼを含む）、ここで、第３および第４の切断可能部位は、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第３および第４の遮蔽性部分が、第２の抗原結合性ドメインの、その標的抗原に結合する能力を低下させるように互いに会合している。一実施形態では、第３の組換えポリペプチドは、第３の遮蔽性部分と接合した第３のペプチドリンカーと接合した第２の重鎖可変領域を含む。一実施形態では、第４の組換えポリペプチドは、第４の遮蔽性部分と接合した第４のペプチドリンカーと接合した第２の軽鎖可変領域を含む。

【００８９】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、標的抗原に結合する（例えば、単一特異性）ＩｇＧクラス抗体（例えば、図１）を含む。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、２種の標的抗原に結合する（例えば、二重特異性）ＩｇＧクラス抗体（例えば、図２）を含む。一実施形態では、二重特異性抗体は、ＩｇＧ様構造を有する（例えば、Ｕ．Ｓ．２０１１／０２６３８２７からのＤＶＤ－Ｉｇ）。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む（例えば、図３）（例えば、２０１９年３月１１日に出願された「Ｄｉｍｅｒｉｃ　Ａｎｔｉｇｅｎ　Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ　（ＤＡＲ）」という表題のＰＣＴ／ＵＳ２０１９／２１６８１を参照されたい。

【００９０】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を化学的リンカーによって毒素と接合し、それにより、免疫コンジュゲートを形成する。一実施形態では、毒素を化学的リンカーと接合し、今度はその化学的リンカーを、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のリシン残基と、リシンの側鎖とアミド結合を形成することによって接合する。一実施形態では、米国特許第９，９８１，０４６号に記載されている方法および化学反応に従って、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のリシン残基をリンカーと選択的に接合する。一実施形態では、毒素は、細胞および組織に対して細胞傷害性である。一実施形態では、免疫コンジュゲートを使用して、毒素を標的細胞または組織（例えば、標的腫瘍）に送達することができる。

【００９１】

ＩｇＧ様分子を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質

本開示は、（ａ）第１の重鎖可変領域および第１の軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合性ドメイン、ならびに（ｂ）第２の重鎖可変領域および第２の軽鎖可変領域を含む第２の抗原結合性ドメインを有するＩｇＧ型抗体を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、（ｉ）第１の重鎖可変領域のＮ末端が、第１の遮蔽性部分と、第１の切断可能部位を有する第１のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉ）第１の軽鎖可変領域のＮ末端が、第２の遮蔽性部分と、第２の切断可能部位を有する第２のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉｉ）第１および第２の遮蔽性部分が、ジスルフィド結合を伴わずに互いに会合しており、（ｉｖ）第１および第２の遮蔽性部分が、第１の抗原結合性ドメインには特異的に結合せず、（ｖ）第１の切断可能部位が、第１のプロテアーゼで切断可能であり、（ｖｉ）第２の切断可能部位が、第２のプロテアーゼで切断可能であり、（ｖｉｉ）第２の重鎖可変領域のＮ末端が、第３の遮蔽性部分と、第３の切

断可能部位を有する第３のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｖｉｉｉ）第２の軽鎖可変領域のＮ末端が、第４の遮蔽性部分と、第４の切断可能部位を有する第４のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｘ）第３および第４の遮蔽性部分が、ジスルフィド結合を伴わずに互いに会合しており、（ｘ）第３および第４の遮蔽性部分が、第２の抗原結合性ドメインには特異的に結合せず、（ｘｉ）第３の切断可能部位が、第３のプロテアーゼで切断可能であり、（ｘｉｉ）第４の切断可能部位が、第４のプロテアーゼで切断可能であり、第１、第２、第３および第４の切断可能部位が、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。

【００９２】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、標的抗原に結合する（例えば、単一特異性）ＩｇＧクラス抗体（例えば、図１）を含む。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、２種の標的抗原に結合する（例えば、二重特異性）ＩｇＧクラス抗体（例えば、図２）を含む。

【００９３】

一実施形態では、第１および第３の遮蔽性部分のＣ末端は、それぞれ、第１および第３のペプチドリンカーのＮ末端と接合している。一実施形態では、第１および第３のペプチドリンカーのＣ末端は、それぞれ、第１および第２の重鎖可変領域のＮ末端と接合している。

【００９４】

一実施形態では、第２および第４の遮蔽性部分のＣ末端は、それぞれ、第２および第４のペプチドリンカーのＮ末端と接合している。一実施形態では、第２および第４のペプチドリンカーのＣ末端は、それぞれ、第１および第２の軽鎖可変領域のＮ末端と接合している。

【００９５】

一実施形態では、ＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、標的抗原に結合し得る（例えば、単一特異性抗体である）、または２種の異なる標的抗原に結合し得る（例えば、二重特異性抗体である）。

【００９６】

一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分が、第１の抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を低減するように互いに会合している。一実施形態では、第３および第４の遮蔽性部分が、第２の抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を低減するように互いに会合している。

【００９７】

一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４のプロテアーゼは、同じ腫瘍によって、または異なる腫瘍によって産生される。

【００９８】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を化学的リンカーによって毒素と接合する。

【００９９】

本開示は、ＩｇＧ型抗体ならびに少なくとも第１および第２の遮蔽性部分を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分は、ならびに／または第３および第４の遮蔽性部分は、互いに会合している（二量体化している）場合、抗原結合性タンパク質の、その標的抗原に結合する能力に干渉する（それを妨害する）。第１および第２の遮蔽性部分は、ならびに／または第３および第４の遮蔽性部分は、互いに会合している（二量体化している）場合、抗原結合性タンパク質とその標的抗原の結合を立体的妨害によって遮断し得る。

【０１００】

一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分は、ならびに／または第３および第４の遮蔽性部分は、共有結合を形成せずに（例えば、ジスルフィド結合もグルタミン転移結合もなしで）互いに会合している（二量体化する）ポリペプチドを含む。第１および第２の

遮蔽性部分は、ならびに／または第３および第４の遮蔽性部分は、イオン相互作用、水素結合、双極子－双極子相互作用、親水性相互作用、疎水性相互作用、親和性結合、またはファンデルワールス力が関与する結合もしくは会合を含めた非共有結合性の相互作用によって互いに会合し得る（二量体化し得る）ポリペプチドを含む。

【０１０１】

一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分（対をなす第１および第２の遮蔽性部分）は、または第３および第４の遮蔽性部分（対をなす第３および第４の遮蔽性部分）は、ホモ二量体またはヘテロ二量体として互いに会合している。

【０１０２】

一実施形態では、遮蔽性部分の１つを、ホール構造を有するように工学的に操作される別の遮蔽性部分とのホモ二量体化またはヘテロ二量体化に好都合になるように、鎖間の立体的な相補性構造を形成するノブ構造を有するように工学的に操作することができる。

【０１０３】

本開示は、二量体化した立体配置にある遮蔽性部分の一方または両方が、新しい鎖間の塩橋を創出する１つまたは複数の変異を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、１つの遮蔽性部分のトレオニン残基をグルタミン酸に置き換え、別の遮蔽性部分の対応する位置のアスパラギンをリシンに置き換え、それにより、鎖間の塩橋を創出することができる。

【０１０４】

一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の遮蔽性部分は、免疫グロブリン重鎖定常領域に由来する、例えば、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロン重鎖に由来する。一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の遮蔽性部分は、ガンマ免疫グロブリン定常領域（例えば、ＣＬ、ＣＨ１、ＣＨ２またはＣＨ３）に由来する。

【０１０５】

一実施形態では、第１もしくは第２、または第３もしくは第４の遮蔽性部分は、重鎖定常領域（ＣＨ１）を含む。一実施形態では、第２もしくは第１、または第４もしくは第３の遮蔽性部分は、カッパまたはラムダ軽鎖定常領域（ＣＬカッパまたはＣＬラムダ）を含む。一実施形態では、第１の遮蔽性部分は重鎖定常領域（ＣＨ１）を含み、第２の遮蔽性部分はカッパまたはラムダ軽鎖定常領域（ＣＬカッパまたはＣＬラムダ）を含む。一実施形態では、第１の遮蔽性部分はカッパまたはラムダ軽鎖定常領域（ＣＬカッパまたはＣＬラムダ）を含み、第２の遮蔽性部分は重鎖定常領域（ＣＨ１）を含む。一実施形態では、第３の遮蔽性部分は重鎖定常領域（ＣＨ１）を含み、第４の遮蔽性部分はカッパまたはラムダ軽鎖定常領域（ＣＬカッパまたはＣＬラムダ）を含む。一実施形態では、第３の遮蔽性部分はカッパまたはラムダ軽鎖定常領域（ＣＬカッパまたはＣＬラムダ）を含み、第４の遮蔽性部分は重鎖定常領域（ＣＨ１）を含む。一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の遮蔽性部分は、配列番号２１、２２または２３のアミノ酸配列を有するＣＨ１、ＣＬ（カッパ）またはＣＬ（ラムダ）を含む。種々の遮蔽性部分のアミノ酸配列の一覧については表１および２も参照されたい。

【０１０６】

一実施形態では、第１もしくは第２、または第３もしくは第４の遮蔽性部分は、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４ガンマ重鎖定常領域、例えば、ＣＨ３を含む。一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分は、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４ガンマ重鎖定常領域ＣＨ３を含む。一実施形態では、第３および第４の遮蔽性部分は、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４ガンマ重鎖定常領域ＣＨ３を含む。一実施形態では、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４ガンマ重鎖定常領域ＣＨ３を含む、遮蔽性部分の１つを、ホールまたはノブ構造を有するように工学的に操作されるＩｇＧ１またはＩｇＧ４ガンマ重鎖定常領域ＣＨ３を含む別の遮蔽性部分との二量体化（例えば、ホモ二量体化）に好都合になるように、鎖間の立体的な相補性構造を形成するノブまたはホール構造を有するように工学的に操作する。一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の遮蔽性部分は、配列番号２４、２５、３０または３１のアミノ酸

配列を有するＣＨ３（ＩｇＧ１またはＩｇＧ４）を含む。種々の遮蔽性部分のアミノ酸配列の一覧については表１および２も参照されたい。

【０１０７】

一実施形態では、遮蔽性部分の少なくとも１つは、免疫グロブリン重鎖定常領域に由来し、活性化可能な遮蔽された抗体の重鎖可変領域と接合している。一実施形態では、遮蔽性部分の少なくとも１つは、免疫グロブリン重鎖定常領域に由来し、活性化可能な遮蔽された抗体の軽鎖可変領域と接合している。

【０１０８】

一実施形態では、第１および第２、または第３および第４の遮蔽性部分は、Ｔ細胞受容体アルファ（α）およびベータ（β）定常領域に由来する。一実施形態では、第１の遮蔽性部分はＴ細胞受容体アルファ（α）定常領域を含み、第２の遮蔽性部分はＴ細胞受容体ベータ（β）定常領域を含む。一実施形態では、第１の遮蔽性部分はＴ細胞受容体ベータ（β）定常領域を含み、第２の遮蔽性部分はＴ細胞受容体アルファ（α）定常領域を含む。一実施形態では、第３の遮蔽性部分はＴ細胞受容体アルファ（α）定常領域を含み、第４の遮蔽性部分はＴ細胞受容体ベータ（β）定常領域を含む。一実施形態では、第３の遮蔽性部分はＴ細胞受容体ベータ（β）定常領域を含み、第４の遮蔽性部分はＴ細胞受容体アルファ（α）定常領域を含む。

【０１０９】

一実施形態では、遮蔽性部分の少なくとも１つは、Ｔ細胞受容体アルファ（α）またはベータ（β）定常領域に由来し、活性化可能な遮蔽された抗体の重鎖可変領域と接合している。一実施形態では、遮蔽性部分の少なくとも１つは、Ｔ細胞受容体ベータ（β）またはアルファ（α）定常領域に由来し、活性化可能な遮蔽された抗体の軽鎖可変領域と接合している。一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の遮蔽性部分は、配列番号２８または２９のアミノ酸配列を有するＴ細胞受容体アルファ（α）またはベータ（β）定常領域を含む。種々の遮蔽性部分のアミノ酸配列の一覧については表１および２を参照されたい。

【０１１０】

一実施形態では、第１、第２、第３または第４の遮蔽性部分は、触媒抗体（例えば、３８Ｃ２）由来の可変重鎖ドメインを含む。一実施形態では、第１、第２、第３または第４の遮蔽性部分は、触媒抗体（例えば、３８Ｃ２）由来の可変軽鎖ドメインを含む。一実施形態では、第１の遮蔽性部分は３８Ｃ２抗体由来の可変重鎖ドメインを含み、第２の遮蔽性部分は３８Ｃ２抗体由来の可変軽鎖ドメインを含む。一実施形態では、第１の遮蔽性部分は３８Ｃ２抗体由来の可変軽鎖ドメインを含み、第２の遮蔽性部分は３８Ｃ２抗体由来の可変重鎖ドメインを含む。一実施形態では、第３の遮蔽性部分は３８Ｃ２抗体由来の可変重鎖ドメインを含み、第４の遮蔽性部分は３８Ｃ２抗体由来の可変軽鎖ドメインを含む。一実施形態では、第３の遮蔽性部分は３８Ｃ２抗体由来の可変軽鎖ドメインを含み、第４の遮蔽性部分は３８Ｃ２抗体由来の可変重鎖ドメインを含む。一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の遮蔽性部分は、配列番号２６または２７のアミノ酸配列を有する触媒抗体（例えば、３８Ｃ２）由来の可変重鎖ドメインを含む。種々の遮蔽性部分のアミノ酸配列の一覧については表１および２を参照されたい。

【０１１１】

一実施形態では、遮蔽性部分（例えば、第１、第２、第３または第４の遮蔽性部分）は、同じポリペプチド鎖に沿ってタンデムに配置された、部分の２つまたはそれよりも多くのコピーを含む。例えば、遮蔽性部分は、タンデムに配置された２つの抗体ＣＨ３領域、またはタンデムに配置された２つの抗体ＣＨ２領域、またはタンデムに配置された２つの抗体ＣＨ１領域、またはタンデムに配置された２つの抗体ＣＬ領域を含む。ＣＨ３、ＣＨ２、ＣＨ１またはＣＬ領域のいずれかは、ノブまたはホール構造を含み得る。例えば、遮蔽性部分は、タンデムに配置された２つのＴＣＲアルファ鎖定常領域、またはタンデムに配置された２つのＴＣＲベータ鎖定常領域を含む。

【０１１２】

一実施形態では、遮蔽性部分（例えば、第１、第２、第３または第４の遮蔽性部分）は、同じポリペプチド鎖に沿ってタンデムに配置された２つまたはそれよりも多くの異なる部分を含む。例えば、遮蔽性部分は、タンデムに配置された抗体ＣＨ２領域と抗体ＣＨ３領域を含む。

【０１１３】

本開示は、ＩｇＧ型抗体ならびに同じまたは異なる長さ（例えば、５～１０、１０～２０、２０～３０、３０～４０または４０～５０アミノ酸の長さ）を有する少なくとも第１および第２のペプチドリンカーを含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、第１および／または第２のペプチドリンカーは、グリシンリッチ（例えば、ＧＳ型リンカー）である。一実施形態では、第１および第２のペプチドリンカーは、同じアミノ酸配列または異なるアミノ酸配列を有する。

【０１１４】

一実施形態では、第１のペプチドリンカーは、第１のプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第１のペプチドリンカーは、第１のプロテアーゼによる切断の基質であるアミノ酸配列（第１の切断可能部位）を有する。

【０１１５】

一実施形態では、第２のペプチドリンカーは、第２のプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第２のペプチドリンカーは、第２のプロテアーゼによる切断の基質であるアミノ酸配列（第２の切断可能部位）を有する。

【０１１６】

一実施形態では、第１のペプチドリンカーは第１のプロテアーゼで切断可能であり、第２のペプチドリンカーは第２のプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第１および第２のペプチドリンカーは同じプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第１および第２のペプチドリンカーは異なるプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第１または第２のペプチドリンカーはプロテアーゼで切断可能なものではない。

【０１１７】

本開示は、ＩｇＧ型抗体を含み、同じまたは異なる長さ（例えば、１０～２０、２０～３０、３０～４０または４０～５０アミノ酸の長さ）を有する第３および第４のペプチドリンカーをさらに含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、第３および／または第４のペプチドリンカーは、グリシンリッチ（例えば、ＧＳ型リンカー）である。一実施形態では、第３および第４のペプチドリンカーは、同じアミノ酸配列または異なるアミノ酸配列を有する。

【０１１８】

一実施形態では、第３のペプチドリンカーは、第３のプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第３のペプチドリンカーは、第３のプロテアーゼによる切断の基質であるアミノ酸配列を有する。

【０１１９】

一実施形態では、第４のペプチドリンカーは、第４のプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第４のペプチドリンカーは、第４のプロテアーゼによる切断の基質であるアミノ酸配列を有する。

【０１２０】

一実施形態では、第３のペプチドリンカーは第３のプロテアーゼで切断可能であり、第４のペプチドリンカーは第４のプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第３および第４のペプチドリンカーは同じプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第３および第４のペプチドリンカーは異なるプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第３または第４のペプチドリンカーはプロテアーゼで切断可能なものではない。

【０１２１】

一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４のプロテアーゼは、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）を含めたマトリックスメタロプ

ロテアーゼ（ＭＭＰ）；ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭ１７を含めたディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ（ＡＤＡＭ）プロテアーゼ；ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）またはｕＰＡＲ；セリンプロテアーゼ；システインプロテアーゼ；アスパラギン酸プロテアーゼ；トレオニンプロテアーゼ；カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫまたはカテプシンＬを含めたカテプシン（例えば、システインまたはアスパラギン酸カテプシン）から独立に選択することができる。

【０１２２】

一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４のペプチドリンカーは、配列番号３２～４０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列と少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。表３～９に列挙されている種々のペプチドリンカー配列も参照されたい。

【０１２３】

本開示は、少なくとも第１の重鎖可変領域および第１の軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合性ドメインを有するＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、第１の抗原結合性ドメインが、第１の標的抗原に結合する（例えば、第１の標的抗原に特異的に結合する）、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、第２の重鎖可変領域および第２の軽鎖可変領域を含む第２の抗原結合性ドメインをさらに含み得、ここで、第２の抗原結合性ドメインは、第２の標的抗原に結合する（例えば、第２の標的抗原に特異的に結合する）。一実施形態では、第１および第２の抗原結合性ドメインは、同じ標的抗原に結合する。別の実施形態では、第１および第２の抗原結合性ドメインは、異なる標的抗原に結合する。

【０１２４】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、ＥＧＦＲ抗原（配列番号１）またはＣＤ３８抗原（配列番号６）に結合する。

【０１２５】

一実施形態では、抗原結合性ドメインは、配列番号２もしくは４（例えば、抗ＥＧＦＲ）の一部もしくは全長に対して、もしくは配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８もしくは２０（例えば、抗ＣＤ３８）の一部もしくは全長に対して、少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または、配列番号２もしくは４（例えば、抗ＥＧＦＲ）の一部もしくは全長に対して、もしくは配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８もしくは２０（例えば、抗ＣＤ３８）の一部もしくは全長に対して、１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【０１２６】

一実施形態では、抗原結合性ドメインは、配列番号３もしくは５（抗ＥＧＦＲ）の一部もしくは全長に対して、もしくは配列番号８、１０、１２もしくは１９（例えば、抗ＣＤ３８）の一部もしくは全長に対して、少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または配列番号３もしくは５（例えば、抗ＥＧＦＲ）の一部もしくは全長に対して、もしくは配列番号８、１０、１２もしくは１９（例えば、抗ＣＤ３８）の一部もしくは全長に対して、１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１２７】

本開示は、抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を妨害する遮蔽性部分の能力に応

じて、不活性の状態および活性化された状態を示す、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、個々の遮蔽性部分が重鎖可変領域および軽鎖可変領域のＮ末端にインタクトなペプチドリンカーによって係留され、遮蔽性部分が、抗原結合性ドメインを妨害する二量体化した複合体を形成し、その結果、不活性の状態がもたらされる。一方または両方のペプチドリンカーの切断により、二量体化した複合体を妨害位置から離して、抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を可能にすることが可能になる。一実施形態では、両方のペプチドリンカーの切断により、二量体化した複合体が遊離して抗原結合性タンパク質から離れる。

【０１２８】

一実施形態では、第１および第２のペプチドリンカーならびに／または第３および第４のペプチドリンカーが、切断されていない状態にある場合、ＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、その標的抗原との結合が阻害される（例えば、不活性）。一実施形態では、第１および第２のペプチドリンカーならびに／または第３および第４のペプチドリンカーが、切断されていない状態にある場合、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、その標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）の低下を示す（例えば、不活性）。一実施形態では、不活性の状態の遮蔽された抗原結合性タンパク質において、第１および第２の遮蔽性部分は、ならびに／または第３および第４の遮蔽性部分は、互いに会合しても会合していなくてもよい。

【０１２９】

一実施形態では、インタクトな第１および第２のペプチドリンカー、ならびに／またはインタクトな第３および第４のペプチドリンカーを有する遮蔽された抗原結合性タンパク質の標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）は、少なくとも２５～５０％、または少なくとも５０～７５％、または少なくとも７５～９５％、または少なくとも９５～９９％またはそれよりも大きく低下し得る。

【０１３０】

一実施形態では、インタクトな第１および第２のペプチドリンカー、ならびに／またはインタクトな第３および第４のペプチドリンカーを有する遮蔽された抗原結合性タンパク質の標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）は、約２～２０分の１、または約２０～１００分の１、または約１００～２００分の１、または約２００～５００分の１、または約５００～１０００分の１、または約１，０００～１０，０００分の１、または約１０，０００～１００，０００分の１、またはそれよりも大きな倍率の結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）の低下レベルで低下し得る。

【０１３１】

一実施形態では、インタクトな第１および第２のペプチドリンカー、ならびに／またはインタクトな第３および第４のペプチドリンカーを有する遮蔽された抗原結合性タンパク質の、不活性な抗原結合性タンパク質の結合親和性（例えば、K_D）は、約10^{-4}～10^{-8}Ｍである。一実施形態では、標的抗原は、可溶性抗原または細胞表面抗原である。

【０１３２】

本開示は、第１および第２のペプチドリンカーならびに／または第３および第４のペプチドリンカーが切断された状態にある場合、遮蔽解除され、その標的抗原に結合することが可能な（例えば、活性化される）、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、第１および第２のペプチドリンカーならびに／または第３および第４のペプチドリンカーが切断された状態にある場合、その標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）の増大を示す（例えば、活性化される）。一実施形態では、活性化された状態の遮蔽された抗原結合性タンパク質において、第１および第２の遮蔽性部分は、ならびに／または第３および第４の遮蔽性部分は、互いに会合しても会合していなくてもよい。

【０１３３】

一実施形態では、第１および／または第２のペプチドリンカーが切断されており、かつ／または第３および／または第４のペプチドリンカーが切断されている遮蔽解除された抗

原結合性タンパク質の標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）は、少なくとも２５～５０％、または少なくとも５０～７５％、または少なくとも７５～９５％、または少なくとも９５～９９％またはそれよりも大きく増大し得る。

【０１３４】

一実施形態では、第１および／または第２のペプチドリンカーが切断されており、かつ／または第３および／または第４のペプチドリンカーが切断されている遮蔽解除された抗原結合性タンパク質の標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）は、約２～２０倍、または約２０～１００倍、または約１００～２００倍、または約２００～５００倍、または約５００～１０００倍、または約１，０００～１０，０００倍、または約１０，０００～１００，０００倍、またはそれよりも大きな倍率の結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）の増大レベルで増大し得る。

【０１３５】

一実施形態では、第１および／または第２のペプチドリンカーが切断されており、かつ／または第３および／または第４のペプチドリンカーが切断されている遮蔽解除された抗原結合性タンパク質の、活性化された抗原結合性タンパク質の結合親和性（例えば、K_D）は、約10^{-5}～10^{-12}Ｍである。一実施形態では、標的抗原は、可溶性抗原または細胞表面抗原である。一実施形態では、活性化された形態の抗原結合性タンパク質の結合親和性は、不活性形態と比較して高い。

【０１３６】

一実施形態では、不活性の抗原結合性タンパク質と活性化された抗原結合性タンパク質の間での結合親和性の差異（例えば、不活性のK_Dと、それに対して活性化されたK_D）は、結合親和性の約１０、10^2、10^3、10^4または10^5またはそれよりも大きな差異である。

【０１３７】

本開示は、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および／または抗体依存性ファゴサイトーシス（ＡＤＰ）を含めたエフェクター機能を示すＦｃ領域を含む、不活性の状態または活性化された状態にある、ＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、Ｆｃ領域の変異により、これらの機能のうちの任意の１つまたは任意の組合せを増大または低下させることができる。一実施形態では、Ｆｃ領域は、エフェクター機能を低下させるＬＡＬＡ－ＰＧ変異（Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｐ３２９Ｇ）を含む。

【０１３８】

一実施形態では、Ｆｃ領域は、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の血清中半減期を媒介し、Ｆｃ領域の変異により、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の血清中半減期を延長または短縮することができる。

【０１３９】

一実施形態では、Ｆｃ領域は、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の熱安定性をもたらし、Ｆｃ領域の変異により、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の熱安定性を増大または低下させることができる。

【０１４０】

本開示は、ＩｇＧ型抗体を含み、Ｆｃ領域に１つまたは複数のアミノ酸変異を有する活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、変異が、第１および第２の重鎖の二量体化を促進するノブインホール構造の導入を導くもの（Ridgeway 1996 Protein Engineering 9 (7): 617-621）、または追加的な鎖間ジスルフィド結合の導入を導くもの（Carter 2011 Journal of Immunological Methods 248:7-15）、および／または新しい塩橋の導入を導くものである、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。

【０１４１】

一実施形態では、Ｆｃ領域は、一方の重鎖に突出（例えば、ノブ）を創出し、他方の重鎖にくぼみ（例えば、ホール）を創出し、その結果、突出とくぼみが互いに会合する、変

異を含む。一実施形態では、突出とくぼみにより、重鎖間の会合が促進されて、例えば、二量体化が促進される。一実施形態では、重鎖の一方を、突出が創出されるように、小さなアミノ酸をより大きなアミノ酸で置換することによって変異させる。一実施形態では、他方の重鎖は、くぼみが創出されるように、より大きなアミノ酸をより小さなアミノ酸で置換することによって変異させる。一実施形態では、Ｆｃ領域ノブインホール変異は、Ｔ３６６、Ｌ３６８、Ｔ３９４、Ｆ４０５、Ｙ４０７およびＫ４０９からなる群から選択される、Ｆｃ内の任意の１つの位置またはＦｃ内の２つもしくはそれよりも多くの位置の任意の組合せにおける置換変異を含む（番号付けは、Ｋａｂａｔ系に基づく）。一実施形態では、Ｆｃ領域ノブインホール変異は、以下の変異のうちの任意の１つ、または２つもしくはそれよりも多くの任意の組合せを含む：Ｔ３６６Ｙ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、Ｔ３９４Ｓ、Ｔ３９４Ｗ、Ｆ４０５Ａ、Ｆ４０５Ｗ、Ｙ４０７Ａ、Ｙ４０７Ｖ、Ｙ４０７Ｔ（Ｋａｂａｔ系に基づく番号付け）。

【０１４２】

本開示は、ＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかをコードする核酸を提供する。例えば、核酸は、標的抗原に結合する（例えば、単一特異性）ＩｇＧクラス抗体を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質をコードする。別の例では、核酸は、２種の標的抗原に結合する（例えば、二重特異性）ＩｇＧクラス抗体を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質をコードする。

【０１４３】

一実施形態では、第１の核酸が、（ｉ）第１または第３の遮蔽性部分、（ｉｉ）第１または第３のペプチドリンカー、および（ｉｉｉ）重鎖可変領域を含む重鎖をコードする。一実施形態では、第１の核酸は、（ｉｖ）重鎖定常領域（ＣＨ１）を含む重鎖をさらにコードする。一実施形態では、第１の核酸は、（ｖ）ヒンジ領域を含む重鎖をさらにコードする。一実施形態では、第１の核酸は、（ｖｉ）重鎖定常領域（ＣＨ２および／またはＣＨ３）を含む重鎖をさらにコードする。一実施形態では、第１の核酸は、ノブまたはホールを有する重鎖定常領域（ＣＨ２および／またはＣＨ３）をコードする。一実施形態では、第１のリンカーは、第１の切断可能部位を含む。一実施形態では、第３のリンカーは、第３の切断可能部位を含む。一実施形態では、第１の核酸は、組換え核酸分子を含む。

【０１４４】

一実施形態では、第１の核酸は、配列番号２もしくは４（例えば、抗ＥＧＦＲ）の一部もしくは全長に対して、もしくは配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８もしくは２０（例えば、抗ＣＤ３８）の一部もしくは全長に対して、少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または、配列番号２もしくは４（例えば、抗ＥＧＦＲ）の一部もしくは全長に対して、もしくは配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８もしくは２０（例えば、抗ＣＤ３８）の一部もしくは全長に対して、１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む重鎖をコードする。

【０１４５】

一実施形態では、第１の核酸は、配列番号２１～３１のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む第１または第３の遮蔽性部分（表１および２を参照されたい）を含む重鎖をコードする。

【０１４６】

一実施形態では、第１の核酸は、配列番号３２～４０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む第１または第３のペプチドリンカー（表３～９および１２も参照されたい）を含む重鎖をコードする。

【０１４７】

一実施形態では、第２の核酸が、（ｉ）第２または第４の遮蔽性部分、（ｉｉ）第２または第４のペプチドリンカー、および（ｉｉｉ）軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする。

一実施形態では、第２の核酸は、軽鎖定常領域（ＣＬ）をさらにコードする。一実施形態では、第２のリンカーは、第２の切断可能部位を含む。一実施形態では、第４のリンカーは、第４の切断可能部位を含む。一実施形態では、第２の核酸は、組換え核酸分子を含む。

【０１４８】

一実施形態では、第２の核酸は、配列番号３もしくは５の一部もしくは全長に対して（抗ＥＧＦＲ）、もしくは配列番号８、１０、１２もしくは１９（例えば、抗ＣＤ３８）の一部もしくは全長に対して、少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または配列番号３もしくは５（例えば、抗ＥＧＦＲ）の一部もしくは全長に対して、もしくは配列番号８、１０、１２もしくは１９（例えば、抗ＣＤ３８）の一部もしくは全長に対して、１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む軽鎖をコードする。

【０１４９】

一実施形態では、第２の核酸は、配列番号２１～３１のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む第２の遮蔽性部分または第４の遮蔽性部分（表１および２を参照されたい）を含む軽鎖をコードする。

【０１５０】

一実施形態では、第２の核酸は、配列番号３２～４０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列を含む第２または第４のペプチドリンカー（表３～９および１２も参照されたい）を含む軽鎖をコードする。

【０１５１】

本開示は、ＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかをコードする核酸に作動可能に接合した発現ベクターを含めた個々のベクターを提供する。例えば、発現ベクターは、標的抗原に結合する（例えば、単一特異性）ＩｇＧクラス抗体を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質をコードする核酸に作動可能に接合している。別の例では、発現ベクターは、２種の標的抗原に結合する（例えば、二重特異性）ＩｇＧクラス抗体を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質をコードする核酸に作動可能に接合している。

【０１５２】

一実施形態では、発現ベクターは、ＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかをコードする核酸の転写を制御する１つまたは複数の調節配列（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）を含む。一実施形態では、発現ベクターは、それぞれが重鎖または軽鎖をコードする核酸に作動可能に接合した１つまたは複数の調節配列を含み、各調節配列により、重鎖または軽鎖をコードする核酸の転写がモノシストロニック様式で制御される。一実施形態では、発現ベクターは、重鎖および軽鎖をコードする核酸に作動可能に接合した調節配列を含み、その調節配列により、重鎖および軽鎖の転写がポリシストロニック様式で制御される。

【０１５３】

一実施形態では、ベクターは、それぞれが重鎖または軽鎖配列をコードする個々の核酸に作動可能に接合することができる複数の調節配列を含む。

【０１５４】

一実施形態では、１つの発現ベクターを宿主細胞に導入し、ここで、宿主細胞内の発現ベクターは、重鎖および／または軽鎖配列をコードする核酸に作動可能に接合したプロモーター（および必要に応じてエンハンサー配列）を有する。したがって、宿主細胞は、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを構成する重鎖および／または軽鎖を発現し得る。

【０１５５】

一実施形態では、複数の発現ベクターを宿主細胞に導入し、ここで、宿主細胞内の個々

の発現ベクターは、重鎖または軽鎖配列をコードする核酸に作動可能に接合したプロモーター（および必要に応じてエンハンサー配列）を有する。したがって、宿主細胞は、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを構成する重鎖および軽鎖を発現し得る。

【０１５６】

ベクターは、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターであるプロモーターを含む。本明細書に記載の重鎖または軽鎖のいずれかを一過性にまたは安定に発現するトランスジェニック宿主細胞が生じるように、ベクターおよび宿主細胞を選択することができる。

【０１５７】

本開示は、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを構成する重鎖および／または軽鎖をコードする１つまたは複数の核酸に作動可能に接合した単一の発現ベクターを有する宿主細胞を提供する。

【０１５８】

本開示は、２つまたはそれよりも多くの発現ベクターを有する宿主細胞であって、各発現ベクターが、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを構成する重鎖および／または軽鎖をコードする１つまたは複数の核酸に作動可能に接合している、宿主細胞を提供する。

【０１５９】

宿主細胞は、細菌細胞または哺乳動物細胞であり得る。一実施形態では、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を含む。

【０１６０】

一実施形態では、少なくとも１つの発現ベクターを宿主細胞に、リポフェクション（例えば、脂質界面活性物質を使用する）；電気穿孔；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、ＤＥＡＥ－デキストラン、または他の物質を使用したトランスフェクション；ウイルスによるトランスフェクション；非ウイルストランスフェクション；微粒子銃；および感染（例えば、ベクターが感染因子である場合）によって導入する。

【０１６１】

一実施形態では、宿主細胞は、重鎖および軽鎖をコードする核酸に作動可能に接合した１つの発現ベクターを有する。宿主細胞は、重鎖および軽鎖を、重鎖：軽鎖のモル比１：１、１：１．５、１．５：１、１：２、２：１、１：３、または３：１で発現し得る。当技術分野で周知の他のモル比も可能である。

【０１６２】

一実施形態では、宿主細胞は、２つの発現ベクターを有し、ここで、第１の発現ベクターは重鎖をコードする核酸に作動可能に接合しており、第２の発現ベクターは軽鎖をコードする核酸に作動可能に接合している。宿主細胞は、重鎖および軽鎖を重鎖：軽鎖のモル比１：１、１：１．５、１．５：１、１：２、２：１、１：３、または３：１で発現し得る。当技術分野で周知の他のモル比も可能である。

【０１６３】

本開示は、本明細書に記載のＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを調製するための方法であって、宿主細胞の集団を培養するステップを含み、集団内の個々の宿主細胞が、本明細書に記載の重鎖および／または軽鎖のうちの任意の１つまたは任意の組合せをコードする核酸のうちの任意の１つまたは任意の組合せと作動可能に連結した少なくとも１つの発現ベクターを有し、培養するステップが、宿主細胞の集団による重鎖および／または軽鎖の発現に適した条件下で行われる、方法を提供する。

【０１６４】

一実施形態では、重鎖および／または軽鎖をコードする核酸は、発現されたポリペプチド鎖を分泌させるためのシグナルペプチドをさらにコードする。一実施形態では、培養するステップを、宿主細胞の集団による重鎖および／または軽鎖の分泌に適した条件下で行う。

【０１６５】
一実施形態では、重鎖および／または軽鎖のうちの任意の１つまたは任意の組合せをコードする核酸は、発現されたポリペプチドを富化するためのアフィニティータグ配列をさらにコードする。例示的なアフィニティータグ配列は、ヒスチジンタグ、ＦＬＡＧタグ、ｍｙｃタグ、ＨＡタグ、およびＧＳＴタグを含む。
【０１６６】
一実施形態では、本明細書に記載のＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを調製するための方法は、発現された重鎖および／または軽鎖を単離するステップをさらに含む。
【０１６７】
一実施形態では、培養するステップを、ＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を形成するための重鎖と軽鎖のアセンブリまたは会合に適した条件下で行う。
【０１６８】
一実施形態では、方法は、ＩｇＧ型抗体を含むアセンブルされた活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を単離または回収するステップをさらに含む。一実施形態では、単離するステップを、アフィニティークロマトグラフィーを使用して行う。一実施形態では、単離するステップを、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ由来のプロテインＡまたはＧ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、または免疫親和性を用いたアフィニティークロマトグラフィーを使用して行う。一実施形態では、陽イオン交換、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィーおよび／またはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを含む１つまたは複数の追加的な単離するステップを行う。
【０１６９】
一実施形態では、ＩｇＧ型抗体を含むアセンブルされた活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、軽鎖と対合した重鎖を含み、ここで、（１）重鎖は、第１または第３の遮蔽性部分、第１または第３のペプチドリンカー、重鎖可変領域を含み、必要に応じて重鎖定常領域（ＣＨ１、ＣＨ２および／またはＣＨ３）を含み、（２）軽鎖は、第２または第４の遮蔽性部分、第２または第４のペプチドリンカー、軽鎖可変領域を含み、必要に応じて軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む。
【０１７０】
ＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、当技術分野で周知の方法を使用したトランスジェニック宿主細胞による発現、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイおよびヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウスを使用して調製することができる。一実施形態では、トランスジェニック宿主細胞による発現を使用した抗原結合性タンパク質の収率は、形成される活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の総量の約２０～８０％、または約３０～９０％、または約４０～９５％、または約５０～９９％であり得る。
【０１７１】
本開示は、本明細書に記載のＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの少なくとも１つのペプチドリンカーを切断するための方法であって、（ａ）少なくとも１種のプロテアーゼを不活性形態の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質と接触させるステップであって、第１、第２、第３および第４のペプチドリンカーが切断されていない状態である、ステップ、を含む方法を提供する。
【０１７２】
一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ（ＡＤＡＭ）プロテアーゼ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭ１７、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子

（ｕＰＡ）、ｕＰＡＲ、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、カテプシン（例えば、システインまたはアスパラギン酸カテプシン）、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫまたはカテプシンＬから選択される２種またはそれよりも多くのプロテアーゼのうちの１つまたは任意の組合せと接触させる。

【０１７３】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を２種もしくはそれよりも多くのプロテアーゼと基本的に同時に（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓｌｙ）（同時に（ａｔ　ｔｈｅ　ｓａｍｅ　ｔｉｍｅ））接触させる、または、２種もしくはそれよりも多くのプロテアーゼと、任意の順序で逐次的に接触させる。

【０１７４】

一実施形態では、ステップ（ａ）において使用される活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のペプチドリンカーのうちの少なくとも１つは、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ（ＡＤＡＭ）プロテアーゼ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭ１７、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、ｕＰＡＲ、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、カテプシン（例えば、システインまたはアスパラギン酸カテプシン）、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫまたはカテプシンＬを含めた１種または複数種のプロテアーゼで切断可能な切断可能部位を含む。

【０１７５】

一実施形態では、方法は、（ｂ）活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を活性化された形態に変換するために、切断可能部位の少なくとも１つを切断するステップをさらに含む。一実施形態では、活性化された形態は、標的抗原に結合し得る。

【０１７６】

一実施形態では、方法は、（ｃ）活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質（今や活性化された状態である）を標的抗原に結合させるステップをさらに含む。

【０１７７】

一実施形態では、接触させるステップ、切断するステップおよび結合させるステップをｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏ条件で行う。

【０１７８】

一実施形態では、標的抗原は、健康な細胞または疾患細胞によって発現される可溶性抗原または表面抗原を含む。

【０１７９】

一実施形態では、標的抗原を発現する疾患細胞（例えば、腫瘍またはがん細胞）は、ペプチドリンカーを切断する１種または複数種のプロテアーゼも発現する。一実施形態では、疾患細胞は、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ（ＡＤＡＭ）プロテアーゼ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭ１７、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、カテプシン、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫおよび／またはカテプシンＬを含む２種またはそれよりも多くのプロテアーゼのうちの１つまたは組合せを発現する。

【０１８０】

一実施形態では、方法は、（ｄ）疾患細胞（例えば、腫瘍またはがん細胞）を死滅させるステップをさらに含む。

【０１８１】
一実施形態では、ペプチドリンカーのうちの少なくとも１つは、腫瘍微小環境中に存在するプロテアーゼで切断可能である。
【０１８２】
一実施形態では、腫瘍微小環境は、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ（ＡＤＡＭ）プロテアーゼ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭ１７、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、カテプシン（例えば、システインまたはアスパラギン酸カテプシン）、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫおよびカテプシンＬからなる群から選択されるプロテアーゼを含む。
【０１８３】
本開示は、腫瘍関連抗原の発現または過剰発現に関連する疾患を有する対象を処置する方法であって、対象に、２種またはそれよりも多くの、本明細書に記載のＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質、のうちの１つまたは任意の組合せを含む治療用組成物を有効量で投与するステップを含む、方法を提供する。一実施形態では、ＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を、第１、第２、第３および第４のペプチドリンカーを切断されていない状態で有する不活性形態で、対象に投与する。
【０１８４】
本開示は、腫瘍抗原の有害な発現に関連する疾患、障害または状態を有する対象を処置する方法であって、疾患が、これだけに限定されないが、血液のがん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、頭頸部がん、肺がん、膀胱がん、黒色腫、結腸直腸がん、膵がん、肺がん、肝がん、腎がん、食道がん、平滑筋腫、平滑筋肉腫、神経膠腫、および神経膠芽腫を含めた、がんである、方法を提供し、ここで、対象を処置するための当該方法は、対象に、２種またはそれよりも多くの、本明細書に記載のＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質、のうちの１つまたは任意の組合せを含む治療用組成物を有効量で投与するステップを含む。
【０１８５】
一実施形態では、がんは、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、バーキットリンパ腫（ＢＬ）、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病（Ｂ－ＣＬＬ）、Ｂ細胞およびＴ細胞急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、Ｔ細胞リンパ腫（ＴＣＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、ホジキンリンパ腫（ＨＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）および多発性骨髄腫（ＭＭ）からなる群から選択される血液のがんである。
【０１８６】
本開示は、がんまたは腫瘍などの患部組織を検出、診断、モニタリングおよび／または病期分類するために、プロテアーゼの活性および特異性を検出するための、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける切断に基づく方法を提供する。腫瘍またはがん塊を対象から抽出し、それぞれが既知のプロテアーゼ切断プロファイルを有する、２種またはそれよりも多くの、本明細書に記載のＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質、のうちの１つまたは任意の組合せと接触させることができる。対象由来の腫瘍またはがん塊により１種または複数種のプロテアーゼが産生され、それを、１つまたは複数の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質と、プロテアーゼ（複数可）により活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質（複数可）のペプチドリンカーが切断されるのに適した条件下で接触させる。ペプチドリンカーの切断産物を任意の方法を使用して検出することができる。したがって、腫瘍またはがん塊によって産生されたプロテアーゼの型を同定することができる。一実施形態では、ペプチドリンカーは、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３

、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）、ＡＤＡＭプロテアーゼ、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、カテプシン（例えば、システインまたはアスパラギン酸カテプシン）、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫおよびカテプシンＬからなる群から選択される２種またはそれよりも多くのプロテアーゼのうちの任意の１つまたは任意の組合せで切断可能である。

【０１８７】

本開示は、対象由来の腫瘍によって産生されたプロテアーゼの存在を検出するための方法であって、（ａ）（ｉ）対象から得られた腫瘍を、（ｉｉ）本明細書に記載のＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のうちの少なくとも１つと接触させるステップであって、腫瘍試料により、プロテアーゼが産生される、ステップを含む、方法を提供する。

【０１８８】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、それぞれが、少なくとも第１の重鎖可変領域および第１の軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合性ドメインを含み、ここで、（ｉ）第１の重鎖可変領域は、第１の遮蔽性部分と、第１のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉ）第１の軽鎖可変領域は、第２の遮蔽性部分と、第２のペプチドリンカーを介して接合している。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、第２の重鎖可変領域および第２の軽鎖可変領域を含む第２の抗原結合性ドメインをさらに含み、ここで、（ｉ）第２の重鎖可変領域は、第３の遮蔽性部分と、第３のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉ）第２の軽鎖可変領域は、第４の遮蔽性部分と、第４のペプチドリンカーを介して接合している。

【０１８９】

一実施形態では、第１のペプチドリンカーは、第１の切断可能部位を含み、第２のペプチドリンカーは、第２の切断可能部位を含む。一実施形態では、第３のペプチドリンカーは、第３の切断可能部位を含み、第４のペプチドリンカーは、第４の切断可能部位を含む。一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の切断可能部位のアミノ酸配列は、腫瘍試料によって産生されるプロテアーゼによる切断の基質であってもそうでなくてもよい。一実施形態では、プロテアーゼが第１、第２、第３および／または第４の切断可能部位を切断するものである場合、ステップ（ａ）における接触を、プロテアーゼにより第１、第２、第３および／または第４の切断可能部位が切断されて１つまたは複数の切断産物が生成されるのに適した条件下で実施する。

【０１９０】

一実施形態では、方法は、（ｂ）第１、第２、第３および／または第４のペプチドリンカーからの第１、第２、第３および／または第４の切断産物を検出するステップをさらに含む。一実施形態では、方法は、（ｃ）第１、第２、第３および／または第４の切断産物を検出し、切断産物のいずれかと、第１、第２、第３および／または第４の切断可能部位のアミノ酸配列の相互関係を明らかにすることにより、対象由来の腫瘍によって産生されるプロテアーゼの型を同定するステップをさらに含む。

【０１９１】

一実施形態では、対象において腫瘍によって産生されるプロテアーゼの型を同定することにより、対象におけるがんを診断することができる。一実施形態では、第１、第２、第３および／または第４の切断産物を、ゲル電気泳動、ウエスタンブロット分析、免疫学、免疫組織化学的検査、比色定量により、分光光度的に、質量分析、液体クロマトグラフィーによって、またはこれらの任意の組合せによって検出することができる。一実施形態では、腫瘍またはがん塊を、前立腺、乳房、卵巣、頭頸部、膀胱、皮膚、結腸直腸、肛門、直腸、膵臓、肺（非小細胞肺がんおよび小細胞肺がんを含む）、平滑筋腫、脳、神経膠腫、神経膠芽腫、食道、肝臓、腎臓、胃、結腸、子宮頸部、子宮、子宮内膜、外陰部、喉頭、膣、骨、鼻腔、副鼻腔、上咽頭、口腔、中咽頭、喉頭、下咽頭、唾液腺、尿管、尿道、

陰茎、および精巣から得ることができる。一実施形態では、対象は、ヒト、非ヒト霊長類、サル、類人猿、ネズミ科動物（例えば、マウスおよびラット）、ウシ亜科動物、ブタ、ウマ科動物、イヌ科動物、ネコ科動物、ヤギ、オオカミ、カエルまたは魚類である。一実施形態では、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける切断に基づく方法を、対象におけるがんを検出、診断、モニタリングおよび／または病期分類するために使用することができる。

【０１９２】

本開示は、ＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のうちの少なくとも１つ、および／または少なくとも１つの、ＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質をコードする核酸、を含むキットを提供する。一実施形態では、キットは、Ｔｒｉｓ、リン酸塩、炭酸塩、安定剤、賦形剤、殺生物剤およびウシ血清アルブミンからなる群から選択される１つまたは複数の補助化合物を含む。一実施形態では、キットは、Ｔｒｉｓ、リン酸塩、炭酸塩、安定剤、賦形剤、殺生物剤およびウシ血清アルブミンからなる群から選択される１つまたは複数の補助化合物を含む。一実施形態では、キットは、少なくとも１つのＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質（またはそのタンパク質をコードする核酸）および必要に応じて１つまたは複数の補助化合物を含有する、１つの容器を含む。一実施形態では、キットは、２つまたはそれよりも多くの容器を含み、ここで、容器の１つに少なくとも１つのＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質（またはそのタンパク質をコードする核酸）が含有され、別の容器に１つまたは複数の補助化合物が含有される。

【０１９３】

二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質

本開示は、膜貫通領域および細胞内シグナル伝達領域と接合したＦａｂ断片を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、Ｆａｂ断片が、対をなす遮蔽性部分と接合している、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、ＤＡＲ構築物は、Ｆａｂ断片と膜貫通領域の間に必要に応じたヒンジ領域を含む。

【０１９４】

一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）は、二量体化してタンパク質複合体を形成する２本のポリペプチド鎖を含み、ここで、第１のポリペプチド鎖は重鎖可変領域を含み、第２のポリペプチド鎖は軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域と軽鎖可変領域が抗原結合性ドメインを形成する。一実施形態では、第１および第２のポリペプチド鎖は１つまたは複数のジスルフィド結合によって連結している。二量体抗原受容体は、標的抗原に特異的に結合するので、抗体様特性を有する。

【０１９５】

一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）は、二量体化してタンパク質複合体を形成する２本のポリペプチド鎖を含み、ここで、第１のポリペプチド鎖は軽鎖可変領域を含み、第２のポリペプチド鎖は重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域と重鎖可変領域が抗原結合性ドメインを形成する。一実施形態では、第１および第２のポリペプチド鎖は１つまたは複数のジスルフィド結合によって連結している。二量体抗原受容体は、標的抗原に特異的に結合するので、抗体様特性を有する。

【０１９６】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を毒素とリンカーによって接合する。

【０１９７】

一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）はペプチドリンカーを欠き、かつ／または遮蔽性部分を欠く。

【０１９８】

本開示は、第１および第２のポリペプチド鎖を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、（ａ）第１のポリペプチド鎖が、領域：（ｉ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、（ｉｉ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）、（

ｉｉｉ）必要に応じたヒンジ領域、（ｉｖ）膜貫通領域（ＴＭ）、および（ｖ）細胞内シグナル伝達領域を含み、（ｂ）第２のポリペプチド鎖が、領域：（ｉ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、および（ｉｉ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含み、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）と抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）が、標的抗原に結合する抗原結合性ドメインを形成する、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。

【０１９９】

一実施形態では、（ｉ）第１のポリペプチド鎖のＮ末端が、第１の遮蔽性部分と、第１の切断可能部位を有する第１のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉ）第２のポリペプチド鎖のＮ末端が、第２の遮蔽性部分と、第２の切断可能部位を有する第２のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉｉ）第１および第２の遮蔽性部分が、ジスルフィド結合を伴わずに互いに会合しており、（ｉｖ）第１および第２の遮蔽性部分は、抗原結合性ドメインには選択的に結合せず、（ｖ）第１の切断可能部位は、第１のプロテアーゼで切断可能であり、（ｖｉ）第２の切断可能部位は、第２のプロテアーゼで切断可能であり、第１および第２のプロテアーゼ切断可能部位は、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）はペプチドリンカーを欠き、かつ／または遮蔽性部分を欠く。

【０２００】

一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、第１および第２のポリペプチド鎖を含み、ここで、（ａ）第１のポリペプチド鎖は、（ｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、（ｉｖ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）、（ｖ）必要に応じたヒンジ領域、（ｖｉ）膜貫通領域（ＴＭ）、および（ｖｉｉ）細胞内シグナル伝達領域を含み、（ｂ）第２のポリペプチド鎖は、（ｉ）第２の遮蔽性部分、（ｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、および（ｉｖ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含み、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）と抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）が標的抗原に結合する抗原結合性ドメインを形成する。

【０２０１】

一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分が、抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を低減するように互いに会合している。

【０２０２】

一実施形態では、第１および／または第２の切断可能部位は、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である。

【０２０３】

一実施形態では、第１および第２のプロテアーゼは、同じ腫瘍によって、または異なる腫瘍によって産生される。

【０２０４】

一実施形態では、ヒンジ領域は、約１０～約１００アミノ酸の長さである。一実施形態では、ヒンジ領域は、独立に、ＰＤＧＦＲ（血小板由来増殖因子受容体）ヒンジ領域またはその断片、ＣＤ８ヒンジ領域またはその断片、ＣＤ８αヒンジ領域またはその断片、抗体の定常ドメインＣＨ１およびＣＨ２を接合する抗体（ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、またはＩｇＤ）のヒンジ領域からなる群から選択される。ヒンジ領域は、抗体に由来し得、また、抗体の１つまたは複数の定常領域を含んでもよく含まなくてもよい。

【０２０５】

一実施形態では、膜貫通ドメインは、ＣＤ８α、ＣＤ８β、４－１ＢＢ／ＣＤ１３７、ＣＤ２８、ＣＤ３４、ＣＤ４、ＦｃεＲＩγ、ＣＤ１６、ＯＸ４０／ＣＤ１３４、ＣＤ３ζ、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲζ、ＣＤ３２、ＣＤ６４、ＣＤ６４、ＣＤ４５、ＣＤ５、ＣＤ９、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、ＬＦＡ－１　Ｔ細胞補助受容体、ＣＤ２Ｔ細胞補助受容体／接着分子、ＣＤ４０、ＣＤ４ＯＬ／ＣＤ１５４、ＶＥＧＦＲ２、ＦＡ

Ｓ、およびＦＧＦＲ２Ｂからなる群から選択される膜タンパク質配列領域に由来し得る。
【０２０６】
一実施形態では、細胞内シグナル伝達領域は、ＣＤ３－ゼータ鎖、４－１ＢＢ、ＣＤ２８、ＣＤ２７、ＯＸ４０、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＰＤ－１、ＩＣＯＳ、リンパ卵母細胞機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、ＧＩＴＲ（ＴＮＦＲＳＦ１８）、ＤＲ３（ＴＮＦＲＳＦ２５）、ＴＮＦＲ２、ＣＤ２２６由来のシグナル伝達領域、およびこれらの組合せからなる群から選択される２種またはそれよりも多くの細胞内シグナル伝達配列のうちの任意の１つまたは任意の組合せを含む。
【０２０７】
一実施形態では、細胞内シグナル伝達領域は、１種、２種または３種の異なる細胞内シグナル伝達配列を含む。
【０２０８】
一実施形態では、細胞内シグナル伝達領域は、４－１ＢＢ、ＣＤ２８、ＩＴＡＭ　３モチーフを有するＣＤ３ゼータ（長）シグナル伝達配列および／またはＣＤ３ゼータ（短）シグナル伝達配列からなる群から選択される２種またはそれよりも多くのシグナル伝達配列のうちの任意の１つまたは任意の組合せを含む。
【０２０９】
一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を毒素とリンカーによって接合する。
【０２１０】
本開示は、第１および第２のポリペプチド鎖を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、（ａ）第１のポリペプチド鎖が、領域：（ｉ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、（ｉｉ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）、（ｉｉｉ）必要に応じたヒンジ領域、（ｉｖ）膜貫通領域（ＴＭ）、および（ｖ）細胞内シグナル伝達領域を含み、（ｂ）第２のポリペプチド鎖が、領域：（ｉ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、および（ｉｉ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含み、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）と抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）が標的抗原に結合する抗原結合性ドメインを形成する、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。
【０２１１】
一実施形態では、（ｉ）第１のポリペプチド鎖のＮ末端は、第１の遮蔽性部分と、第１の切断可能部位を有する第１のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉ）第２のポリペプチド鎖のＮ末端は、第２の遮蔽性部分と、第２の切断可能部位を有する第２のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉｉ）第１および第２の遮蔽性部分が、ジスルフィド結合を伴わずに互いに会合しており、（ｉｖ）第１および第２の遮蔽性部分は、抗原結合性ドメインには選択的に結合せず、（ｖ）第１の切断可能部位は、第１のプロテアーゼで切断可能であり、（ｖｉ）第２の切断可能部位は、第２のプロテアーゼで切断可能であり、第１および第２のプロテアーゼ切断可能部位は、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）はペプチドリンカーを欠き、かつ／または遮蔽性部分を欠く。
【０２１２】
一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、第１および第２のポリペプチド鎖を含み、ここで、（ａ）第１のポリペプチド鎖は、（ｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、（ｉｖ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）、（ｖ）必要に応じたヒンジ領域、（ｖｉ）膜貫通領域（ＴＭ）、および（ｖｉｉ）細胞内シグナル伝達領域を含み、（ｂ）第２のポリペプチド鎖は、（ｉ）第２の遮蔽性部分、（ｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、および（ｉｖ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含み、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）と抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）が標的抗原に結合する抗原結合性ドメインを形成する。

【０２１３】
一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分が、抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を低減するように互いに会合している。
【０２１４】
一実施形態では、第１および／または第２の切断可能部位は、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である。
【０２１５】
一実施形態では、第１および第２のプロテアーゼは、同じ腫瘍によって、または異なる腫瘍によって産生される。
【０２１６】
一実施形態では、ヒンジ領域は、約１０～約１００アミノ酸の長さである。一実施形態では、ヒンジ領域は、独立に、ＣＤ８ヒンジ領域またはその断片、ＣＤ８αヒンジ領域またはその断片、抗体の定常ドメインＣＨ１およびＣＨ２を接合する抗体（ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、またはＩｇＤ）のヒンジ領域からなる群から選択される。ヒンジ領域は、抗体に由来し得、また、抗体の１つまたは複数の定常領域を含んでもよく含まなくてもよい。
【０２１７】
一実施形態では、膜貫通ドメインは、ＣＤ８α、ＣＤ８β、４－１ＢＢ／ＣＤ１３７、ＣＤ２８、ＣＤ３４、ＣＤ４、ＦｃεＲＩγ、ＣＤ１６、ＯＸ４０／ＣＤ１３４、ＣＤ３ζ、ＣＤ３ε、ＣＤ３γ、ＣＤ３δ、ＴＣＲα、ＴＣＲβ、ＴＣＲζ、ＣＤ３２、ＣＤ６４、ＣＤ６４、ＣＤ４５、ＣＤ５、ＣＤ９、ＣＤ２２、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ６４、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ１３７、ＣＤ１５４、ＬＦＡ－１　Ｔ細胞補助受容体、ＣＤ２Ｔ細胞補助受容体／接着分子、ＣＤ４０、ＣＤ４ＯＬ／ＣＤ１５４、ＶＥＧＦＲ２、ＦＡＳ、およびＦＧＦＲ２Ｂからなる群から選択される膜タンパク質配列領域に由来し得る。
【０２１８】
一実施形態では、細胞内シグナル伝達領域は、ＣＤ３－ゼータ鎖、４－１ＢＢ、ＣＤ２８、ＣＤ２７、ＯＸ４０、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＰＤ－１、ＩＣＯＳ、リンパ卵母細胞機能関連抗原－１（ＬＦＡ－１）、ＣＤ２、ＣＤ７、ＬＩＧＨＴ、ＮＫＧ２Ｃ、Ｂ７－Ｈ３、ＧＩＴＲ（ＴＮＦＲＳＦ１８）、ＤＲ３（ＴＮＦＲＳＦ２５）、ＴＮＦＲ２、ＣＤ２２６由来のシグナル伝達領域、およびこれらの組合せからなる群から選択される２種またはそれよりも多くの細胞内シグナル伝達配列のうちの任意の１つまたは任意の組合せを含む。
【０２１９】
一実施形態では、細胞内シグナル伝達領域は、１種、２種または３種の異なる細胞内シグナル伝達配列を含む。
【０２２０】
一実施形態では、細胞内シグナル伝達領域は、４－１ＢＢ、ＣＤ２８、ＩＴＡＭ　３モチーフを有するＣＤ３ゼータ（長）シグナル伝達配列および／またはＣＤ３ゼータ（短）シグナル伝達配列からなる群から選択される２種またはそれよりも多くのシグナル伝達配列のうちの任意の１つまたは任意の組合せを含む。
【０２２１】
一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を毒素とリンカーによって接合する。
【０２２２】
本開示は、少なくとも第１および第２の遮蔽性部分を有する本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを提供する。一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分は、互いに会合している（二量体化している）場合、抗原結合性タンパク質の、その標的抗原に結合する能力に干渉する（それを妨害する）。第１および第２の遮蔽性部分は、互いに会合している（二量体化している）場合、抗原結合性タンパク質とその標的抗原の結合を立体的妨害によって遮断し

得る。

【０２２３】

一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分は、共有結合の形成を伴わずに（例えば、ジスルフィド結合もグルタミン転移結合もなしで）互いに会合している（二量体化する）ポリペプチドを含む。第１および第２の遮蔽性部分は、イオン相互作用、水素結合、双極子－双極子相互作用、親水性相互作用、疎水性相互作用、親和性結合、またはファンデルワールス力が関与する結合もしくは会合を含めた非共有結合性の相互作用によって互いに会合し得る（二量体化し得る）ポリペプチドを含む。

【０２２４】

一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分は、ホモ二量体またはヘテロ二量体として互いに会合している。

【０２２５】

一実施形態では、遮蔽性部分の１つを、ホール構造を有するように工学的に操作される別の遮蔽性部分とのホモ二量体化またはヘテロ二量体化に好都合になるように、鎖間の立体的な相補性構造を形成するノブ構造を有するように工学的に操作することができる。

【０２２６】

本開示は、二量体化した立体配置にある遮蔽性部分の一方または両方が、新しい鎖間の塩橋を創出する１つまたは複数の変異を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、１つの遮蔽性部分のトレオニン残基をグルタミン酸に置き換え、別の遮蔽性部分の対応する位置のアスパラギンをリシンに置き換え、それにより、鎖間の塩橋を創出することができる。

【０２２７】

一実施形態では、第１および／または第２の遮蔽性部分は、免疫グロブリン定常領域（例えば、ＣＬ、ＣＨ１、ＣＨ２またはＣＨ３）に由来する。

【０２２８】

一実施形態では、第１または第２の遮蔽性部分は、重鎖定常領域（ＣＨ１）を含む。一実施形態では、第２または第１の遮蔽性部分は、カッパまたはラムダ軽鎖定常領域（ＣＬカッパまたはＣＬラムダ）を含む。一実施形態では、第１の遮蔽性部分は重鎖定常領域（ＣＨ１）を含み、第２の遮蔽性部分はカッパまたはラムダ軽鎖定常領域（ＣＬカッパまたはＣＬラムダ）を含む。一実施形態では、第１の遮蔽性部分はカッパまたはラムダ軽鎖定常領域（ＣＬカッパまたはＣＬラムダ）を含み、第２の遮蔽性部分は重鎖定常領域（ＣＨ１）を含む。一実施形態では、第１および／または第２の遮蔽性部分は、配列番号２１、２２または２３のアミノ酸配列を有するＣＨ１、ＣＬ（ラムダ）またはＣＬ（カッパ）を含む。種々の遮蔽性部分のアミノ酸配列の一覧については表１および２を参照されたい。

【０２２９】

一実施形態では、第１または第２の遮蔽性部分は、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４ガンマ重鎖定常領域、例えば、ＣＨ３を含む。一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分は、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４ガンマ重鎖定常領域ＣＨ３を含む。一実施形態では、ＩｇＧ１またはＩｇＧ４ガンマ重鎖定常領域ＣＨ３を含む、遮蔽性部分の１つを、ホールまたはノブ構造を有するように工学的に操作されるＩｇＧ１またはＩｇＧ４ガンマ重鎖定常領域ＣＨ３を含む別の遮蔽性部分との二量体化（例えば、ホモ二量体化）に好都合になるように鎖間の立体的な相補性構造を形成するノブまたはホール構造を有するように工学的に操作する。一実施形態では、第１および／または第２の遮蔽性部分は、配列番号２４、２５、３０または３１のアミノ酸配列を有するＣＨ３（ＩｇＧ１または（ＩｇＧ４）を含む。種々の遮蔽性部分のアミノ酸配列の一覧については表１および２を参照されたい。

【０２３０】

一実施形態では、遮蔽性部分の少なくとも１つは、免疫グロブリン重鎖定常領域に由来し、活性化可能な遮蔽された抗体の重鎖可変領域と接合している。一実施形態では、遮蔽性部分の少なくとも１つは、免疫グロブリン重鎖定常領域に由来し、活性化可能な遮蔽された抗体の軽鎖可変領域と接合している。

【０２３１】
一実施形態では、第１および第２の遮蔽性部分は、Ｔ細胞受容体アルファ（α）およびベータ（β）定常領域に由来する。一実施形態では、第１の遮蔽性部分はＴ細胞受容体アルファ（α）定常領域を含み、第２の遮蔽性部分はＴ細胞受容体ベータ（β）定常領域を含む。一実施形態では、第１の遮蔽性部分はＴ細胞受容体ベータ（β）定常領域を含み、第２の遮蔽性部分はＴ細胞受容体アルファ（α）定常領域を含む。
【０２３２】
一実施形態では、遮蔽性部分の少なくとも１つは、Ｔ細胞受容体アルファ（α）またはベータ（β）定常領域に由来し、活性化可能な遮蔽された抗体の重鎖可変領域と接合している。一実施形態では、遮蔽性部分の少なくとも１つは、Ｔ細胞受容体ベータ（β）またはアルファ（α）定常領域に由来し、活性化可能な遮蔽された抗体の軽鎖可変領域と接合している。一実施形態では、第１および／または第２の遮蔽性部分は、配列番号２８または２９のアミノ酸配列を有するＴ細胞受容体アルファ（α）またはベータ（β）定常領域を含む。種々の遮蔽性部分のアミノ酸配列の一覧については表１および２を参照されたい。
【０２３３】
一実施形態では、第１または第２の遮蔽性部分は、触媒抗体（例えば、３８Ｃ２）由来の可変重鎖ドメインを含む。一実施形態では、第１または第２の遮蔽性部分は、触媒抗体（例えば、３８Ｃ２）由来の可変軽鎖ドメインを含む。一実施形態では、第１の遮蔽性部分は３８Ｃ２抗体由来の可変重鎖ドメインを含み、第２の遮蔽性部分は３８Ｃ２抗体由来の可変軽鎖ドメインを含む。一実施形態では、第１および／または第２の遮蔽性部分は、配列番号２６または２７のアミノ酸配列を有する触媒抗体３８Ｃ２由来の可変重鎖ドメインを含む。種々の遮蔽性部分のアミノ酸配列の一覧については表１および２を参照されたい。
【０２３４】
一実施形態では、遮蔽性部分（例えば、第１または第２の遮蔽性部分）は、同じポリペプチド鎖に沿ってタンデムに配置された、部分の２つまたはそれよりも多くのコピーを含む。例えば、遮蔽性部分は、タンデムに配置された２つの抗体ＣＨ３領域、またはタンデムに配置された２つの抗体ＣＨ２領域、またはタンデムに配置された２つの抗体ＣＨ１領域、またはタンデムに配置された２つの抗体ＣＬ領域を含む。ＣＨ３、ＣＨ２、ＣＨ１またはＣＬ領域のいずれかは、ノブまたはホール構造を含み得る。例えば、遮蔽性部分は、タンデムに配置された２つのＴＣＲアルファ鎖定常領域、またはタンデムに配置された２つのＴＣＲベータ鎖定常領域を含む。
【０２３５】
一実施形態では、遮蔽性部分（例えば、第１または第２の遮蔽性部分）は、同じポリペプチド鎖に沿ってタンデムに配置された２つまたはそれよりも多くの異なる部分を含む。例えば、遮蔽性部分は、タンデムに配置された抗体ＣＨ２領域と抗体ＣＨ３領域を含む。
【０２３６】
本開示は、同じまたは異なる長さ（例えば、１０～２０、２０～３０、３０～４０または４０～５０アミノ酸の長さ）を有する少なくとも第１および第２のペプチドリンカーを含む本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを提供する。一実施形態では、第１および／または第２のペプチドリンカーは、グリシンリッチ（例えば、ＧＳ型リンカー）である。一実施形態では、第１および第２のペプチドリンカーは、同じアミノ酸配列または異なるアミノ酸配列を有する。
【０２３７】
一実施形態では、第１のペプチドリンカーは、第１のプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第１のペプチドリンカーは、第１のプロテアーゼによる切断の基質であるアミノ酸配列（第１の切断可能部位）を有する。
【０２３８】

一実施形態では、第２のペプチドリンカーは、第２のプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第２のペプチドリンカーは、第２のプロテアーゼによる切断の基質であるアミノ酸配列（第２の切断可能部位）を有する。

【０２３９】

一実施形態では、第１のペプチドリンカーは第１のプロテアーゼで切断可能であり、第２のペプチドリンカーは第２のプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第１および第２のペプチドリンカーは同じプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第１および第２のペプチドリンカーは異なるプロテアーゼで切断可能である。一実施形態では、第１または第２のペプチドリンカーはプロテアーゼで切断可能なものではない。

【０２４０】

一実施形態では、第１およびは第２のプロテアーゼは、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）を含めたマトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）；ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭ１７を含めたディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ（ＡＤＡＭ）プロテアーゼ；ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）またはｕＰＡＲ；セリンプロテアーゼ；システインプロテアーゼ；アスパラギン酸プロテアーゼ；トレオニンプロテアーゼ；カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫまたはカテプシンＬを含めたカテプシン（例えば、システインまたはアスパラギン酸カテプシン）から独立に選択することができる。

【０２４１】

一実施形態では、第１および／または第２のペプチドリンカーは、配列番号３２～４０のうちのいずれか１つのアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％同一であるアミノ酸配列を含む。表３～９に列挙されている種々のペプチドリンカー配列も参照されたい。

【０２４２】

本開示は、第１の重鎖可変領域および第１の軽鎖可変領域を含む抗原結合性ドメインを有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、抗原結合性ドメインが、標的抗原に結合する（例えば、特異的に標的抗原に結合する）、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。

【０２４３】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、配列番号１のアミノ酸配列を有するＥＧＦＲ抗原に結合する、または配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤ３８抗原に結合する。

【０２４４】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、ヒト由来の抗原に結合する。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、ヒト由来の抗原に結合し、かつ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ヤギ、ウサギ、ハムスターおよび／またはサル（例えば、カニクイザル、アカゲザルまたはマカク）などの非ヒト動物の任意の１つまたは任意の組合せ由来の抗原（例えば、相同な抗原）と結合（例えば、交差反応）し得る。

【０２４５】

本開示は、第１および第２のポリペプチド鎖を有する二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。

【０２４６】

一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、配列番号２１、２２または２３のアミノ酸配列を有するＣＨ１、ＣＬ（ラムダまたはカッパ）領域を含む第１の遮蔽性部分を含む。一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、配列番号２４、２５、３０または３１のアミノ酸配列を有するＣＨ３（ＩｇＧ１またはＩｇＧ４）領域を含む第１の遮蔽性部分を含む。一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、配列番号２８または２９のアミノ酸配列を有するＴ細胞受容体アルファ（α）またはベータ（β）定常領域を含む第１の遮蔽性部分

を含む。一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、配列番号２６または２７のアミノ酸配列を有する触媒抗体３８Ｃ２由来の可変重鎖ドメインを含む第１の遮蔽性部分を含む。

【０２４７】

一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、配列番号２１、２２または２３のアミノ酸配列を有するＣＨ１、ＣＬ（ラムダまたはカッパ）領域を含む第２の遮蔽性部分を含む。一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、配列番号２４、２５、３０または３１のアミノ酸配列を有するＣＨ３（ＩｇＧ１またはＩｇＧ４）領域を含む第２の遮蔽性部分を含む。一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、配列番号２８または２９のアミノ酸配列を有するＴ細胞受容体アルファ（α）またはベータ（β）定常領域を含む第２の遮蔽性部分を含む。一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、配列番号２６または２７のアミノ酸配列を有する触媒抗体３８Ｃ２由来の可変重鎖ドメインを含む第２の遮蔽性部分を含む。

【０２４８】

一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、配列番号３２～４０のうちの１つのアミノ酸配列を含む、または表３～９に列挙されているアミノ酸配列のうちのいずれか１つを含む、第１のペプチドリンカーを含む。

【０２４９】

一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、配列番号３２～４０のうちの１つのアミノ酸配列を含む、または表３～９に列挙されているアミノ酸配列のうちのいずれか１つを含む、第２のペプチドリンカーを含む。

【０２５０】

一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、配列番号２または４の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＥＧＦＲ重鎖可変領域配列を含む抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＣＤ３８重鎖可変領域配列を含む抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。

【０２５１】

一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、配列番号３または５の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＥＧＦＲ軽鎖可変領域配列を含む抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、配列番号８、１０、１２または１９の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＣＤ３８軽鎖可変領域配列を含む抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０２５２】

一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、配列番号３または５の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＥＧＦＲ軽鎖可変領域配列を含む抗体軽鎖可

変領域（ＶＬ）を含む。一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、配列番号８、１０、１２または１９の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＣＤ３８軽鎖可変領域配列を含む抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０２５３】

一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、配列番号２または４の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＥＧＦＲ重鎖可変領域配列を含む抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＣＤ３８重鎖可変領域配列を含む抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。

【０２５４】

一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、抗ＥＧＦＲ重鎖定常領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含む抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含む。一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、抗ＣＤ３８重鎖定常領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０由来）を含む抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含む。

【０２５５】

一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、抗ＥＧＦＲ軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含む抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む。一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、抗ＣＤ３８軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含む抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む。

【０２５６】

一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、抗ＥＧＦＲ軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含む抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む。一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、抗ＣＤ３８軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含む抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む。

【０２５７】

一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、抗ＥＧＦＲ重鎖定常領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含む抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含む。一実施形態では、第２のポリペプチド鎖は、抗ＣＤ３８重鎖定常領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０由来）を含む抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含む。

【０２５８】

一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、ＣＤ２８ヒンジ配列（配列番号４４）；ＣＤ８ヒンジ配列（配列番号４５）；ＣＤ２８ヒンジ配列およびＣＤ８ヒンジ配列を含む長いヒンジ（配列番号４６）；ならびに／またはＰＤＧＦＲベータヒンジ配列（配列番号４１）のうちの任意の１つ、または２つもしくはそれよりも多くの任意の組合せのアミノ酸配列を有するヒンジ領域を含む。

【０２５９】

一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、ＣＤ２８膜貫通配列（配列番号４７）またはＰＤＧＦＲベータ膜貫通配列（配列番号４２）のアミノ酸配列を有する膜貫通領域を含

む。

【０２６０】

一実施形態では、第１のポリペプチド鎖は、４－１ＢＢシグナル伝達配列（配列番号４８）；ＣＤ２８シグナル伝達配列（配列番号４９）；ＣＤ３ゼータシグナル伝達配列（配列番号５０）；および／またはＣＤ３ゼータ短シグナル伝達配列（配列番号５１）のアミノ酸配列を有する細胞内シグナル伝達配列を１～３つ、任意の順序および任意の組合せで含む。

【０２６１】

本開示は、抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を妨害する遮蔽性部分の能力に応じて、不活性の状態および活性化された状態を示す、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、個々の遮蔽性部分が重鎖可変領域（第１のポリペプチド鎖上）および軽鎖可変領域（第２のポリペプチド鎖上）のＮ末端にインタクトなペプチドリンカーによって係留されており、遮蔽性部分が、抗原結合性ドメインを妨害し、その結果、不活性の状態をもたらす、二量体化した複合体を形成する。一方または両方のペプチドリンカーの切断により、二量体化した複合体を妨害位置から離して、抗原結合性ドメインとその標的抗原の結合を可能にすることが可能になる。一実施形態では、両方のペプチドリンカーの切断により、二量体化した複合体が遊離して抗原結合性タンパク質から離れる。

【０２６２】

一実施形態では、第１および第２のペプチドリンカーが切断されていない状態にある場合、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、その標的抗原への結合が阻害される（例えば、不活性）。第１および第２のペプチドリンカーが切断されていない状態にある場合、一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、その標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）の低下を示す（例えば、不活性）。一実施形態では、不活性の状態の遮蔽された抗原結合性タンパク質において、第１および第２の遮蔽性部分は互いに会合していても会合していなくてもよい。

【０２６３】

一実施形態では、インタクトな第１および第２のペプチドリンカーを有する遮蔽された抗原結合性タンパク質の標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）は、少なくとも２５～５０％、または少なくとも５０～７５％、または少なくとも７５～９５％、または少なくとも９５～９９％またはそれよりも大きく低下し得る。

【０２６４】

一実施形態では、インタクトな第１および第２のペプチドリンカーを有する遮蔽された抗原結合性タンパク質の標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）は、約２分の１～２０分の１、または約２０分の１～５０分の１、または約５０分の１～２００分の１、または約２００分の１～３５０分の１、または約３５０分の１～５００分の１、またはそれよりも大きな倍率の結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）の低下レベルで低下し得る。

【０２６５】

一実施形態では、インタクトな第１および第２のペプチドリンカーを有する遮蔽された抗原結合性タンパク質の不活性な抗原結合性タンパク質の結合親和性（例えば、K_D）は、約10^{-4}～10^{-8}Ｍである。一実施形態では、標的抗原は、可溶性抗原または細胞表面抗原である。

【０２６６】

本開示は、第１および／または第２のペプチドリンカーが切断された状態にある場合、遮蔽解除され、その標的抗原に結合することが可能である（例えば、活性化された）、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、第１および／または第２のペプチドリンカーが切断された状態にある場合、その標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｂｉｌ

ｉｔｙ）の増大を示す（例えば、活性化された）。例えば、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、第１または第２のペプチドリンカーが切断された場合にのみ、または第１のリンカーおよび第２のリンカーが切断された場合に、その標的抗原に結合し得る。一実施形態では、活性化された状態の遮蔽された抗原結合性タンパク質において、第１および第２の遮蔽性部分は会合していても会合していなくてもよい。

【０２６７】

一実施形態では、第１および／または第２のペプチドリンカーが切断されている、遮蔽解除された抗原結合性タンパク質の標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）は、少なくとも２５～５０％、または少なくとも５０～７５％、または少なくとも７５～９５％、または少なくとも９５～９９％またはそれよりも大きく増大し得る。

【０２６８】

一実施形態では、第１および／または第２のペプチドリンカーが切断されている、遮蔽解除された抗原結合性タンパク質の標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）は、約２～２０倍、または約２０～５０倍、または約５０～２００倍、または約２００～３５０倍、または約３５０～５００倍、またはそれよりも大きな倍率の結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）の増大レベルで増大し得る。

【０２６９】

一実施形態では、第１および／または第２のペプチドリンカーが切断されている、遮蔽解除された抗原結合性タンパク質の、活性化された抗原結合性タンパク質の結合親和性（例えば、K_D）は、約10^{-5}～10^{-12}Ｍである。一実施形態では、標的抗原は、可溶性抗原または細胞表面抗原である。一実施形態では、活性化された形態の抗原結合性タンパク質の結合親和性は、不活性形態と比較して高い。

【０２７０】

一実施形態では、不活性の抗原結合性タンパク質と活性化された抗原結合性タンパク質の間での結合親和性の差異（例えば、不活性のK_Dと、それに対して活性化されたK_D）は、結合親和性の約１０、10^2、10^3、10^4または10^5またはそれよりも大きな差異である。

【０２７１】

本開示は、重鎖可変領域（ＶＨ）および重鎖定常領域（ＣＨ）を有する第１のポリペプチド鎖、ならびに軽鎖可変領域（ＶＬ）および軽鎖定常領域（ＣＬ）を有する第２のポリペプチド鎖を含む、Ｖｅｒｓｉｏｎ　１（例えば、Ｖ１）二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構築物であって、（ａ）第１のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端まで順序づけられた領域：（ｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、（ｉｖ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）、（ｖ）ＣＤ８ヒンジ配列およびＣＤ２８ヒンジ配列を含む長いヒンジ領域（例えば、配列番号４６）、（ｖｉ）ＣＤ２８膜貫通配列（例えば、配列番号４７）を含む膜貫通領域（ＴＭ）、ならびに（ｖｉｉ）ＣＤ２８シグナル伝達配列（例えば、配列番号４９）およびＩＴＡＭモチーフ１、２および３を有するＣＤ３－ゼータシグナル伝達配列（例えば、配列番号５０）を含む細胞内シグナル伝達領域を含み、（ｂ）第２のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端まで順序づけられた領域：（ｉ）第２の遮蔽性部分、（ｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、ならびに（ｉｖ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む、Ｖｅｒｓｉｏｎ　１（例えば、Ｖ１）二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構築物を提供する。一実施形態では、Ｖ１二量体抗原受容体（ＤＡＲ）はペプチドリンカーを欠き、かつ／または遮蔽性部分を欠く。

【０２７２】

一実施形態では、Ｖ１　ＤＡＲ抗体重鎖可変領域（ＶＨ）は、抗ＥＧＦＲ重鎖可変領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含み、抗体重鎖定常領域（ＣＨ）は、抗ＥＧＦＲ重鎖定常領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含む。一実施形態では、Ｖ１　ＤＡＲ抗体重鎖可変領域（ＶＨ）は、抗ＣＤ３８重鎖可変領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０由来）を含み、抗体重

鎖定常領域（ＣＨ）は、抗ＣＤ３８重鎖定常領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０由来）を含む。

【０２７３】

一実施形態では、Ｖ１　ＤＡＲ抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）は、抗ＥＧＦＲ軽鎖可変領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含み、抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）は、抗ＥＧＦＲ軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含む。一実施形態では、Ｖ１　ＤＡＲ抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）は、抗ＣＤ３８軽鎖可変領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含み、抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）は、抗ＣＤ３８軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含む。

【０２７４】

一実施形態では、Ｖｅｒｓｉｏｎ　１（Ｖ１）ＤＡＲ構築物の第１のポリペプチド鎖は、ＰＤＧＦＲベータヒンジ配列（配列番号４１）およびＰＤＧＦＲベータ膜貫通配列（配列番号４２）を含む。

【０２７５】

本開示は、重鎖可変領域（ＶＨ）および重鎖定常領域（ＣＨ）を有する第１のポリペプチド鎖、ならびに軽鎖可変領域（ＶＬ）および軽鎖定常領域（ＣＬ）を有する第２のポリペプチド鎖を含む、Ｖｅｒｓｉｏｎ　２（例えば、Ｖ２）二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構築物であって、（ａ）第１のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端まで順序づけられた領域：（ｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、（ｉｖ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）、（ｖ）ＣＤ２８ヒンジ配列（例えば、配列番号４４）を含む短いヒンジ領域、（ｖｉ）ＣＤ２８膜貫通配列（例えば、配列番号４７）を含む膜貫通領域（ＴＭ）、ならびに（ｖｉｉ）（１）４－１ＢＢシグナル伝達配列（例えば、配列番号４８）とＩＴＡＭモチーフ１、２および３を有するＣＤ３－ゼータ（例えば、配列番号５０）、または（２）ＣＤ２８シグナル伝達配列（例えば、配列番号４９）とＩＴＡＭモチーフ１、２および３を有するＣＤ３－ゼータ（例えば、配列番号５０）、または（３）４－１ＢＢ（例えば、配列番号４８）シグナル伝達配列と、ＣＤ２８シグナル伝達配列（例えば、配列番号４９）と、ＩＴＡＭモチーフ１、２および３を有するＣＤ３－ゼータ（例えば、配列番号５０）、のいずれかを含む、細胞内シグナル伝達領域、を含み、（ｂ）第２のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端まで順序づけられた領域：（ｉ）第２の遮蔽性部分、（ｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、および（ｉｖ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）、を含む、Ｖｅｒｓｉｏｎ　２（例えば、Ｖ２）二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構築物を提供する。一実施形態では、Ｖ２二量体抗原受容体（ＤＡＲ）はペプチドリンカーを欠き、かつ／または遮蔽性部分を欠く。

【０２７６】

一実施形態では、Ｖｅｒｓｉｏｎ　２ａ（Ｖ２ａ）ＤＡＲ構築物は、４－１ＢＢシグナル伝達配列（例えば、配列番号４８）と、ＩＴＡＭモチーフ１、２および３を有するＣＤ３－ゼータ（例えば、配列番号５０）とを有する細胞内シグナル伝達領域を含む。

【０２７７】

一実施形態では、Ｖｅｒｓｉｏｎ　２ｂ（Ｖ２ｂ）ＤＡＲ構築物は、ＣＤ２８シグナル伝達配列（例えば、配列番号４９）と、ＩＴＡＭモチーフ１、２および３を有するＣＤ３－ゼータ（例えば、配列番号５０）とを有する細胞内シグナル伝達領域を含む。

【０２７８】

一実施形態では、Ｖｅｒｓｉｏｎ　２ｃ（Ｖ２ｃ）ＤＡＲ構築物は、４－１ＢＢ（例えば、配列番号４８）シグナル伝達配列と、ＣＤ２８シグナル伝達配列（例えば、配列番号４９）と、ＩＴＡＭモチーフ１、２および３を有するＣＤ３－ゼータ（例えば、配列番号５０）とを有する細胞内シグナル伝達領域を含む。

【０２７９】

一実施形態では、ＤＡＲ　Ｖ２ａおよびＶ２ｂは第２世代ＤＡＲ構築物であり、一方、ＤＡＲ　Ｖ２ｃは第３世代ＤＡＲ構築物である。一実施形態では、抗体重鎖可変領域（Ｖ

Ｈ）は、抗ＥＧＦＲ重鎖可変領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含み、抗体重鎖定常領域（ＣＨ）は、抗ＥＧＦＲ重鎖定常領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含む。一実施形態では、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）は、抗ＣＤ３８重鎖可変領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０由来）を含み、抗体重鎖定常領域（ＣＨ）は、抗ＣＤ３８重鎖定常領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０）を含む。

【０２８０】

一実施形態では、Ｖ２　ＤＡＲ抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）は、抗ＥＧＦＲ軽鎖可変領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含み、抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）は、抗ＥＧＦＲ軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含む。一実施形態では、Ｖ２　ＤＡＲ抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）は、抗ＣＤ３８軽鎖可変領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含み、抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）は、抗ＣＤ３８軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含む。

【０２８１】

一実施形態では、Ｖｅｒｓｉｏｎ　２ａ、２ｂまたは２ｃ　ＤＡＲ構築物の第１のポリペプチド鎖は、ＰＤＧＦＲベータヒンジ配列（配列番号４１）およびＰＤＧＦＲベータ膜貫通配列（配列番号４２）を含む。

【０２８２】

本開示は、重鎖可変領域（ＶＨ）および重鎖定常領域（ＣＨ）を有する第１のポリペプチド鎖、ならびに軽鎖可変領域（ＶＬ）および軽鎖定常領域（ＣＬ）を有する第２のポリペプチド鎖を含む、Ｖｅｒｓｉｏｎ　３（例えば、Ｖ３）二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構築物であって、（ａ）第１のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端まで順序づけられた領域：（ｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、（ｉｖ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）、（ｖ）ＣＤ２８ヒンジ配列（例えば、配列番号４４）を含む短いヒンジ領域、（ｖｉ）ＣＤ２８膜貫通配列（例えば、配列番号４７）を含む膜貫通領域（ＴＭ）、および（ｖｉｉ）４－１ＢＢシグナル伝達配列（例えば、配列番号４８）とＩＴＡＭモチーフ３のみを有するＣＤ３－ゼータシグナル伝達配列（例えば、配列番号５１）とを含む細胞内シグナル伝達領域、を含み、（ｂ）第２のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端まで順序づけられた領域：（ｉ）第２の遮蔽性部分、（ｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、および（ｉｖ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）、を含む、Ｖｅｒｓｉｏｎ　３（例えば、Ｖ３）二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構築物を提供する。一実施形態では、Ｖ３二量体抗原受容体（ＤＡＲ）はペプチドリンカーを欠き、かつ／または遮蔽性部分を欠く。

【０２８３】

一実施形態では、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）は、抗ＥＧＦＲ重鎖可変領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含み、抗体重鎖定常領域（ＣＨ）は、抗ＥＧＦＲ重鎖定常領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含む。一実施形態では、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）は、抗ＣＤ３８重鎖可変領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０由来）を含み、抗体重鎖定常領域（ＣＨ）は、抗ＣＤ３８重鎖定常領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０由来）を含む。

【０２８４】

一実施形態では、Ｖ３　ＤＡＲ抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）は、抗ＥＧＦＲ軽鎖可変領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含み、抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）は、抗ＥＧＦＲ軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含む。一実施形態では、Ｖ３　ＤＡＲ抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）は、抗ＣＤ３８軽鎖可変領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含み、抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）は、抗ＣＤ３８軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含む。

【０２８５】

一実施形態では、Ｖｅｒｓｉｏｎ　３（Ｖ３）ＤＡＲ構築物の第１のポリペプチド鎖は、ＰＤＧＦＲベータヒンジ配列（配列番号４１）およびＰＤＧＦＲベータ膜貫通配列（配列番号４２）を含む。

【０２８６】

本開示は、重鎖可変領域（ＶＨ）および重鎖定常領域（ＣＨ）を有する第１のポリペプチド鎖、ならびに軽鎖可変領域（ＶＬ）および軽鎖定常領域（ＣＬ）を有する第２のポリペプチド鎖を含む、Ｖｅｒｓｉｏｎ　４（例えば、Ｖ４）二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構築物であって、（ａ）第１のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端まで順序づけられた領域：（ｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、（ｉｖ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）、（ｖ）ＣＤ２８膜貫通配列（例えば、配列番号４７）を含む膜貫通領域（ＴＭ）、および（ｖｉ）４－１ＢＢシグナル伝達配列（例えば、配列番号４８）とＩＴＡＭモチーフ３のみを有するＣＤ３－ゼータシグナル伝達配列（例えば、配列番号５１）とを含む細胞内シグナル伝達領域を含み、（ｂ）第２のポリペプチド鎖が、アミノ末端からカルボキシル末端まで順序づけられた領域：（ｉ）第２の遮蔽性部分、（ｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、および（ｉｖ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む、Ｖｅｒｓｉｏｎ　４（例えば、Ｖ４）二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構築物を提供する。ＤＡＲ　Ｖ４構築物は、ヒンジ配列を欠く。一実施形態では、Ｖ４二量体抗原受容体（ＤＡＲ）はペプチドリンカーを欠き、かつ／または遮蔽性部分を欠く。

【０２８７】

一実施形態では、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）は、抗ＥＧＦＲ重鎖可変領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含み、抗体重鎖定常領域（ＣＨ）は、抗ＥＧＦＲ重鎖定常領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含む。一実施形態では、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）は、抗ＣＤ３８重鎖可変領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０由来）を含み、抗体重鎖定常領域（ＣＨ）は、抗ＣＤ３８重鎖定常領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０由来）を含む。

【０２８８】

一実施形態では、Ｖ４　ＤＡＲ抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）は、抗ＥＧＦＲ軽鎖可変領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含み、抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）は、抗ＥＧＦＲ軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含む。一実施形態では、Ｖ４　ＤＡＲ抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）は、抗ＣＤ３８軽鎖可変領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含み、抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）は、抗ＣＤ３８軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含む。

【０２８９】

一実施形態では、Ｖｅｒｓｉｏｎ　４（Ｖ４）ＤＡＲ構築物の第１のポリペプチド鎖は、ＰＤＧＦＲベータヒンジ配列（配列番号４１）およびＰＤＧＦＲベータ膜貫通配列（配列番号４２）を含む。

【０２９０】

本開示は、プロセシング（切断）し、アセンブルして、第２世代および第３世代ＤＡＲ構築物を含めた、ならびにＶｅｒｓｉｏｎ　Ｖ１、Ｖ２ａ、Ｖ２ｂ、Ｖ２ｃ、Ｖ３およびＶ４　ＤＡＲ構築物を含めた、ならびにＥＧＦＲまたはＣＤ３８に結合し得る二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを含めた、本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかにすることができる前駆体ポリペプチド（例えば、図４ＡおよびＢ）をコードする核酸を提供する。

【０２９１】

一実施形態では、核酸は、（ｉ）重鎖リーダー配列、（ｉｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｖ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、（ｖ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）、（ｖｉ）必要に応じたヒンジ領域、（ｖｉｉ）膜貫通領域（ＴＭ）、（

ｖｉｉｉ）細胞内シグナル伝達領域、（ｉｘ）自己切断性配列、（ｘ）軽鎖リーダー配列、（ｘｉ）第２の遮蔽性部分、（ｘｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｘｉｉｉ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、および（ｘｉｖ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第１のペプチドリンカーは、第１の切断可能部位を含む。一実施形態では、第２のペプチドリンカーは、第２の切断可能部位を含む。一実施形態では、自己切断性配列は、Ｔ２Ａ（例えば、アミノ酸配列ＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ、Ｐ２Ａ（例えば、アミノ酸配列（ＧＳＧ）ＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧ、ＰＥ２Ａ（例えば、アミノ酸配列（ＧＳＧ）ＱＣＴＮＹＡＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧ、ＰＦ２Ａ（例えば、アミノ酸配列（ＧＳＧ）ＶＫＱＴＬＮＦＤＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰを含み、ここで、アミノ酸配列（ＧＳＧ）は必要に応じたものである。一実施形態では、前駆体ポリペプチド鎖をコードする核酸は、組換え核酸分子を含む。

【０２９２】

一実施形態では、核酸は、（ｉ）軽鎖リーダー配列、（ｉｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｖ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、（ｖ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）、（ｖｉ）必要に応じたヒンジ領域、（ｖｉｉ）膜貫通領域（ＴＭ）、（ｖｉｉｉ）細胞内シグナル伝達領域、（ｉｘ）自己切断性配列、（ｘ）重鎖リーダー配列、（ｘｉ）第２の遮蔽性部分、（ｘｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｘｉｉｉ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、および（ｘｉｖ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第１のペプチドリンカーは、第１の切断可能部位を含む。一実施形態では、第２のペプチドリンカーは、第２の切断可能部位を含む。一実施形態では、第２のペプチドリンカーは、第２の切断可能部位を含む。一実施形態では、自己切断性配列は、Ｔ２Ａ（例えば、アミノ酸配列ＥＧＲＧＳＬＬＴＣＧＤＶＥＥＮＰＧＰ）、Ｐ２Ａ（例えば、アミノ酸配列（ＧＳＧ）ＡＴＮＦＳＬＬＫＱＡＧＤＶＥＥＮＰＧ）、ＰＥ２Ａ（例えば、アミノ酸配列（ＧＳＧ）ＱＣＴＮＹＡＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧ）、ＰＦ２Ａ（例えば、アミノ酸配列（ＧＳＧ）ＶＫＱＴＬＮＦＤＬＬＫＬＡＧＤＶＥＳＮＰＧＰ）を含み、ここで、アミノ酸配列（ＧＳＧ）は必要に応じたものである。一実施形態では、前駆体ポリペプチド鎖をコードする核酸は、組換え核酸分子を含む。

【０２９３】

一実施形態では、核酸は、配列番号２１、２２または２３のアミノ酸配列を有するＣＨ１、ＣＬ（ラムダまたはカッパ）領域を含む第１および／または第２の遮蔽性部分を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、核酸は、配列番号２４、２５、３０または３１のアミノ酸配列を有するＣＨ３（ＩｇＧ１またはＩｇＧ４）領域を含む第１および／または第２の遮蔽性部分を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、核酸は、配列番号２８または２９のアミノ酸配列を有するＴ細胞受容体アルファ（α）またはベータ（β）定常領域を含む第１および／または第２の遮蔽性部分を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、核酸は、配列番号２６または２７のアミノ酸配列を有する触媒抗体３８Ｃ２由来の可変重鎖ドメインを含む第１および／または第２の遮蔽性部分を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。

【０２９４】

一実施形態では、核酸は、配列番号３２～４０のうちの１つのアミノ酸配列を含むまたは表３～９に列挙されているアミノ酸配列のうちのいずれか１つを含む第１および／または第２のペプチドリンカーを含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。

【０２９５】

一実施形態では、核酸は、配列番号２または４の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＥＧＦＲ重鎖可変領域配列を含む抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を

含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、核酸は、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＣＤ３８重鎖可変領域配列を含む抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。

【０２９６】

一実施形態では、核酸は、抗ＥＧＦＲ重鎖定常領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含む抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、核酸は、抗ＣＤ３８重鎖定常領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０由来）を含む抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。

【０２９７】

一実施形態では、核酸は、配列番号３または５の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＥＧＦＲ軽鎖可変領域配列を含む抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、核酸は、配列番号８、１０、１２または１９の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＣＤ３８軽鎖可変領域配列を含む抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。

【０２９８】

一実施形態では、核酸は、抗ＥＧＦＲ軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含む抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、核酸は、抗ＣＤ３８軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含む抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。

【０２９９】

一実施形態では、核酸は、ＣＤ２８ヒンジ配列（配列番号４４）；ＣＤ８ヒンジ配列（配列番号４５）；ＣＤ２８ヒンジ配列およびＣＤ８ヒンジ配列を含む長いヒンジ（配列番号４６）；ならびに／またはＰＤＧＦＲベータヒンジ配列（配列番号４１）のうちの任意の１つ、または２つもしくはそれよりも多くの任意の組合せのアミノ酸配列を有するヒンジ領域を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。

【０３００】

一実施形態では、核酸は、ＣＤ２８膜貫通配列（配列番号４７）またはＰＤＧＦＲベータ膜貫通配列（配列番号４２）のアミノ酸配列を有する膜貫通領域を含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。

【０３０１】

一実施形態では、核酸は、４－１ＢＢシグナル伝達配列（配列番号４８）；ＣＤ２８シグナル伝達配列（配列番号４９）；ＣＤ３ゼータシグナル伝達配列（配列番号５０）；および／またはＣＤ３ゼータ短シグナル伝達配列（配列番号５１）のアミノ酸配列を有する１～３種の細胞内シグナル伝達配列を任意の順序および任意の組合せで含む前駆体ポリペプチド鎖をコードする。

【０３０２】

本開示は、第１のポリペプチド鎖をコードする第１の核酸および第２のポリペプチド鎖

をコードする第２の核酸（例えば、図４ＣおよびＤ）を提供し、ここで、第１および第２のポリペプチド鎖が互いに会合／二量体化して、第２世代および第３世代ＤＡＲ構築物を含めた、ならびにＶｅｒｓｉｏｎ　Ｖ１、Ｖ２ａ、Ｖ２ｂ、Ｖ２ｃ、Ｖ３およびＶ４　ＤＡＲ構築物を含めた、ならびにＥＧＦＲまたはＣＤ３８に結合し得る二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを含めた、本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを形成し得る。

【０３０３】

一実施形態では、第１の核酸は、（ｉ）重鎖リーダー配列、（ｉｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｖ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、（ｖ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）、（ｖｉ）必要に応じたヒンジ領域、（ｖｉｉ）膜貫通領域（ＴＭ）、および（ｖｉｉｉ）細胞内シグナル伝達領域を含む第１のポリペプチド鎖をコードする（例えば、図４Ｃ）。

【０３０４】

一実施形態では、第２の核酸は、（ｉ）軽鎖リーダー配列、（ｉｉ）第２の遮蔽性部分、（ｉｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｉｖ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、および（ｘ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第２のポリペプチド鎖をコードする（例えば、図４Ｃ）。

【０３０５】

一実施形態では、第１のペプチドリンカーは、第１の切断可能部位を含む。一実施形態では、第２のペプチドリンカーは、第２の切断可能部位を含む。一実施形態では、第１および第２の核酸は、それぞれ組換え核酸分子を含む、第１および第２の鎖をコードする。

【０３０６】

一実施形態では、第１の核酸は、（ｉ）軽鎖リーダー配列、（ｉｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｖ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、（ｖ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）、（ｖｉ）必要に応じたヒンジ領域、（ｖｉｉ）膜貫通領域（ＴＭ）、および（ｖｉｉｉ）細胞内シグナル伝達領域を含む第１のポリペプチド鎖をコードする（例えば、図４Ｄ）。

【０３０７】

一実施形態では、第２の核酸は、（ｉ）重鎖リーダー配列、（ｉｉ）第２の遮蔽性部分、（ｉｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｉｖ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、および（ｘ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）をコードする（例えば、図４Ｄ）。

【０３０８】

一実施形態では、第１のペプチドリンカーは、第１の切断可能部位を含む。一実施形態では、第２のペプチドリンカーは、第２の切断可能部位を含む。一実施形態では、第１および第２の核酸は、それぞれ組換え核酸分子を含む、第１および第２の鎖をコードする。

【０３０９】

一実施形態では、第１の核酸は、配列番号２１、２２または２３のアミノ酸配列を有するＣＨ１、ＣＬ（ラムダまたはカッパ）領域を含む第１の遮蔽性部分を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第１の核酸は、配列番号２４、２５、３０または３１のアミノ酸配列を有するＣＨ３（ＩｇＧ１またはＩｇＧ４）領域を含む第１の遮蔽性部分を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第１の核酸は、配列番号２８または２９のアミノ酸配列を有するＴ細胞受容体アルファ（α）またはベータ（β）定常領域を含む第１の遮蔽性部分を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第１の核酸は、配列番号２６または２７のアミノ酸配列を有する触媒抗体３８Ｃ２由来の可変重鎖ドメインを含む第１の遮蔽性部分を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。

【０３１０】

一実施形態では、第２の核酸は、配列番号２１、２２または２３のアミノ酸配列を有するＣＨ１、ＣＬ（ラムダまたはカッパ）領域を含む第２の遮蔽性部分を含む第２のポリペ

プチド鎖をコードする。一実施形態では、第２の核酸は、配列番号２４、２５、３０または３１のアミノ酸配列を有するＣＨ３（ＩｇＧ１またはＩｇＧ４）領域を含む第２の遮蔽性部分を含む第２のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第２の核酸は、配列番号２８または２９のアミノ酸配列を有するＴ細胞受容体アルファ（α）またはベータ（β）定常領域を含む第２の遮蔽性部分を含む第２のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第２の核酸は、配列番号２６または２７のアミノ酸配列を有する触媒抗体３８Ｃ２由来の可変重鎖ドメインを含む第２の遮蔽性部分を含む第２のポリペプチド鎖をコードする。

【０３１１】

一実施形態では、第１の核酸は、配列番号３２～４０のうちの１つのアミノ酸配列を含む、または表３～９に列挙されているアミノ酸配列のうちのいずれか１つを含む、第１のペプチドリンカーを含む第１のポリペプチド鎖をコードする。

【０３１２】

一実施形態では、第２の核酸は、配列番号３２～４０のうちの１つのアミノ酸配列を含む、または表３～９に列挙されているアミノ酸配列のうちのいずれか１つを含む、第２のペプチドリンカーを含む第２のポリペプチド鎖をコードする。

【０３１３】

一実施形態では、第１の核酸は、配列番号２または４の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＥＧＦＲ重鎖可変領域配列を含む抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第１の核酸は、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＣＤ３８重鎖可変領域配列を含む抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。

【０３１４】

一実施形態では、第１の核酸は、配列番号３または５の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＥＧＦＲ軽鎖可変領域配列を含む抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第１の核酸は、配列番号８、１０、１２または１９の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＣＤ３８軽鎖可変領域配列を含む抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。

【０３１５】

一実施形態では、第２の核酸は、配列番号３または５の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＥＧＦＲ軽鎖可変領域配列を含む抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む第２のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第２の核酸は、配列番号８、１０、１２または１９の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少な

くとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＣＤ３８軽鎖可変領域配列を含む抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む第２のポリペプチド鎖をコードする。

【０３１６】

一実施形態では、第２の核酸は、配列番号２または４の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＥＧＦＲ重鎖可変領域配列を含む抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む第２のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第２の核酸は、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０の一部または全長に対して少なくとも９２％、もしくは少なくとも９３％、もしくは少なくとも９４％、もしくは少なくとも９５％、もしくは少なくとも９６％、もしくは少なくとも９７％、もしくは少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有する、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する抗ＣＤ３８重鎖可変領域配列を含む抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む第２のポリペプチド鎖をコードする。

【０３１７】

一実施形態では、第１の核酸は、抗ＥＧＦＲ重鎖定常領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含む抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第１の核酸は、抗ＣＤ３８重鎖定常領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０由来）を含む抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。

【０３１８】

一実施形態では、第１の核酸は、抗ＥＧＦＲ軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含む抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第１の核酸は、抗ＣＤ３８軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含む抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。

【０３１９】

一実施形態では、第２の核酸は、抗ＥＧＦＲ軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号３または５由来）を含む抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第２のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第２の核酸は、抗ＣＤ３８軽鎖定常領域配列（例えば、配列番号８、１０、１２または１９由来）を含む抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む第２のポリペプチド鎖をコードする。

【０３２０】

一実施形態では、第２の核酸は、抗ＥＧＦＲ重鎖定常領域配列（例えば、配列番号２または４由来）を含む抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第２のポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、第２の核酸は、抗ＣＤ３８重鎖定常領域配列（例えば、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８または２０由来）を含む抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含む第２のポリペプチド鎖をコードする。

【０３２１】

一実施形態では、第１の核酸は、ＣＤ２８ヒンジ配列（配列番号４４）；ＣＤ８ヒンジ配列（配列番号４５）；ＣＤ２８ヒンジ配列およびＣＤ８ヒンジ配列を含む長いヒンジ（配列番号４６）；ならびに／またはＰＤＧＦＲベータヒンジ配列（配列番号４１）のうちの任意の１つ、または２つもしくはそれよりも多くの任意の組合せのアミノ酸配列を有するヒンジ領域を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。

【０３２２】

一実施形態では、第１の核酸は、ＣＤ２８膜貫通配列（配列番号４７）またはＰＤＧＦ

Ｒベータ膜貫通配列（配列番号４２）のアミノ酸配列を有する膜貫通領域を含む第１のポリペプチド鎖をコードする。

【０３２３】

一実施形態では、第１の核酸は、４－１ＢＢシグナル伝達配列（配列番号４８）；ＣＤ２８シグナル伝達配列（配列番号４９）；ＣＤ３ゼータシグナル伝達配列（配列番号５０）；および／またはＣＤ３ゼータ短シグナル伝達配列（配列番号５１）のアミノ酸配列を有する１～３種の細胞内シグナル伝達配列を任意の順序および任意の組合せで含む第１のポリペプチド鎖をコードする。

【０３２４】

本開示は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの前駆体ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に接合した発現ベクターを含めたベクターを提供する。

【０３２５】

一実施形態では、発現ベクターは、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの前駆体ポリペプチドをコードする核酸の転写を制御する１つまたは複数の調節配列（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）を含む。一実施形態では、発現ベクターは、それぞれが前駆体ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に接合した１つまたは複数の調節配列を含む。

【０３２６】

一実施形態では、発現ベクターを宿主細胞に導入し、ここで、宿主細胞内の発現ベクターは、前駆体ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に接合したプロモーター（および必要に応じてエンハンサー配列）を有する。したがって、宿主細胞は、コードされる、本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを構成する前駆体ポリペプチドを発現（転写および翻訳）し得る。

【０３２７】

一実施形態では、前駆体ポリペプチドは、前駆体ポリペプチドが自己切断性配列において切断されて、第１および第２のポリペプチド鎖が遊離すること、および前駆体が分泌されること、および／または前駆体が宿主細胞の細胞膜内に繋ぎとめられることにより、プロセシングされ得る。一実施形態では、前駆体ポリペプチドが自己切断性配列において切断され、それにより、それぞれがＮ末端にリーダーシグナル配列を有する第１および第２のポリペプチド鎖が生成され得る。

【０３２８】

一実施形態では、第１および第２のポリペプチド鎖の遊離後、第１および第２のポリペプチド鎖は、抗体重鎖定常領域と抗体軽鎖定常領域の間の少なくとも１つのジスルフィド結合を介して二量体化（アセンブル）し得る。

【０３２９】

ベクターは、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターであるプロモーターを含む。本明細書に記載の前駆体ポリペプチドのいずれかを一過性にまたは安定に発現するトランスジェニック宿主細胞が生成されるように、ベクターおよび宿主細胞を選択することができる。

【０３３０】

発現ベクターは、レトロウイルス、レンチウイルスまたはアデノウイルスに由来する核酸骨格配列を含み得る。発現ベクターは、誘導性および／または構成的プロモーターおよびエンハンサーなどの１つまたは複数の調節配列を含み得る。発現ベクターは、リボソーム結合性部位および／またはポリアデニル化部位を含み得る。

【０３３１】

一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構築物をコードする核酸に作動可能に連結した発現ベクターにより、トランスジェニック宿主細胞の表面にディスプレイされ得る二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構築物の産生を方向づけることができる、または二量体抗原受容体を細胞培養培地中に分泌させることができる。

【０３３２】
本開示は、第１のポリペプチド鎖をコードするおよび／または第２のポリペプチド鎖をコードする核酸に作動可能に接合したベクターであって、第１および第２のポリペプチド鎖が、互いに会合／二量体化して、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を形成する、ベクターを提供する。
【０３３３】
一実施形態では、第１のベクター（例えば、第１の発現ベクター）は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第１のポリペプチド鎖をコードする第１の核酸に作動可能に接合している。
【０３３４】
一実施形態では、第２のベクター（例えば、第２の発現ベクター）は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第２のポリペプチド鎖をコードする第２の核酸に作動可能に接合している。
【０３３５】
一実施形態では、第１のベクター（例えば、第１の発現ベクター）は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第１のポリペプチド鎖をコードする第１の核酸に作動可能に接合しており、第１のベクターはまた、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第２のポリペプチド鎖をコードする第２の核酸にも作動可能に接合している。
【０３３６】
一実施形態では、発現ベクターは、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの前駆体ポリペプチドをコードする核酸の転写を制御する１つまたは複数の調節配列（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）を含む。一実施形態では、発現ベクターは、それぞれが前駆体ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に接合した１つまたは複数の調節配列を含む。
【０３３７】
一実施形態では、発現ベクターを宿主細胞に導入し、ここで、宿主細胞内の発現ベクターは、前駆体ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に接合したプロモーター（および必要に応じてエンハンサー配列）を有する。したがって、宿主細胞は、コードされる、本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを構成する前駆体ポリペプチドを発現（転写および翻訳）し得る。
【０３３８】
一実施形態では、第１および第２のポリペプチド鎖の発現後、第１および第２のポリペプチド鎖は、抗体重鎖定常領域と抗体軽鎖定常領域の間の少なくとも１つのジスルフィド結合を介して二量体化（アセンブル）し得る（例えば、図３ＡおよびＢ）。
【０３３９】
ベクターは、誘導性プロモーターまたは構成的プロモーターであるプロモーターを含む。本明細書に記載の前駆体ポリペプチドのいずれかを一過性にまたは安定に発現するトランスジェニック宿主細胞が生成されるように、ベクターおよび宿主細胞を選択することができる。
【０３４０】
発現ベクターは、レトロウイルス、レンチウイルスまたはアデノウイルスに由来する核酸骨格配列を含み得る。発現ベクターは、誘導性および／または構成的プロモーターおよびエンハンサーなどの１つまたは複数の調節配列を含み得る。発現ベクターは、リボソーム結合性部位および／またはポリアデニル化部位を含み得る。
【０３４１】
一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構築物をコードする核酸に作動可能に連結した発現ベクターにより、トランスジェニック宿主細胞の表面にディスプレイされ得る二量体抗原受容体（ＤＡＲ）構築物の産生を方向づけることができる、または二量体抗原受容体を細胞培養培地中に分泌させることができる。

【０３４２】
本開示は、互いに会合／二量体化して二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質になり得る第１および／または第２のポリペプチド鎖をコードする核酸のいずれかに作動可能に接合した１つまたは複数の発現ベクターを有する宿主細胞または宿主細胞の集団を提供する。
【０３４３】
一実施形態では、第１の宿主細胞または第１の宿主細胞の集団は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第１のポリペプチド鎖をコードする第１の核酸に作動可能に接合した第１のベクター（例えば、第１の発現ベクター）を有する。
【０３４４】
一実施形態では、第２の宿主細胞または第２の宿主細胞の集団は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第２のポリペプチド鎖をコードする第２の核酸に作動可能に接合した第２のベクター（例えば、第２の発現ベクター）を有する。
【０３４５】
一実施形態では、第１の宿主細胞または第１の宿主細胞の集団は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第１のポリペプチド鎖をコードする第１の核酸に作動可能に接合した第１のベクター（例えば、第１の発現ベクター）を有し、第１の宿主細胞または第１の宿主細胞の集団はまた、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第２のポリペプチド鎖をコードする第２の核酸に作動可能に接合した第２のベクターも有する。
【０３４６】
一実施形態では、第１の宿主細胞または第１の宿主細胞の集団は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第１のポリペプチド鎖をコードする第１の核酸に作動可能に接合した第１のベクター（例えば、第１の発現ベクター）を有し、第１のベクターはまた、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第２のポリペプチド鎖をコードする第２の核酸にも作動可能に接合している。
【０３４７】
宿主細胞は、細菌細胞または哺乳動物細胞であり得る。一実施形態では、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を含む。宿主細胞または宿主細胞の集団は、Ｔリンパ球（例えば、Ｔ細胞、調節性Ｔ細胞、ガンマ－デルタＴ細胞、および細胞傷害性Ｔ細胞）、ＮＫ（ナチュラルキラー）細胞、マクロファージ、樹状細胞、肥満細胞、好酸球、Ｂリンパ球、単球を含む。一実施形態では、ＮＫ細胞は、臍帯血由来ＮＫ細胞、または胎盤由来ＮＫ細胞を含む。
【０３４８】
一実施形態では、第１の発現ベクターを第１の宿主細胞または第１の宿主細胞の集団に導入し、ここで、第１の発現ベクターは、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第１のポリペプチド鎖をコードする第１の核酸に作動可能に連結している。
【０３４９】
一実施形態では、第２の発現ベクターを第２の宿主細胞または第２の宿主細胞の集団に導入し、ここで、第２の発現ベクターは、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第２のポリペプチド鎖をコードする第２の核酸に作動可能に連結している。
【０３５０】
一実施形態では、第１および第２の発現ベクターを第１の宿主細胞または第１の宿主細胞の集団に導入し、ここで、第１の発現ベクターは、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む

活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第１のポリペプチド鎖をコードする第１の核酸に作動可能に連結しており、第２の発現ベクターは、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第２のポリペプチド鎖をコードする第２の核酸に作動可能に連結している。

【０３５１】

一実施形態では、第１の発現ベクターを第１の宿主細胞または第１の宿主細胞の集団に導入し、ここで、第１の発現ベクターは、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第１のポリペプチド鎖をコードする第１の核酸に作動可能に連結しており、第１の発現ベクターはまた、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの第２のポリペプチド鎖をコードする第２の核酸にも作動可能に連結している。

【０３５２】

一実施形態では、少なくとも１つの発現ベクターを宿主細胞に、リポフェクション（例えば、脂質界面活性物質を使用する）；電気穿孔；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、ＤＥＡＥ－デキストラン、または他の物質を使用したトランスフェクション；ウイルスによるトランスフェクション；非ウイルストランスフェクション；微粒子銃；および感染（例えば、ベクターが感染因子である場合）によって導入する。

【０３５３】

本開示は、第２世代および第３世代ＤＡＲ構築物を含めた、ならびにＶｅｒｓｉｏｎ Ｖ１、Ｖ２ａ、Ｖ２ｂ、Ｖ２ｃ、Ｖ３およびＶ４　ＤＡＲ構築物を含めた、ならびにＥＧＦＲまたはＣＤ３８に結合し得る二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを含めた、本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを調製するための方法を提供する。二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を調製するための方法は、宿主細胞の集団を培養するステップを含み、ここで、集団内の個々の宿主細胞が、本明細書に記載の第１および／または第２のポリペプチド鎖をコードする第１および／または第２の核酸に作動可能に連結した発現ベクターを有し、培養するステップを、宿主細胞の集団による第１および／または第２のポリペプチドの発現に適した条件下で行う。

【０３５４】

一実施形態では、第１および／または第２のポリペプチド鎖をコードする核酸は、宿主細胞による発現された第１および／または第２のポリペプチドの分泌のための軽鎖および／または重鎖リーダー配列をさらにコードする。一実施形態では、培養するステップを、宿主細胞の集団による第１および／または第２のポリペプチドの分泌に適した条件下で行う。

【０３５５】

一実施形態では、第１および／または第２のポリペプチドをコードする核酸は、発現されたポリペプチドを富化するためのアフィニティータグ配列をさらにコードする。例示的なアフィニティータグ配列は、ヒスチジンタグ、ＦＬＡＧタグ、ｍｙｃタグ、ＨＡタグ、およびＧＳＴタグを含む。

【０３５６】

一実施形態では、本明細書に記載のＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを調製するための方法は、発現された重鎖および／または軽鎖を単離するステップをさらに含む。

【０３５７】

一実施形態では、培養するステップを、ＩｇＧ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を形成するための重鎖と軽鎖のアセンブリまたは会合に適した条件下で行う。

【０３５８】

一実施形態では、本明細書に記載のＤＡＲ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結

合性タンパク質のいずれかを調製するための方法は、発現された前駆体ＤＡＲポリペプチドを単離するステップをさらに含む。一実施形態では、本明細書に記載のＤＡＲ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを調製するための方法は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を形成する、プロセシング／切断／アセンブルされたポリペプチドを単離するステップをさらに含む。

【０３５９】

一実施形態では、培養するステップを、前駆体ＤＡＲポリペプチドの発現、分泌および切断、ならびに、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を形成するための、得られた２本のポリペプチド鎖（第１および第２のポリペプチド鎖）のアセンブリ、に適した条件下で行う。

【０３６０】

一実施形態では、本明細書に記載のＤＡＲ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを調製するための方法は、発現された第１および／または第２のポリペプチドを単離するステップをさらに含む。一実施形態では、本明細書に記載のＤＡＲ型抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを調製するための方法は、第１および第２のＤａｒポリペプチド鎖の会合／二量体化によって形成された二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を単離するステップをさらに含む。

【０３６１】

一実施形態では、培養するステップを、第１および／または第２のポリペプチド鎖の発現、ならびに二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を形成するための第１および第２のポリペプチド鎖のアセンブリに適した条件下で行う。

【０３６２】

一実施形態では、方法は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含むアセンブルされた活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を単離または回収するステップをさらに含む。一実施形態では、単離するステップを、アフィニティークロマトグラフィーを使用して行う。一実施形態では、単離するステップを、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ由来のプロテインＡまたはＧ、グルタチオンＳ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、または免疫親和性を用いたアフィニティークロマトグラフィーを使用して行う。一実施形態では、陽イオン交換、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、混合モードクロマトグラフィーおよび／またはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを含む１つまたは複数の追加的な単離するステップを行う。

【０３６３】

一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含むアセンブルされた活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、第１および第２のポリペプチド鎖を含み、ここで、（ａ）第１のポリペプチド鎖は、（ｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、（ｉｖ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）、（ｖ）必要に応じたヒンジ領域、（ｖｉ）膜貫通領域（ＴＭ）、および（ｖｉｉ）細胞内シグナル伝達領域を含み、（ｂ）第２のポリペプチド鎖は、（ｉ）第２の遮蔽性部分、（ｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、および（ｉｖ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含み、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）と抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）が標的抗原に結合する抗原結合性ドメインを形成する。

【０３６４】

一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含むアセンブルされた活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、第１および第２のポリペプチド鎖を含み、ここで、（ａ）第１のポリペプチド鎖は、（ｉ）第１の遮蔽性部分、（ｉｉ）第１のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、（ｉｖ）抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）、（ｖ）必要に応じたヒンジ領域、（ｖｉ）膜貫通領域（ＴＭ）、および（ｖｉｉ）細胞内シグナル伝達領域を含み、（ｂ）第２のポリペプチド鎖は、（ｉ）第２の遮蔽性部分、（ｉｉ）第２のペプチドリンカー、（ｉｉｉ）抗体重鎖可変領域

（ＶＨ）、および（ｉｖ）抗体重鎖定常領域（ＣＨ）を含み、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）と抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）が標的抗原に結合する抗原結合性ドメインを形成する。

【０３６５】

二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、当技術分野で周知の方法を使用したトランスジェニック宿主細胞による発現、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイおよびヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウスを使用して調製することができる。一実施形態では、トランスジェニック宿主細胞による発現を使用した抗原結合性タンパク質の収率は、形成される活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の総量の約２０～８０％、または約３０～９０％、または約４０～９５％、または約５０～９９％であり得る。

【０３６６】

本開示は、本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかの少なくとも１つのペプチドリンカーを切断するための方法であって、（ａ）少なくとも１種のプロテアーゼを、不活性形態の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質ＤＡＲと接触させるステップであって、第１および第２のペプチドリンカーが切断されていない状態である、ステップを含む方法を提供する。

【０３６７】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ（ＡＤＡＭ）プロテアーゼ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭ１７、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、カテプシン（例えば、システインまたはアスパラギン酸カテプシン）、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫまたはカテプシンＬから選択される２種またはそれよりも多くのプロテアーゼのうちの１つまたは任意の組合せと接触させる。

【０３６８】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を、２種もしくはそれよりも多くのプロテアーゼと基本的に同時に（ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓｌｙ）（同時に（ａｔ　ｔｈｅ　ｓａｍｅ　ｔｉｍｅ））接触させる、または２種もしくはそれよりも多くのプロテアーゼと、任意の順序で逐次的に接触させる。

【０３６９】

一実施形態では、ステップ（ａ）において使用される活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のペプチドリンカーのうちの少なくとも１つは、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ（ＡＤＡＭ）プロテアーゼ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭ１７、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、カテプシン（例えば、システインまたはアスパラギン酸カテプシン）、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫまたはカテプシンＬを含めた１種または複数種のプロテアーゼで切断可能な切断可能部位を含む。

【０３７０】

一実施形態では、方法は、（ｂ）切断されていない活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を活性化された形態に変換するために、ペプチドリンカーのうちの少なくとも１つを切断するステップをさらに含む。一実施形態では、活性化された形態は、標的抗原に結合し得る。

【０３７１】

一実施形態では、方法は、（ｃ）活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質（今や

活性化された状態である）を標的抗原に結合させるステップをさらに含む。

【０３７２】

一実施形態では、接触させるステップ、切断するステップおよび結合させるステップをｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏ条件で行う。

【０３７３】

一実施形態では、標的抗原は、可溶性抗原または表面抗原を含む。一実施形態では、標的抗原は、健康な細胞または疾患細胞によって発現される。

【０３７４】

一実施形態では、標的抗原を発現する疾患細胞（例えば、腫瘍またはがん細胞）は、ペプチドリンカーを切断する１種または複数種のプロテアーゼも発現する。一実施形態では、疾患細胞は、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ（ＡＤＡＭ）プロテアーゼ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭ１７、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、カテプシン（例えば、システインまたはアスパラギン酸カテプシン）、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫおよび／またはカテプシンＬを含む２種またはそれよりも多くのプロテアーゼのうちの１つまたは組合せを発現する。

【０３７５】

一実施形態では、方法は、（ｄ）活性化された遮蔽された抗原結合性タンパク質を疾患細胞に結合させることによって疾患細胞（例えば、腫瘍またはがん細胞）を死滅させるステップをさらに含む。

【０３７６】

一実施形態では、ペプチドリンカーのうちの少なくとも１つは、腫瘍微小環境中に存在するプロテアーゼで切断可能である。

【０３７７】

一実施形態では、腫瘍微小環境は、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ（ＡＤＡＭ）プロテアーゼ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭ１７、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、カテプシン（例えば、システインまたはアスパラギン酸カテプシン）、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫおよびカテプシンＬからなる群から選択されるプロテアーゼを含む。

【０３７８】

本開示は、腫瘍関連抗原の発現または過剰発現に関連する疾患を有する対象を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを発現する宿主細胞の集団を含む治療用組成物を有効量で投与するステップを含む、方法を提供する。一実施形態では、宿主細胞の集団は、切断されていない状態の第１および第２のペプチドリンカーを有する（例えば、活性化可能な）、不活性形態の、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を発現する。一実施形態では、宿主細胞の集団は、第２世代および第３世代ＤＡＲ構築物を含めた、ならびにＶｅｒｓｉｏｎ　Ｖ１、Ｖ２ａ、Ｖ２ｂ、Ｖ２ｃ、Ｖ３およびＶ４　ＤＡＲ構築物を含めた、ならびにＥＧＦＲまたはＣＤ３８に結合し得る二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを含めた、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを発現し得る。一実施形態では、本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを発

現する宿主細胞の集団を、対象に、腫瘍またはがん抗原の発現に関連する疾患または障害の測定可能な改善または予防をもたらすために十分である量で投与する。

【０３７９】

一実施形態では、対象を処置するために使用される宿主細胞または宿主細胞の集団は、自己のものであり、処置を受ける対象に由来する。一実施形態では、対象から全血を得ることができ、所望の細胞（例えば、Ｔリンパ球、ＮＫ細胞またはマクロファージ）を全血から回収することができる。

【０３８０】

一実施形態では、対象を処置するために使用される宿主細胞または宿主細胞の集団は、同種のものであり、異なる対象に由来する。同種細胞は、異なる対象由来の全血から、自己細胞に関して使用されるものと同じ様式で得ることができる。一実施形態では、同種細胞は、妊娠後の胎盤または臍帯組織に由来する。

【０３８１】

一実施形態では、所望の細胞を、処置を受ける対象から、または異なる対象から得、第１または第２のポリペプチド、または前駆体ポリペプチドのいずれかの発現を方向づける１つまたは複数の発現ベクターを有するように工学的に操作し、それにより、トランスジェニック宿主細胞を生成する。トランスジェニック宿主細胞は、第１または第２のポリペプチド、または前駆体ポリペプチドを発現し得る。宿主細胞は、第１および第２のポリペプチド鎖を発現し得、それらが二量体化して、対象における腫瘍抗原に特異的に結合する二量体抗原受容体を形成する。宿主細胞は、前駆体ポリペプチド鎖を発現し得、それが切断されて、第１および第２のポリペプチド鎖を形成し得、それらが二量体化して対象における腫瘍抗原に特異的に結合する二量体抗原受容体を形成する。トランスジェニック宿主細胞（例えば、発現ベクター（複数可）を有する、またはポリペプチド鎖を発現する）を、腫瘍抗原の過剰発現に関連する疾患、障害または状態を処置するために、対象に投与することができる。

【０３８２】

本開示は、腫瘍抗原の有害な発現に関連する疾患、障害または状態を有する対象を処置する方法であって、障害が、これだけに限定されないが、血液のがん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、頭頸部がん、肺がん、膀胱がん、黒色腫、結腸直腸がん、膵がん、肺がん、肝がん、腎がん、食道がん、平滑筋腫、平滑筋肉腫、神経膠腫、および神経膠芽腫を含めたがんである、方法を提供し、ここで、対象を処置するための方法は、対象に、本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを発現する宿主細胞の集団を含む治療用組成物を有効量で投与するステップを含む。

【０３８３】

一実施形態では、がんは、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、バーキットリンパ腫（ＢＬ）、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病（Ｂ－ＣＬＬ）、Ｂ細胞およびＴ細胞急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、Ｔ細胞リンパ腫（ＴＣＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、ホジキンリンパ腫（ＨＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）および多発性骨髄腫（ＭＭ）からなる群から選択される血液のがんである。

【０３８４】

本開示は、がんまたは腫瘍などの患部組織を検出、診断、モニタリングおよび／または病期分類するために、プロテアーゼの活性および特異性を検出するための、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける切断に基づく方法を提供する。腫瘍またはがん塊を対象から抽出し、それぞれが既知のプロテアーゼ切断プロファイルを有する少なくとも１つのペプチドリンカーを有する、２つまたはそれよりも多くの本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のうちの１つまたは任意の組合せと接触させることができる。対象由来の腫瘍またはがん塊により、１種または複数種のプロテアーゼが産生される。方法は、（ａ）患部組織を、１つまたは複数の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質と、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質（複数可）の

少なくとも１つのペプチドリンカーがプロテアーゼ（複数可）により切断されてペプチド切断産物が生成されるのに適した条件下で、接触させるステップを含む。方法は、（ｂ）ペプチド切断産物を、例えば任意の方法を使用して、検出するステップをさらに含む。したがって、腫瘍またはがん塊によって産生されたプロテアーゼの型を同定することができる。一実施形態では、患部組織を、第２世代および第３世代ＤＡＲ構築物を含めた、ならびにＶｅｒｓｉｏｎ　Ｖ１、Ｖ２ａ、Ｖ２ｂ、Ｖ２ｃ、Ｖ３およびＶ４　ＤＡＲ構築物を含めた、ならびにＥＧＦＲまたはＣＤ３８に結合し得る二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを含めた、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質の１つまたは複数と接触させる。

【０３８５】

一実施形態では、ペプチドリンカーは、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）、ＡＤＡＭプロテアーゼ、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、カテプシン（例えば、システインまたはアスパラギン酸カテプシン）、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫおよびカテプシンＬからなる群から選択される２種またはそれよりも多くのプロテアーゼのうちの任意の１つまたは任意の組合せで切断可能である。

【０３８６】

本開示は、対象由来の腫瘍によって産生されたプロテアーゼの存在を検出するための方法であって、（ａ）（ｉ）対象から得られた腫瘍を、（ｉｉ）本明細書に記載の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のうちの少なくとも１つと接触させるステップであって、腫瘍試料によりプロテアーゼが産生される、ステップを含む、方法を提供する。

【０３８７】

一実施形態では、第１のペプチドリンカーは、第１の切断可能部位を含み、第２のペプチドリンカーは、第２の切断可能部位を含む。一実施形態では、第１および／または第２の切断可能部位のアミノ酸配列は、腫瘍試料によって産生されるプロテアーゼによる切断の基質であってもそうでなくてもよい。一実施形態では、プロテアーゼが、第１および／または第２の切断可能部位を切断するものである場合、ステップ（ａ）における接触を、プロテアーゼにより第１および／または第２の切断可能部位が切断されて、１つまたは複数の切断産物が生成されるのに適した条件下で実施する。

【０３８８】

一実施形態では、方法は、（ｂ）第１および／または第２の切断産物を検出するステップをさらに含む。一実施形態では、方法は、（ｃ）第１および／または第２の切断産物を検出し、切断産物のいずれかと第１および／または第２の切断可能部位のアミノ酸配列の相互関係を明らかにすることにより、対象由来の腫瘍によって産生されるプロテアーゼの型を同定するステップをさらに含む。

【０３８９】

一実施形態では、対象において腫瘍によって産生されるプロテアーゼの型を同定することにより、対象におけるがんを診断することができる。一実施形態では、第１および／または第２の切断産物を、ゲル電気泳動、ウエスタンブロット分析、免疫学、免疫組織化学的検査、比色定量により、分光光度的に、質量分析、液体クロマトグラフィーによって、またはこれらの任意の組合せによって検出することができる。一実施形態では、腫瘍またはがん塊を、前立腺、乳房、卵巣、頭頸部、膀胱、皮膚、結腸直腸、肛門、直腸、膵臓、肺（非小細胞肺がんおよび小細胞肺がんを含む）、平滑筋腫、脳、神経膠腫、神経膠芽腫、食道、肝臓、腎臓、胃、結腸、子宮頸部、子宮、子宮内膜、外陰部、喉頭、膣、骨、鼻腔、副鼻腔、上咽頭、口腔、中咽頭、喉頭、下咽頭、唾液腺、尿管、尿道、陰茎、および

精巣から得ることができる。一実施形態では、対象は、ヒト、非ヒト霊長類、サル、類人猿、ネズミ科動物（例えば、マウスおよびラット）、ウシ亜科動物、ブタ、ウマ科動物、イヌ科動物、ネコ科動物、ヤギ、オオカミ、カエルまたは魚類である。一実施形態では、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける切断に基づく方法を、対象におけるがんを検出、診断、モニタリングおよび／または病期分類するために使用することができる。

【０３９０】

本開示は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のうちの少なくとも１つならびに／または切断およびアセンブルされて、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質になり得る前駆体ポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸を含むキットを提供する。一実施形態では、キットは、ＥＧＦＲまたはＣＤ３８に結合し得る、第２世代もしくは第３世代ＤＡＲ構築物、Ｖｅｒｓｉｏｎ　Ｖ１、Ｖ２ａ、Ｖ２ｂ、Ｖ２ｃ、Ｖ３もしくはＶ４　ＤＡＲ構築物、および／または二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のうちの少なくとも１つを含む。一実施形態では、キットは、Ｔｒｉｓ、リン酸塩、炭酸塩、安定剤、賦形剤、殺生物剤およびウシ血清アルブミンからなる群から選択される１つまたは複数の補助化合物を含む。一実施形態では、キットは、Ｔｒｉｓ、リン酸塩、炭酸塩、安定剤、賦形剤、殺生物剤およびウシ血清アルブミンからなる群から選択される１つまたは複数の補助化合物を含む。一実施形態では、キットは、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む少なくとも１つの活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質（またはそのタンパク質をコードする核酸）および必要に応じて１つまたは複数の補助化合物を含有する１つの容器を含む。一実施形態では、キットは、２つまたはそれよりも多くの容器を含み、ここで、１つの容器が二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む少なくとも１つの活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質（またはそのタンパク質をコードする核酸）を含有し、別の容器が、１つまたは複数の補助化合物を含有する。

【０３９１】

活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質：

ＩｇＧ型抗体、二重特異性抗体および二量体抗原受容体（ＤＡＲ）

本開示は、表１のアミノ酸配列を有する対をなすヘテロ二量体遮蔽性部分を含む、ＩｇＧクラス抗体、二重特異性抗体および二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む本明細書に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを提供する。一実施形態では、ＩｇＧクラス抗体または二重特異性抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、以下の表１に列挙されている対をなす遮蔽性部分のいずれかのアミノ酸配列を有する第１および第２ならびに／または第３および第４の遮蔽性部分を有する。一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、表１に列挙されている対をなす遮蔽性部分のいずれかを有するアミノ酸配列を有する第１および第２の遮蔽性部分を含む。

【表１－１】

表1:対をなすヘテロ二量体遮蔽性部分:

対をなす遮蔽性部分	遮蔽性部分	遮蔽性部分
Ig γ1 CH1 定常ドメインと Ig λの対	Ig γ1 CH1 ドメイン 配列番号 21 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSS	Ig CL λ 定常ドメイン 配列番号 22 GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTESS
Ig γ1 CH1 定常ドメインと Ig κの対	Ig γ1 CH1 ドメイン 配列番号 21 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK RVEPKSS	Ig CL κ 定常ドメイン 配列番号 23 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES
Ig γ1 CH3ノブイントゥホールドメインの対	Ig γ1 CH3 ドメインホール 配列番号 24 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS L**S**C**A**VKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK	Ig γ CH3 ドメインノブ 配列番号 25 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL**W**C **L**VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
38C2 IgG1 VHおよびVLドメインの対	重鎖可変ドメイン38C2 配列番号 26 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSNYWMSWVRQSPEKGLEWV SEIRLRSDNYATHYAESVKGRFTI	重鎖可変ドメイン38C2 配列番号 27 ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQ SLLHTYGSPYLNWYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS

【表１－２】

対をなす遮蔽性部分	遮蔽性部分	遮蔽性部分
	SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTGIY YCKTYFYSFSYWGQGTLVTVSS	SLQPEDFAVYFCSQGTHLPYTFGGGTK VEIK
TCR αβ定常ドメインの対	TCR α 定常ドメイン 配列番号 28 IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLF TDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTV LDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFAC ANAFNNSIIPEDTFFPSP	TCR β 定常ドメイン 配列番号 29 KVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVST DPQPLKEQPALNDSRYsLSSRLRVSAT FWQNPRNHFRCQVQFNGQIVSAEAWGR ADS

【０３９２】

本開示は、表２のアミノ酸配列を有する対をなすホモ二量体遮蔽性部分を含むＩｇＧクラス抗体、二重特異性抗体および二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む本明細書に記載の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質のいずれかを提供する。一実施形態では、ＩｇＧクラス抗体または二重特異性抗体を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、以下の表２に列挙されている対をなす遮蔽性部分のいずれかのアミノ酸配列を有する第１および第２ならびに／または第３および第４の遮蔽性部分を有する。一実施形態では、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、表２に列挙されている対をなす遮蔽性部分のいずれかのアミノ酸配列を有する第１および第２の遮蔽性部分を含む。

【表２－１】

表2:対をなすホモ二量体遮蔽性部分:

対をなす遮蔽性部分	遮蔽性部分	遮蔽性部分
IgG1 CH3:CH3対	IgG1 CH3 定常ドメイン 配列番号 30 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK	IgG1 CH3 定常ドメイン 配列番号 30 GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgG4 CH3:CH3対	IgG4 CH3 定常ドメイン 配列番号 31	IgG4 CH3 定常ドメイン 配列番号 31

【表２－２】

対をなす遮蔽性部分	遮蔽性部分	遮蔽性部分
	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３９３】

本開示は、切断可能部位を有する、少なくとも第１および／または第２のペプチドリンカーを含み、必要に応じて、第３および／または第４のペプチドリンカーをさらに含む、ＩｇＧクラス抗体、二重特異性抗体および二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、本明細書に記載の任意の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、切断可能部位は、プロテアーゼ、エステラーゼ、還元条件、または酸化条件を含む切断条件で切断可能である。一実施形態では、切断可能部位は、腫瘍微小環境中に存在するプロテアーゼで切断可能である、または腫瘍微小環境中に存在する還元条件もしくは酸化条件で切断可能である（Rakashanda et al., 2012 Biotechnology and Molecular Biology Review 7 (4): 90-101）。一実施形態では、切断条件は、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、メタロプロテアーゼ、アスパラギンペプチドリアーゼ、血清プロテアーゼ、マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）、ＭＭＰ１、ＭＭＰ２、ＭＭＰ３、ＭＭＰ７、ＭＭＰ８、ＭＭＰ９、ＭＭＰ１１、ＭＭＰ１３、ＭＭＰ１４、ＭＴ１－ＭＭＰ（膜１型マトリックスメタロプロテイナーゼ）、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、エンテロキナーゼ、前立腺特異的抗原（ＰＳＡ、ｈＫ３）、インターロイキン－ιβ変換酵素、トロンビン、ＦＡＰ（ＦＡＰ－ａ）、ジペプチジルペプチダーゼ、メプチン、グランザイム（例えば、グランザイムＢ）、ジペプチジルペプチダーゼＩＶ（ＤＰＰＩＶ／ＣＤ２６）、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ（例えば、ＡＤＡＭプロテアーゼ）、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭ１７、ヘプシン、カテプシン（例えば、システインまたはアスパラギン酸カテプシン）、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＤ、カテプシンＥ、カテプシンＫ、カテプシンＬ、カリクレイン、ｈＫ１、ｈＫ１０、ｈＫ１５、プラスミン、コラゲナーゼ、ＩＶ型コラゲナーゼ、ストロメライシン、リソソーム酵素、第Ｘａ因子、キモトリプシン様プロテアーゼ、トリプシン様プロテアーゼ、エラスターゼ様プロテアーゼ、スブチリシン様プロテアーゼ、アクチニダイン、ブロメライン、カルパイン、カスパーゼ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、単純ヘルペスウイルスプロテアーゼ、ＨＩＶプロテアーゼ、ＣＭＶプロテアーゼ、Ｍｉｒｌ－ＣＰ、パパイン、ＨＩＶ－１プロテアーゼ、ＨＳＶプロテアーゼ、ＣＭＶプロテアーゼ、キモシン、レニン、ペプシン、マトリプターゼ（例えば、マトリプターゼ　２、ヒト　ＳＴ１４、またはＴＭＰＲＳＳ６）、レグマイン、プラスメプシン、ネペンテシン、メタロエキソペプチダーゼ、および／またはメタロエンドペプチダーゼを含めた、１種のプロテアーゼまたは２種またはそれよりも多くのプロテアーゼの任意の組合せを含む。

【０３９４】

一実施形態では、ペプチドリンカーは、マトリックスメタロプロテアーゼプロテアーゼで切断可能なペプチドと少なくとも９５％、または少なくとも９６％、または少なくとも９７％、または少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一のアミノ酸配列、例えば、ＧＧＳＧＳＧＳＧＧＳＳＧＧＧＳＧＧＧＧＳ、ＴＳＧＳＧＧＳＧＧＳＶ、ＴＳＧＳＧＧＳＰＬＧＭＧＧＳＧＳＶ、ＴＳＧＳＧＧＳＰＬＧＶＧＧＳＧＳＶ、ＴＳＧＳＧＧＳＰＡＡ

ＬＧＧＳＧＳＶ、ＴＳＧＳＧＧＳＰＡＧＬＧＧＳＧＳＶ、ＴＳＧＳＧＧＳＰＬＧＭＶＧＶ、ＴＳＧＳＧＧＳＰＬＧＶＶＧＶ、ＴＳＧＳＧＧＳＰＡＡＬＶＧＶ、ＴＳＧＳＧＧＳＰＡＧＬＶＧＶ、ＴＳＧＳＧＧＳＰＬＧＭＶＬＶ、ＴＳＧＳＧＧＳＰＬＧＶＶＬＶ、ＴＳＧＳＧＧＳＰＡＡＬＶＬＶまたはＴＳＧＳＧＧＳＰＡＧＬＶＬＶのアミノ酸配列を有する切断可能部位を含む。

【０３９５】

一実施形態では、切断可能部位は、ＭＭＰ９によって認識され、切断されるアミノ酸配列ＬＥＡＴＡを含む。一実施形態では、切断可能部位は、ＭＭＰ９によって認識され、切断されるアミノ酸配列ＰＲ（Ｓ／Ｔ）（Ｌ／Ｉ）（Ｓ／Ｔ）を含む。一実施形態では、切断可能部位は、アミノ酸配列ＳＧＳＧＧＳＰＬＧＭＧＧＳＧＳＶＤ、ＳＧＳＧＧＳＰＡＧＬＧＧＳＣＳＶＤ、またはＳＧＳＧＧＳＰＡＧＬＶＧＶＤを含む。一実施形態では、切断可能部位は、ＭＭＰ１１によって認識され、切断されるアミノ酸配列ＧＧＡＡＮＬＶＲＧＧを含む。

【０３９６】

本開示は、切断可能部位を有する、表３、４、５、６、７、８および／または９に列挙されているペプチドリンカーのいずれかに従ったアミノ酸配列を有する少なくとも第１および／または第２のペプチドリンカーを含み、必要に応じて、第３および／または第４のペプチドリンカーをさらに含む、ＩｇＧクラス抗体、二重特異性抗体および二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、本明細書に記載の任意の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。

【表３】

表 3:マトリックスメタロプロテイナーゼで切断可能なペプチドリンカーのアミノ酸配列

アミノ酸配列
SRPLALR
SRPANLR
X1X2X3X4X5X6X7、配列中、X1 は S、V または R であり、X2 は任意のアミノ酸であり、X3 は P または A であり、X4 は L、M、A、R または Y であり、X5 は A、S、N、G、H または M であり、X6 は L であり、X7 は R、L、Q または M である。

【表４】

表 4:マトリックスメタロプロテイナーゼ 1(MMP1)で切断可能なペプチドリンカーのアミノ酸配列

アミノ酸配列
DVAQFVLT
VLVPMAMMAS
X1X2X3X4X5X6X7X8、配列中、X1 は任意のアミノ酸であり、X2 は P または A であり、X3 および X4 は任意のアミノ酸であり、X5 は L または I であり、X6、X7、X8 は任意のアミノ酸である。

【表５】

表 5:マトリックスメタロプロテイナーゼ 2(MMP2)で切断可能なペプチドリンカーのアミノ酸配列

アミノ酸配列
PLGLAG
HRPRGX1TN
X1X2X3X4X5X6X7X8、配列中、X1 は任意のアミノ酸であり、X2 は P であり、X3 および X4 は任意のアミノ酸であり、X5 は L または I であり、X6、X7 および X8 は任意のアミノ酸である

【表６】

表 6:マトリックスメタロプロテイナーゼ 9(MMP9)で切断可能なペプチドリンカーのアミノ酸配列

アミノ酸配列
VPLVLYS (MMP9)
VPLSLYS
GGPLGVRGG (MMP2/9)
GGPLGVRGGGGG (伸長)
PLGVRGG (欠失)
HRPRGX1TN、配列中、X1 は V または W である
X1X2X3X4X5X6X7X8、配列中、X1 は G であり、X2 は P または A であり、X3 は任意のアミノ酸であり、X4 は G または A であり、X5 は L であり、X6 は任意のアミノ酸であり、X7 は G であり、X8 は任意のアミノ酸である
GPLGIAGQ
PVGLIG
HPVGLLAR

【表７】

表 7:マトリックスメタロプロテイナーゼ 2 または 9 で切断可能な

ペプチドリンカーのアミノ酸配列

アミノ酸配列
GGPLGVRGG　(MMP2/9)
GGPLGVRGGGGG　(伸長)
PLGVRGGG　(欠失)

【表８】

表 8:尿型プラスミノーゲン活性化因子(uPA)で切断可能な

ペプチドリンカーのアミノ酸配列

アミノ酸配列
GGGGRRGGGG　(uPA1)
SGRSAN　(uPA2)
X1SGRSA、配列中、X1 は G または K である
LSGRSX1NH、配列中、X1 は D、V または A である
X1X2X3X4X5X6X7X8、配列中、X1 は任意のアミノ酸であり、X2 は S であり、X3 は G または S であり、X4 は R または K であり、X5 は任意のアミノ酸であり、X6 は R または V であり、X7 は任意のアミノ酸であり、X8 は任意のアミノ酸である
SGRSA
X9X10X11X12X13X14X15X16、配列中、X9 は L、I、A または K であり、X10 は S、G、または Q であり、X11 は K、L、A、G、または S であり、X12 は R であり、X13 は S、K、G、A または V であり、X14 は A、V または L であり、X15 は N であり、X16 は H、G、V、または L である
RKSSIIIRMRDWL

【表９】

表 9:マトリプターゼで切断可能なペプチドリンカーのアミノ酸配列

アミノ酸配列
AGPR
RQARVV
LSGX1、配列中、X1 は R または K である
X1SGRSA、配列中、X1 は G または K である
LSGRSX1NH、配列中、X1 は D、V または A である
X1X2X3X4X5X6X7X8、配列中、X1 は R であり、X2 および X3 は任意のアミノ酸であり、X4 は R であり、X5 は K であり、X6 は V であり、X7 は任意のアミノ酸であり、X8 は G である
X9X10X11X12X13、配列中、X9 は K または R であり、X10 は R、K、H または Q であり、X11 は G、A または S であり、X12 は R または K であり、X13 は A である
X14X15X16X17X18X19X20X21、配列中、X14 は L、I、A または K であり、X15 は S、G、または Q であり、X16 は K、L、A、G、または S であり、X17 は R であり、X18 は S、K、G、A または V であり、X19 は A、V または L であり、X20 は N であり、X21 は H、G、V、または L である
X22X23X24X25X26、配列中、X22 は R または K であり、X23 は非塩基性アミノ酸(G、A、S、T、C、V、L、I、M、P、F、Y、W、D、E、N、または Q)であり、X24 は S であり、X25 は R であり、X26 は A である
X27X28X29X30X31、配列中、X27 は非塩基性アミノ酸(G、A、S、T、C、V、L、I、M、P、F、Y、W、D、E、N、Q)であり、X28 は R または K であり、X29 は S であり、X30 は R であり、X31 は A である

【０３９７】

本開示は、二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、本明細書に記載の任意の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、ヒンジ領域が、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４免疫グロブリン分子由来の上部、中心部または下部ヒンジ配列を含む２つまたはそれよりも多くの領域のうちの任意の１つまたは任意の組合せを含む、本明細書に記載の任意の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、ヒンジ領域は、ＩｇＧ１上部ヒンジ配列ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴを含む。一実施形態では、ヒンジ領域は、ＩｇＧ１中心部ヒンジ配列ＣＰＸＣを含み、配列中、ＸはＰ、ＲまたはＳである。一実施形態では、ヒンジ領域は、下部ヒンジ／ＣＨ２配列ＰＡＰＥＬＬＧＧＰを含む。一実施形態では、ヒンジは、アミノ酸配列ＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴを有するＦｃ領域（ＣＨ２）と接合している。一実施形態では、ヒンジ領域は、上部、中心部およ

び下部ヒンジのアミノ酸配列を含み、ＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰを含む。一実施形態では、ヒンジ領域は、少なくとも１つ、２つ、３つまたはそれよりも多くの鎖間ジスルフィド結合を形成し得る、１つ、２つ、３つまたはそれよりも多くのシステインを含む。

【０３９８】

本開示は、ＩｇＧクラス抗体、二重特異性抗体および二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、本明細書に記載の任意の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、第１、第２、第３および／または第４のペプチドリンカーにより、対をなす遮蔽性部分の二量体化（例えば、第１および第２の遮蔽性部分の二量体化、ならびに／または第３および第４の遮蔽性部分の二量体化）が可能になる、本明細書に記載の任意の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、ペプチドリンカーのいずれかは、１～５０アミノ酸の長さを有し、必要に応じて、少なくとも１つのアミノ酸類似体を含み得る。一実施形態では、リンカーのうちの少なくとも１つは、柔軟なリンカーであり、グリシン、セリン、アラニンおよび／またはトレオニンの２つまたはそれよりも多くのアミノ酸の任意の組合せを主に含む。一実施形態では、ペプチドリンカーのうちの少なくとも１つは、グリシン－アラニン、またはアラニン－セリン、または他の柔軟なリンカー配列の少なくとも１つかつ最大４つのポリマーを含む。一実施形態では、ペプチドリンカーのうちの少なくとも１つは、（ＳＧ）ｎ、（ＳＧＧ）ｎ、（ＳＧＧＧ）ｎ、（ＳＳＧ）ｎ、（ＧＳ）ｎ、（ＧＧＧ）ｎ、（ＧＳＧＧＳ）ｎ、（ＧＳＧ）ｎ、（ＧＧＧＧＳ）ｎ、（ＧＧＧＳ）ｎ、（ＧＧＧＧＳＧＳ）ｎ、（ＧＧＳＧＧＧＳＧＧ）ｎ、（ＧＧＧＧＳＧＧＳ）ｎ、および（ＧＧＳ）ｎからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ここで、ｎは１～６の整数である。一実施形態では、ペプチドリンカーのうちの少なくとも１つは、ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲ、ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ、ＡＫＴＴＰＫＬＧＧ、ＳＡＫＴＴＰＫＬＧＧ、ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ、ＳＡＫＴＴＰ、ＳＡＫＴＴＰＫＬＧＧ、ＲＡＤＡＡＰ、ＲＡＤＡＡＰＴＶＳ、ＲＡＤＡＡＡＡＧＧＰＧＳ、ＲＡＤＡＡＡＡ（G_4S）$_4$、ＳＡＫＴＴＰ、ＳＡＫＴＴＰＫＬＧＧ、ＳＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ、ＡＤＡＡＰ、ＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰ、ＴＶＡＡＰ、ＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ、ＱＰＫＡＡＰ、ＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰ、ＡＫＴＴＰＰ、ＡＫＴＴＰＰＳＶＴＰＬＡＰ、ＡＫＴＴＡＰ、ＡＫＴＴＡＰＳＶＹＰＬＡＰ、ＡＳＴＫＧＰ、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ、ＧＥＮＫＶＥＹＡＰＡＬＭＡＬＳ、ＧＰＡＫＥＬＴＰＬＫＥＡＫＶＳおよびＧＨＥＡＡＡＶＭＱＶＱＹＰＡＳからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０３９９】

本開示は、ヒト由来のエピトープまたは抗原に結合する、ＩｇＧクラス抗体、二重特異性抗体および二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、本明細書に記載の任意の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、ヒト由来のエピトープまたは抗原に結合し、かつ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ヤギ、ウサギ、ハムスターおよび／またはサル（例えば、カニクイザル、アカゲザルまたはマカク）などの非ヒト動物の任意の１つまたは任意の組合せ由来のエピトープまたは抗原（例えば、相同な抗原）に結合（例えば、交差反応）し得る。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、配列番号１のアミノ酸配列を含むＥＦＧＲ抗原に結合する。

【０４００】

ＥＧＦＲ標的抗原－細胞外ドメイン：配列番号１

【化１－１】

LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKT
IQEVAGYVLIALNTVERIPLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEI
LHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEE
NCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPL
MLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKC
EGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQE
LDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSL

【化１－２】

KEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGC
WGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPD
NCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPTN
GPKIPS

【０４０１】

本開示は、ＥＧＦＲ抗原に結合する、ＩｇＧクラス抗体、二重特異性抗体および二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、本明細書に記載の任意の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、任意の重鎖／軽鎖の組合せで、配列番号２または４のアミノ酸配列を有する抗体重鎖を含み、配列番号３または５のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖を含む、本明細書に記載の任意の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、配列番号２および４の重鎖可変領域に下線が引かれている。一実施形態では、配列番号３および５の軽鎖可変領域に下線が引かれている。

【０４０２】

ヒト抗ＥＧＦＲ抗体重鎖；対照抗ＥＧＦＲ抗体および活性化可能な遮蔽された抗体：配列番号２

【化２】

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNT
DYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０４０３】

ヒト抗ＥＧＦＲ抗体軽鎖；対照抗ＥＧＦＲ抗体および活性化可能な遮蔽された抗体：配列番号３

【化３】

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISG
IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４０４】

ヒト抗ＥＧＦＲ抗体重鎖；セツキシマブ配列番号４

【化４－１】

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNT
DYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL

【化４－２】

YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０４０５】

ヒト抗ＥＧＦＲ抗体軽鎖；セツキシマブ配列番号５

【化５】

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISG
IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４０６】

本開示は、ヒト由来のエピトープまたは抗原に結合する、ＩｇＧクラス抗体、二重特異性抗体および二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、本明細書に記載の任意の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、ヒト由来のエピトープまたは抗原に結合し、かつ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ヤギ、ウサギ、ハムスターおよび／またはサル（例えば、カニクイザル、アカゲザルまたはマカク）などの非ヒト動物の任意の１つまたは任意の組合せ由来のエピトープまたは抗原（例えば、相同な抗原）に結合（例えば、交差反応）し得る。一実施形態では、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質は、配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤ３８抗原に結合する。

【０４０７】

ＣＤ３８標的抗原－細胞外ドメイン：配列番号６

【化６】

VPRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKHPC
NITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTWCG
EF
NTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKNSTFGSV
EV
HNLQPEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIQFSCKNIYRPDKFLQCVK
NP
EDSSCTSEI

【０４０８】

本開示は、ＣＤ３８抗原に結合する、ＩｇＧクラス抗体、二重特異性抗体および二量体抗原受容体（ＤＡＲ）を含む、本明細書に記載の任意の活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質であって、任意の重鎖／軽鎖の組合せで（以下の表１０を参照されたい）、配列番号７、９、１１、１３、１４、１５、１６、１７、１８、または２０のアミノ酸配列を有する抗体重鎖を含み、配列番号８、１０、１２または１９のアミノ酸配列を有する抗体軽鎖を含む、活性化可能な遮蔽された抗原結合性タンパク質を提供する。一実施形態では、配列番号７の重鎖可変領域に下線が引かれている。一実施形態では、配列番号８の軽鎖可変領域に下線が引かれている。

【０４０９】

抗ＣＤ３８重鎖：配列番号７

【化７】

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNGRPT
TYYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０４１０】

抗ＣＤ３８軽鎖：配列番号８

【化８】

QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNIGINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPS
GVPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVLGQPKAAPSV
TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY
LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【表１０－１】

表 10:

抗CD38重鎖可変領域:	抗CD38軽鎖可変領域:
A2 親重鎖 配列番号 9 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNGRPTT YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGRGTLVTV SS	A2 親軽鎖 配列番号 10 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3H10m1 配列番号 11 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNGRPTT YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREGWSGEFTDWGQGTLVTV SS	3H10m1 配列番号 12 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GFHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL

【表１０－２】

抗CD38重鎖可変領域:	抗CD38軽鎖可変領域:
3G8m1 配列番号 13 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNGRPTT YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREAWGGEFTNWGQGTLVTV SS	3G8m1 配列番号 12 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GFHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3E3m1 配列番号 14 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNGRPTT YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREAWGGEFTDWGQGTLVTV SS	3D3m1 配列番号 12 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GFHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3G3 配列番号 15 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNGRPTT YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREAWSGEFTDWGQGTLVTV SS	3G3 配列番号 10 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3E11 配列番号 16 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNGRPTT YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREGWGGEFTDWGQGTLVTV SS	3E11 配列番号 10 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3H10 配列番号 17 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNGRPTT YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREGWSGEFTDWGQGTLVTV SS	3H10 配列番号 10 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3H10N 配列番号 18	3H10N 配列番号 19

【表１０－３】

抗CD38重鎖可変領域:	抗CD38軽鎖可変領域:
QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNGRPTT YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGQGTLVTV SS	QSVLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNIG FHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVP DRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADYYCA AWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3H10NS 配列番号20 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSSGRPTT YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGQGTLVTV SS	3H10NS 配列番号19 QSVLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNIG FHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVP DRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADYYCA AWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3E10 配列番号9 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNGRPTT YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGRGTLVTV SS	3E10 配列番号12 QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNI GFHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSG VPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADY YCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVL
3H10m1g 配列番号11 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNGRPTT YYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCAREGWSGEFTDWGQGTLVTV SS	3H10m1g 配列番号19 QSVLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNIG FHFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVP DRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADYYCA AWDDSLSGYVFGSGTKVTVL

【実施例】

【０４１１】

以下の実施例は、例示的なものであることが意図されており、本開示の実施形態をさらに理解するために使用することができ、また、本教示の範囲をいかようにも限定するものと解釈されるべきではない。

【０４１２】

（実施例１）

活性化可能な遮蔽された抗体の命名

ＥＧＦＲまたはＣＤ３８抗原に結合する、種々の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体であって、第１の重鎖可変領域および第１の軽鎖可変領域を含み、（ｉ）第１の重鎖可変領域のＮ末端が、第１の遮蔽性部分と、第１の切断可能部位を有する第１のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉ）第１の軽鎖可変領域のＮ末端が、第２の遮蔽性部分と、第２の切断可能部位を有する第２のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉｉ）第１および第２の遮蔽性部分が、互いに会合して第１の二量体化した遮蔽性複合体を

形成しており、（ｉｖ）第１の切断可能部位が、第１のプロテアーゼで切断可能であり、（ｖ）第２の切断可能部位が、第２のプロテアーゼで切断可能であり、第１および第２の切断可能部位が、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である、活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体を調製した。

【０４１３】

種々の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体はまた、第２の重鎖可変領域および第２の軽鎖可変領域も含み、ここで、（ｉ）第２の重鎖可変領域のＮ末端は、第３の遮蔽性部分と、第３の切断可能部位を有する第３のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉ）第２の軽鎖可変領域のＮ末端は、第４の遮蔽性部分と、第４の切断可能部位を有する第４のペプチドリンカーを介して接合しており、（ｉｉｉ）第３および第４の遮蔽性部分が互いに会合して第２の二量体化した遮蔽性複合体を形成しており、（ｉｖ）第３の切断可能部位は、第３のプロテアーゼで切断可能であり、（ｖ）第４の切断可能部位は、第４のプロテアーゼで切断可能であり、第３および第４の切断可能部位は、同じまたは異なるプロテアーゼで切断可能である。

【０４１４】

種々の活性化可能な遮蔽性部分の命名規則（命名）を以下の表１１に列挙する。

【表１１－１】

表 11:

命名:	遮蔽性部分	遮蔽性部分内のホールまたはノブ	ペプチドリンカー
HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9	重鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ホール	MMP2/9
	軽鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ノブ	MMP2/9
HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ MMP2/9	重鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ホール	uPA1
	軽鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ノブ	MMP2/9
HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ uPA1	重鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ホール	uPA1
	軽鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ノブ	uPA1

【表１１－２】

命名:	遮蔽性部分	遮蔽性部分内のホールまたはノブ	ペプチドリンカー
HC-CH1 MMP2/9、 LC-CL カッパ MMP2/9	重鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH1	なし	MMP2/9
	軽鎖: ヒト Ig カッパ CL	なし	MMP2/9
HC-CH1 MMP2/9、 LC-CL ラムダ MMP2/9	重鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH1	なし	MMP2/9
	軽鎖: ヒト Ig ラムダ CL	なし	MMP2/9
HC-G4CH3 MMP2/9、 LC-G4CH3 MMP2/9	重鎖: ヒト Ig ガンマ 4 CH3	なし	MMP2/9
	軽鎖: ヒト Ig ガンマ 4 CH3	なし	MMP2/9
HC-CH3 ホール MMP2/9、 LC-CH3 ノブ欠失	重鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ホール	MMP2/9
	軽鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ノブ	欠失
HC-CH3 ホール MMP2/9、 LC-CH3 ノブ切断不可能	重鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ホール	MMP2/9
	軽鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ノブ	切断不可能
HC-CH3 ホール MMP2/9、 LC-CH3 ノブ伸長	重鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ホール	MMP2/9
	軽鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ノブ	伸長 MMP2/9
HC-CH3 ホール欠失、 LC-CH3 ノブ欠失	重鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ホール	欠失
	軽鎖: ヒト Ig ガンマ 1 CH3	ノブ	欠失
HC-TCR アルファ MMP2/9 LC-TCR ベータ MMP2/9	重鎖: TCR アルファ	なし	MMP2/9
	軽鎖: TCR ベータ	なし	MMP2/9
HC-CH3 ホール MMP9 LC-CH3 ノブ G4S	重鎖: CH3	ホール	MMP2/9
	軽鎖: CH3	ノブ	G4S

【０４１５】

種々の活性化可能な遮蔽された抗体内のペプチドリンカーの命名規則、およびそれらのアミノ酸配列を以下の表１２に列挙する。以下の表１２において、ペプチドリンカー配列に下線が引かれている。下線が引かれていない配列は、隣接する遮蔽性部分ＣＨ３のＣ末端アミノ酸配列を表す（例えば、配列番号２４および２５を参照されたい）。

【表１２】

表 12:

ペプチドリンカー　：	アミノ酸配列　　：	配列番号
MMP2/9	LSLSPGKGG**PLGVR**GG	32
欠失(GKGGがないもの)	LSLSP----**PLGVR**GG	33
切断不可能	LSLSPGKGGSGGGSGG	34
伸長(余分のGが3つあるもの)	LSLSPGKGG**PLGVR**GGGGG	35
MMP9	VPLVLYS	36
G4S	GGGGS	37
uPA1 (セリンプロテアーゼ)	LSLSPGKGGGGRRGGGG	38
uPA2	SGRSAN	39
タンデム	GGPLGVRGGPLGVRGG	40

【０４１６】

「欠失」ペプチドリンカー配列については、ヒトＩｇ－ガンマＣＨ３のＣ末端アミノ酸ＧＫおよびＭＭＰ２／９ペプチドリンカーのＮ末端アミノ酸ＧＧが欠失している（上の表１２を参照されたい）。

【０４１７】

（実施例２）

種々のＩｇＧ型の活性化可能な遮蔽された抗体の発現、精製および収量。

ＣＨＯ－Ｓ細胞（またはＣＨＯ－Ｋ１細胞）を、CO_2インキュベーター中、９０％以上の生存率で細胞密度が１ｍｌ当たり細胞１～２×10^6個になるまでインキュベートした。重鎖と軽鎖の対に対する別々の発現ベクターを、市販のプラスミドＤＮＡ抽出キット（例えば、Ｑｉａｇｅｎ　ＭａｘｉプラスミドｄＮＡ抽出キット）を使用して調製した。使用した発現ベクターは、ｐＥＧＦＰと類似のものである（例えば、ＣｌｏｎｅＴｅｃｈ製）。発現ベクターｐＣＤＮＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）を使用することもできる。マウスＩｇガンマリーダーペプチド配列（ＭＥＷＳＷＶＦＬＦＦＬＳＶＴＴＧＶＨＳ）を重鎖および軽鎖の両方の発現のための分泌ペプチド配列として使用した。トランスフェクションのためのＤＮＡ　ＰＥＩ複合体を、ＤＮＡとＰＥＩ（ポリエチレンイミン、Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅカタログ番号２４７６５）を１：２～３の比（重量／体積濃度）で混合することによって形成した。ＣＨＯ細胞とＤＮＡの比は、ＤＮＡ１マイクログラム当たり細胞およそ10^6個であった。ＤＮＡとＰＥＩの複合体をＯｐｔｉＰＲＯ培地（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）中で形成し、振とうフラスコ中、ＣＨＯ細胞培養物に添加し、３７℃で回転させながら一晩インキュベートした。２日目に、ペニシリン／ストレプトマイシンを含有するＣＨＯ培養培地を用いて培養培地を倍加することによって培養物を増大させ、３０℃のインキュベーターに入れ、回転させながら、ＩｇＧ力価およびＣＨＯ細胞の生存率に応じて１～２週間置いた。活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体を、市販のプロテインＡ樹脂を使用して分子をバッチ型捕捉することによって精製した。

【０４１８】

種々の活性化可能な遮蔽された抗体および遮蔽性部分を有さない対照抗ＥＧＦＲ抗体について、種々の抗ＥＧＦＲ活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体の２５ｍＬ　ＣＨＯトランスフェクションからのプロテインＡ力価およびＩｇＧ収量の発現レベルを決定し、それを表１３に列挙する：

【表１３】

表 13:

抗 EGFR 活性化可能な遮蔽された抗体:	プロテイン A 力価(ug/mL)	IgG 収量(ug)
HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9	3.1	150
HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ MMP2/9	3.07	100
HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ uPA1	2.19	70
HC-CH1 MMP2/9、LC-CL カッパ MMP2/9	10.4	240
HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9	8.39	200
HC-G4CH3 MMP2/9、LC-G4CH3 MMP2/9	0.69	10
遮蔽性部分を有さない対照抗 EGFR 抗体	16.06	350

【０４１９】

（実施例３）

種々のＩｇＧ型の活性化可能な遮蔽された抗体のＭＭＰ２／９またはｕＰＡ１ペプチドリンカーの切断、およびゲル分析。

ＭＭＰ２、ＭＭＰ９またはｕＰＡのいずれかで切断可能なペプチドリンカーを有する種々の活性化可能な遮蔽された抗体（抗ＥＧＦＲ）を、種々の時間範囲（１時間、３時間、６．５時間または２３時間）にわたってＭＭＰ２、ＭＭＰ９またはｕＰＡプロテアーゼを用いた消化に供し、得られた消化産物を、４～２０％勾配Ｔｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで、非還元条件または還元条件下（還元剤はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＮＵＰＡＧＥ　１０×Ｓａｍｐｌｅ　Ｒｅｄｕｃｉｎｇ　Ａｇｅｎｔである）でゲル電気泳動によって分析した。

【０４２０】

切断されていない活性化可能な遮蔽された抗体１０μｇまたは２０μｇ当たり、０．１μｇのプロテアーゼＭＭＰ２（ＲｎＤ　Ｓｙｓｔｅｍｓの組換えヒトＭＭＰ２、カタログ番号９０２－ＭＰ－０１０）またはＭＭＰ９（Ｏｒｉｇｅｅｎの組換えヒトＭＭＰ９、ＣＡＴ＃：ＴＰ３０２８７２、もしくはＲｎＤ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　ＣＡＴ＃９１１－ＭＰ－０１０）を含有する消化反応物を、ＤＰＢＳ緩衝剤中、室温でまたは３７℃で１時間、３時間、６．５時間または２３時間、インキュベートした。切断されていない活性化可能な遮蔽された抗体の最終濃度は、０．２５μｇ／μＬまたは０．５μｇ／μＬであり、ＭＭＰ９プロテアーゼ０．４μｇまたはｕＰＡプロテアーゼ０．７５μｇを伴った。ＡＰＭＡ活性化は行わなかった。

【０４２１】

ＭＭＰ２を用いて消化した活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体が図５Ａに示されている。図５Ａについての、左から右へのローディングされた試料の順序を以下の表１４に列挙する。図５Ａ～Ｂに示されているマーカー「Ｍ」は、ＳＰＥＣＴＲＡ　Ｍｕｌｔｉｃｏｌｏｒ　Ｂｒｏａｄ　Ｒａｎｇｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｌａｄｄｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ製、カタログ番号２６６２３）である。

【０４２２】

図５Ａ：活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体のＭＭＰ２を用いた消化により、カットされた重鎖、カットされた軽鎖およびカットされた遮蔽物を含む、予測切断産物が生成される。１時間、３時間、６．５時間および２３時間の消化条件で生成した切断産物を比較すると、試験した全ての遮蔽された抗体について、インタクトな（カットされていない

）軽鎖のレベルが低下し、切断された軽鎖および切断された遮蔽物（カットされた）のレベルが上昇する。

【表１４】

表 14:図 5A を参照されたい

レーン:	抗体:	時間(時間):
1	HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9	1
2	HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9	3
3	HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9	6.5
4	HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9	23
5	HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ uPA1	1
6	HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ uPA1	3
7	HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ uPA1	6.5
8	HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ uPA1	23
9	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL カッパ MMP2/9	1
10	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL カッパ MMP2/9	3
11	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL カッパ MMP2/9	6.5
12	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL カッパ MMP2/9	23
13	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9	1
14	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9	3
15	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9	6.5
16	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9	23
17	αEGFR 抗体	0

【０４２３】

ＭＭＰ９を用いて消化した活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体を図５Ｂに示す。図５Ｂについての左から右へのローディングされた試料の順序を以下の表１５に列挙する。

【０４２４】

図５Ｂ：活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体のＭＭＰ９を用いた消化により、カットされた重鎖、カットされた軽鎖およびカットされた遮蔽物を含む、予測切断産物が生成される（図６Ｂ）。１時間、３時間、６．５時間および２３時間の消化条件で生成した切断産物を比較すると、試験した全ての遮蔽された抗体について、インタクトな（カットされていない）軽鎖のレベルが低下し、切断された軽鎖および切断された遮蔽物（カットされた）のレベルが上昇する。

【表１５】

表 15:図 5B を参照されたい

レーン:	抗体:	時間(時間):
1	HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9	1
2	HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9	3
3	HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9	6.5
4	HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9	23
5	HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ uPA1	1
6	HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ uPA1	3
7	HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ uPA1	6.5
8	HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ uPA1	23
9	αEGFR 抗体	0
10	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL カッパ MMP2/9	1
11	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL カッパ MMP2/9	3
12	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL カッパ MMP2/9	6.5
13	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL カッパ MMP2/9	23
14	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9	1
15	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9	3
16	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9	6.5
17	HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9	23

【０４２５】

図５ＡおよびＢに示されている種々の抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ型の活性化可能な遮蔽された抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を以下に列挙する。

【０４２６】

ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９：

遮蔽性部分はホール構造を含むヒトＩｇ－ガンマＣＨ３（太字のフォント）であり、抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ抗体重鎖と接合したＭＭＰ２／９ペプチドリンカー（下線が引かれたイタリック体のフォント）と接合している：

【化９】

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG

SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGPLGVRGG*QVQLKQSG

PGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN

KDNSKSQVFFKMNSLQS**N**DTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP

SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS

LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS

RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLNG

KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL**T**C**L**VKGFYPSDIA

VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS

LSLSPG**K**

【０４２７】

ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９：

遮蔽性部分はノブ構造を含むヒトＩｇ－ガンマＣＨ３（太字のフォント）であり、抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ抗体軽鎖と接合したＭＭＰ２／９ペプチドリンカー（下線が引かれたイタリック体のフォント）と接合している：

【化１０】

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV

LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGPLGVRGG*DIL

LTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS

GSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS

GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH

KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４２８】

ＭＭＰ２またはＭＭＰ９による切断後の［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］の重鎖切断産物の予測アミノ酸配列（以下の実施例６に記載の通り質量分析によって確認された切断産物）：

【化１１－１】

VRGGQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWS

GGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQS**N**DTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLV

TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ

SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG

【化１１－２】

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**ST

YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN

QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF

SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**K**

【０４２９】

ＭＭＰ２またはＭＭＰ９による切断後の［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］の軽鎖切断産物の予測アミノ酸配列（以下の実施例６に記載の通り質量分析によって確認された切断産物）：

【化１２】

VRGGDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASE
SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４３０】

ＨＣ－ＣＨ３ホールｕＰＡ１、ＬＣ－ＣＨ３ノブｕＰＡ１：

遮蔽性部分はホール構造を含むヒトＩｇ－ガンマＣＨ３（太字のフォント）であり、抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ抗体重鎖と接合したｕＰＡ１ペプチドリンカー（下線が引かれたイタリック体のフォント）と接合している：

【化１３】

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGRRGGGG*QVQ
LKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTS
RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQS**N**DTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPG**K**

【０４３１】

ＨＣ－ＣＨ３ホールｕＰＡ１、ＬＣ－ＣＨ３ノブｕＰＡ１：

遮蔽性部分はノブ構造を含むヒトＩｇ－ガンマＣＨ３（太字のフォント）であり、抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ抗体軽鎖と接合したｕＰＡ１ペプチドリンカー（下線が引かれたイタリック体のフォント）と接合している：

【化１４－１】

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*GGGGRRGGGG*DI
LLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSG

【化１４－２】

SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４３２】

ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９：

遮蔽性部分はヒトＩｇ－ガンマＣＨ１（太字のフォント）であり、抗ＥＧＦＲ抗体ＩｇＧ抗体重鎖と接合したＭＭＰ２／９ペプチドリンカー（下線が引かれたイタリック体のフォント）と接合している：

【化１５】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL

QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSS*GGPLGVRGG*QVQLKQS

GPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSI

NKDNSKSQVFFKMNSLQS**N**DTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA

PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS

SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI

SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLN

GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI

AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK

SLSLSPG**K**

【０４３３】

ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９：

遮蔽性部分はヒトＩｇ－ガンマＣＬカッパ（太字のフォント）であり、抗ＥＧＦＲ抗体ＩｇＧ抗体軽鎖と接合したＭＭＰ２／９ペプチドリンカー（下線が引かれたイタリック体のフォント）と接合している：

【化１６】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT

EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES*GGPLGVRGG*DIL

LTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGS

GSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS

GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH

KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４３４】

ＭＭＰ２またはＭＭＰ９による切断後の［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］の重鎖切断産物の予測アミノ酸配列：

【化１７－１】

VRGGQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWS

GGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQS**N**DTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLV

TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ

【化１７－２】

SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**ST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**K**

【０４３５】

ＭＭＰ２またはＭＭＰ９による切断後の［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］の軽鎖切断産物の予測アミノ酸配列：

【化１８】

VRGGDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYA
SESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４３６】

ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９：

遮蔽性部分は、抗ＥＧＦＲ抗体ＩｇＧ抗体重鎖と接合したＭＭＰ２／９ペプチドリンカー（下線が引かれたイタリック体のフォント）と接合したヒトＩｇ－ガンマＣＨ１（太字のフォント）である：

【化１９】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSS*GGPLGVRGG*QVQLKQS
GPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSI
NKDNSKSQVFFKMNSLQS**N**DTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**STYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPG**K**

【０４３７】

ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９：

遮蔽性部分はヒトＩｇ－ガンマＣＬラムダ（太字のフォント）であり、抗ＥＧＦＲ抗体ＩｇＧ抗体軽鎖と接合したＭＭＰ２／９ペプチドリンカー（下線が引かれたイタリック体のフォント）と接合している：

【化２０－１】

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTESS*GGPLGVRGG*DILL
TQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSG

【化２０－２】

SGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４３８】

ＭＭＰ２またはＭＭＰ９による切断後の［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］の重鎖切断産物の予測アミノ酸配列：

【化２１】

VRGGQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWS
GGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQS**N**DTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY**N**ST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**K**

【０４３９】

ＭＭＰ２またはＭＭＰ９による切断後の［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］の軽鎖切断産物の予測アミノ酸配列：

【化２２】

VRGGDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASE
SISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS
TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４４０】

ＨＣ－ＴＣＲアルファＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＴＣＲベータＭＭＰ２／９：

遮蔽性部分はＴＣＲアルファ（太字のフォント）であり、抗ＣＤ３８　ＩｇＧ抗体重鎖と接合したＭＭＰ２／９ペプチドリンカー（下線が引かれたイタリック体のフォント）と接合している：

【化２３】

IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPGGPLGVR*GGPLGVRGG*QVQLVESGGGLVK
PGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLEWVASVSNGRPTTYYADSVRGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

【０４４１】

遮蔽性部分はＴＣＲベータ（太字のフォント）であり、抗ＣＤ３８　ＩｇＧ抗体軽鎖と接合したＭＭＰ２／９ペプチドリンカー（下線が引かれたイタリック体のフォント）と接合している：

【化２４】

KVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQ
PLKEQPALNDSRYSLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFNGQIVSAEAWGRADSGGPLGVR*G*
***GPLGVRGG*QAGLTQPPSASGTSGQRVTISCSGSSSNIGINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQ**
RPSGVPDRFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGSGTKVTVLGQPKAA
PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAA
SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【０４４２】

（実施例４）

改変された配列ペプチドリンカーの切断およびゲル分析。

改変されたＭＭＰ２／９切断配列を有するペプチドリンカーを有する種々の活性化可能な遮蔽された抗体（抗ＥＧＦＲ）を、消化時間を０．５時間、１時間、２時間、６時間または２４時間で行ったこと以外は上記の実施例３に記載の通り、ＭＭＰ２またはＭＭＰ９プロテアーゼを用いた消化に供した。得られた消化産物を、４～２０％勾配のＴｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで、還元条件下で（還元剤は、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＮＵＰＡＧＥ　１０×Ｓａｍｐｌｅ　Ｒｅｄｕｃｉｎｇ　Ａｇｅｎｔである）ゲル電気泳動によって分析した。結果を図６Ａ～Ｅに示す。図６Ａ～Ｅに示されているマーカー「Ｍ」は、ＳＰＥＣＴＲＡ　Ｍｕｌｔｉｃｏｌｏｒ　Ｂｒｏａｄ　Ｒａｎｇｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｌａｄｄｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号２６６２３）である。

【０４４３】

図６Ａ：活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］のＭＭＰ９を用いた消化により、カットされた重鎖およびカットされた軽鎖を含む予測切断産物が生成される。切断された遮蔽物は示されていない。０．５時間、１時間、２時間、６時間または２４時間の消化条件で生成された切断産物を比較すると、インタクトな（カットされていない）重鎖のレベルが低下し、切断された重鎖（カットされた）のレベルがわずかに上昇し、インタクトな（カットされていない）軽鎖のレ

ベルが低下し、切断された軽鎖（カットされた）のレベルが上昇する（図６Ａ、レーン８～１２）。ＭＭＰ２を用いた消化では、生成される検出可能な切断産物はわずかである（図６Ａ、レーン２～６）。レーン１は対照抗ＥＧＦＲ抗体であり、レーン７「Ｍ」は分子量マーカーである。

【０４４４】

図６Ｂ：活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ欠失］のＭＭＰ９を用いた消化により、カットされた重鎖およびカットされた軽鎖を含む予測切断産物が生成される。切断された遮蔽物は示されていない。０．５時間、１時間、２時間、６時間または２４時間の消化条件で生成された切断産物を比較すると、インタクトな（カットされていない）重鎖のレベルが低下し、切断された重鎖（カットされた）のレベルが上昇し、インタクトな（カットされていない）軽鎖のレベルが低下し、切断された軽鎖（カットされた）のレベルが上昇する（図６Ｂ、レーン７～１１）。ＭＭＰ２を用いた消化では、生成される検出可能な切断産物はわずかである（図６Ｂ、レーン１～５）。レーン１２は対照抗ＥＧＦＲ抗体であり、レーン６「Ｍ」は分子量マーカーである。

【０４４５】

図６Ｃ：活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］のＭＭＰ９を用いた消化により、カットされた重鎖を含む予測切断産物が生成される。切断された遮蔽物は示されていない。０．５時間、１時間、２時間、６時間または２４時間の消化条件で生成された切断産物を比較すると、インタクトな（カットされていない）重鎖のレベルが低下し、切断された重鎖（カットされた）のレベルが上昇し、インタクトな（カットされていない）軽鎖のレベルが変化せず、切断された軽鎖（カットされた）は検出不可能である（図６Ｃ、レーン８～１２）。ＭＭＰ２を用いた消化では、インタクトな（カットされていない）重鎖のレベルのわずかな低下および切断された重鎖（カットされた）のレベルのわずかな上昇が生じ、インタクトな（カットされていない）軽鎖のレベルが変化せず、切断された軽鎖（カットされた）は検出不可能である（図６Ｃ、レーン２～６）。レーン１は対照抗ＥＧＦＲ抗体であり、レーン６７「Ｍ」は分子量マーカーである。

【０４４６】

図６Ｄ：活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］のＭＭＰ９を用いた消化により、カットされた重鎖およびカットされた軽鎖を含む予測切断産物が生成される。切断された遮蔽物は示されていない。０．５時間、１時間、２時間、６時間または２４時間の消化条件で生成された切断産物を比較すると、インタクトな（カットされていない）重鎖のレベルが低下し、切断された重鎖（カットされた）のレベルが上昇し、インタクトな（カットされていない）軽鎖のレベルが低下し、切断された軽鎖（カットされた）のレベルが上昇する（図６Ｄ、レーン７～１１）。ＭＭＰ２を用いた消化では、インタクトな（カットされていない）重鎖のレベルのわずかな低下および切断された重鎖（カットされた）のレベルのわずかな上昇が生じ、インタクトな（カットされていない）軽鎖のレベルに検出可能な変化は示されず、切断された軽鎖（カットされた）は検出不可能である（図６Ｄ、レーン１～５）。レーン１２は対照抗ＥＧＦＲ抗体であり、レーン６「Ｍ」は分子量マーカーである。

【０４４７】

図６Ｅ：活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホール欠失、ＬＣ－ＣＨ３ノブ欠失］のＭＭＰ９を用いた消化により、カットされた重鎖およびカットされた軽鎖を含む予測切断産物が生成される。切断された遮蔽物は示されていない。０．５時間、１時間、２時間、６時間または２４時間の消化条件で生成された切断産物を比較すると、インタクトな（カットされていない）重鎖のレベルが低下し、切断された重鎖（カットされた）のレベルが上昇し、インタクトな（カットされていない）軽鎖のレベルが低下し、切断された軽鎖（カットされた）のレベルが上昇する（図６Ｅ、レーン７～１１）。ＭＭＰ２を用いた消化では、インタクトな（カットされていない）重鎖のレベルのわずかな低下および切

断された重鎖（カットされた）のレベルのわずかな上昇が生じ、インタクトな（カットされていない）軽鎖のレベルに検出可能な変化は示されず、切断された軽鎖（カットされた）は非常にわずかに上昇する（図６Ｅ、レーン１～５）。レーン１２は対照抗ＥＧＦＲ抗体であり、レーン６「Ｍ」は分子量マーカーである。

【０４４８】

（実施例５）

改変された配列ペプチドリンカーの切断およびゲル分析。

改変されたＭＭＰ２／９切断配列またはｕＰＡ１切断配列を有するペプチドリンカーを有する種々の活性化可能な遮蔽された抗体（抗ＥＧＦＲ）を、消化時間を１時間、３時間、５時間または２０時間で行ったこと以外は上記の実施例３に記載の通り、ＭＭＰ２、ＭＭＰ９またはｕＰＡプロテアーゼを用いた消化に供した。得られた消化産物を、４～２０％勾配のＴｒｉｓ－グリシンＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルで、還元条件下で（還元剤は、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＮＵＰＡＧＥ　１０×Ｓａｍｐｌｅ　Ｒｅｄｕｃｉｎｇ　Ａｇｅｎｔである）ゲル電気泳動によって分析した。結果を図７Ａ～Ｃに示す。図７Ａ～Ｃに示されているマーカー「Ｍ」は、ＳＰＥＣＴＲＡ　Ｍｕｌｔｉｃｏｌｏｒ　Ｂｒｏａｄ　Ｒａｎｇｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｌａｄｄｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ製、カタログ番号２６６２３）である。

【０４４９】

図７Ａ：活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］のＭＭＰ９を用いた消化により、カットされた重鎖およびカットされた軽鎖を含む予測切断産物が生成される。１時間、３時間、５時間または２０時間の消化条件で生成された切断産物を比較すると、インタクトな（カットされていない）重鎖のレベルが３時間後に消失し、切断された重鎖（カットされた）のレベルが１時間の消化後に現れ、インタクトな（カットされていない）軽鎖のレベルが低下し、切断された軽鎖（カットされた）のレベルが上昇し、カットされた遮蔽性部分のレベルが上昇する（図７Ａ、レーン１～４）。ＭＭＰ２を用いた消化では、予測切断産物が生成されるが、ＭＭＰ９を用いた消化と比較してレベルが低い。１時間、３時間、５時間または２０時間の消化条件で生成された切断産物を比較すると、インタクトな（カットされていない）重鎖のレベルが低下し、切断された重鎖（カットされた）のレベルが１時間の消化後に現れ、インタクトな（カットされていない）軽鎖のレベルがわずかに低下し、切断された軽鎖（カットされた）のレベルがわずかに上昇し、カットされた遮蔽性部分のレベルが上昇する（図７Ａ、レーン６～９）。ｕＰＡを用いた消化では、いかなる検出可能な切断産物も生成されない（図７Ａ、レーン１１～１４）。レーン１０「Ｍ」は分子量マーカーである。

【０４５０】

図７Ｂ：活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＧＳ］のＭＭＰ９を用いた消化により、カットされた重鎖およびカットされた軽鎖を含む予測切断産物が生成される。１時間、３時間、５時間または２０時間の消化条件で生成された切断産物を比較すると、インタクトな（カットされていない）重鎖のレベルが低下し、切断された重鎖（カットされた）のレベルが１時間の消化後に現れ、インタクトな（カットされていない）軽鎖のレベルが低下し、切断された軽鎖（カットされた）のレベルが上昇し、カットされた遮蔽性部分のレベルが上昇する（図７Ｂ、レーン１～４）。ＭＭＰ２を用いた消化では、検出可能な切断産物は生成されない。（図７Ｂ、レーン６～９）。ｕＰＡを用いた消化では、検出可能な切断産物は生成されない（図７Ｂ、レーン１１～１４）。レーン１０「Ｍ」は分子量マーカーである。

【０４５１】

図７ＢＣ：活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ９、ＬＣ－ＣＨ３ノブｕＰＡ１］のＭＭＰ９を用いた消化により、予測される重鎖切断産物が生成される。１時間、３時間、５時間または２０時間の消化条件で生成された切断産物を比較すると、インタクトな（カットされていない）重鎖のレベルが低下し、切断された重鎖（カットされた）のレベルが１時間の消化後に現れ、カットされた遮蔽性部分は低レベルで検出可能

であるが、切断された軽鎖産物は検出不可能である（図７Ｃ、レーン１～４）。ＭＭＰ２を用いた消化では、インタクトな重鎖のレベルが減少し、カットされた重鎖のレベルが上昇し、カットされた遮蔽性部分が低レベルで検出可能であるが、切断された軽鎖産物は検出不可能である（図７Ｃ、レーン６～９）。ｕＰＡを用いた消化では、検出可能な重鎖切断産物は生成されないが、インタクトな軽鎖のレベルが低下し、カットされた軽鎖のレベルが上昇し、カットされた遮蔽性部分が低レベルで検出可能である（図７Ｃ、レーン１１～１４）。レーン５「Ｍ」は分子量マーカーである。

【０４５２】

（実施例６）

プロテアーゼ切断産物の質量分析。

プロテアーゼにより消化された活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体の質量を、抗体を脱グリコシル化反応に供し、次いで質量分析によって分析することによって決定した。

【０４５３】

活性化可能な遮蔽された抗体を、上記の実施例３に記載の手順に従って、ＭＭＰ９以外を用いて消化したかまたはＭＭＰ９を用いて消化した。これらの抗体はＦａｂおよびＦｃドメインを生じる消化はなされなかった。ＭＭＰ９により消化された活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体１０マイクログラムを水と混合し、総体積を８μＬにし、次いで、５×ＰＮＧａｓｅ　Ｆ　Ｂｕｆｆｅｒ（非還元フォーマット、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ、カタログ番号Ｂ０７１７Ｓ）２μＬを添加して総反応体積を１０μＬにし、それを７５℃で５分間インキュベートした。混合物を室温まで放冷した。Ｒａｐｉｄ　ＰＮＧａｓｅ　Ｆ（非還元フォーマット、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　ＢｉｏＬａｂｓ、カタログ番号Ｐ０７１１）１μＬを添加し、それを５０℃で１０分間インキュベートすることにより、脱グリコシル化反応を行った。

【０４５４】

脱グリコシル化試料およそ２μｇをＱ　ＥＸＡＣＴＩＶＥ　Ｐｌｕｓ　ＢｉｏＰｈａｒｍａ質量分析計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）に接続されたＨＥＳＩ供給源を備えたＶＡＮＱＵＩＳＨ　ＨＯＲＩＺＯＮ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ製、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）においてポジティブイオンモードで分析することにより、液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ－ＭＳ）を行った。ＵＰＬＣ　Ｗａｔｅｒｓ　ＢＥＨ　Ｃ４カラム（２．１×１５０ｍｍ、３００オングストローム孔径）によって、毎分０．３５ｍＬの流速で、カラム温度を８０℃に維持しながら、インタクトな抗体を分離した。移動相Ａは水中０．１％（ｖ／ｖ）ギ酸であり、移動相Ｂは１００％アセトニトリル中０．１％（ｖ／ｖ）ギ酸であった。１０％移動相Ｂから開始し、１０％Ｂで５分間保持し、相Ｂを１分後に２５％まで、１４分時点で６０％まで、次いで、１５分時点で９０％Ｂまで、直線的に増加させた。ＭＳデータをＨＭＲモードで取得した。取得したＭＳデータをＴｈｅｒｍｏ　ＢｉｏＰｈａｒｍａ　Ｆｉｎｄｅｒソフトウェアを使用して解析した。

【０４５５】

抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ重鎖は、８８位（例えば、Ｆａｂ領域内）および２９９位（例えば、Ｆｃ領域内）にアルギニン残基を含有し、これらは、潜在的な翻訳後グリコシル化部位である。上記の実施例３において重鎖アミノ酸配列内の「Ｎ」残基は太字で下線が引かれている。

【０４５６】

抗体重鎖を発現するＣＨＯ細胞は、Ｃ末端リシン残基を切断することが公知である。したがって、発現されたＩｇＧ型抗体（例えば、本明細書に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体）は、両方の重鎖からリシン残基が除去された抗体、または重鎖の一方からリシン残基が除去された抗体、または両方の重鎖がＣ末端リシン残基を保持する抗体の不均一な集団を含有し得る。本明細書の実施例に記載の活性化可能な遮蔽されたＩｇＧ型抗体をＣＨＯ細胞において発現させた。上記の実施例３に記載の活性化可能な遮蔽された抗体のアミノ酸配列に関して、重鎖のＣ末端リシンは太字の下線が引かれたフォントで示さ

れている。

【０４５７】

ＭＭＰにより消化されたまたはインタクトな活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］および［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］の脱グリコシル化された形態の理論分子量を、上記の実施例３に列挙されているＭＭＰ９により切断された遮蔽された抗体の予測アミノ酸配列を使用して算出し、実験的に決定された分子量と比較した。

【０４５８】

図８Ａ～９Ｃ、および表１６～１９において、「－２Ｋ」という用語は、両方の重鎖からＮ末端リシンが除去されたＩｇＧ分子を指し、「－Ｋ」という用語は、重鎖の一方にＮ末端リシンを有するＩｇＧ分子を指し、「＋２Ｋ」という用語は、両方の重鎖にＮ末端リシンが保持されているＩｇＧ分子を指し、「＋Ｇ２Ｆ２Ｓ」という用語は、グリカンを指す。

【０４５９】

消化されていない［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］についてのＬＣ－ＭＳデータを図８Ａに示す。以下の表１６に示されている通り、理論分子量は実験的に決定された分子量と非常に近い。

【表１６】

表 16:図 8A を参照されたい

消化されていない: HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9	
理論的に算出された MW (Da)	**実験 MW (Da)**
196632.8 [2*(カットされていない HC+カットされていない LC), -2K]	196634.77

【０４６０】

ＭＭＰ９により消化された［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］についてのＬＣ－ＭＳデータを、検出された分子の質量範囲に対応するために２つの図に分割し、図８ＢおよびＣに示す。以下の表１７に示されている通り、理論分子量は実験的に決定された分子量と非常に近い。

【表１７】

表 17:図 8B および C を参照されたい

MMP9 により消化された: HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9	
理論的に算出された MW (Da)	**実験 MW (Da)**
147075.1 [2*(短い HC+短い LC), **+2K**]	147077.8
146947.1 [2*(短い HC+短い LC), -K]	146949.2
146819.1 [2*(短い HC+短い LC), -2K]	146821.9
149171.3 [2*(短い HC+短い LC), -2K,+G2F2S]	149173.3

【０４６１】

消化されていない［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］についてのＬＣ－ＭＳデータを図９Ａに示す。以下の表１８に示されている通り、理論分子量は実験的に決定された分子量と非常に近い。

【表１８】

表 18:図 9A を参照されたい

消化されていない: HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9	
理論的に算出された MW (Da)	**実験 MW (Da)**
192251.6 [2*(カットされていない HC+カットされていない LC), **+2K**]	192262.1
192123.6 [2*(カットされていない HC+カットされていない LC), -K]	192120.9
191995.6 [2*(カットされていない HC+カットされていない LC), -2K]	191994.2

【０４６２】

ＭＭＰ９により消化された［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］についてのＬＣ－ＭＳデータを、検出された分子の質量範囲に対応するために２つの図に分割し、図９ＢおよびＣに示す。以下の表１９に示されている通り、理論分子量は実験的に決定された分子量と非常に近い。

【表１９】

表 19:図 9B および C を参照されたい

MMP9 により消化された: HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9	
理論的に算出された MW (Da)	**実験 MW (Da)**
147075.1 [2*(短い HC+短い LC), **+2K**]	147076.5
146947.1 [2*(短い HC+短い LC), -K]	146948.4
146819.1 [2*(短い HC+短い LC), -2K]	146821.3
149171.3 [2*(短い HC+短い LC), -2K,+G2F2S]	149171.5

【０４６３】

（実施例７）

種々のＩｇＧ型の活性化可能な遮蔽された抗体の細胞結合アッセイのＦＡＣＳ分析。

フローサイトメトリーを使用して細胞結合アッセイを行って、カットされていない（黒塗りの丸）またはＭＭＰ９を用いてカットされた（黒塗りの四角）、活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］のＥＣ５０値を決定し、対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りの三角形）と比較した。さらに、カットされていない、および、カットされた、活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールｕＰＡ１、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］を試験し、対照抗ＥＧＦＲ抗体と比較した。

【０４６４】

活性化可能な遮蔽された抗体を、上記の実施例３に記載のプロトコールに従い、ＭＭＰ９を用いて消化した。ＥＧＦＲ陽性腫瘍細胞株ＭＤＡ－ＭＢ－２３１（低ＥＧＦＲ発現）、Ａ４３１（高ＥＧＦＲ発現）およびＭＤＡ－ＭＢ－４６８（高ＥＧＦＲ発現）を使用した。細胞を洗浄し、ＦＡＣＳ緩衝剤中に再懸濁させた。細胞を計数し、０．０１％アジ化ナトリウムを含有するＦＡＣＳ緩衝剤中に１ｍＬ当たり細胞１×１０^{6}個まで希釈し、５

０μＬ（約５０，０００個の細胞）を透明なＶ底９６ウェルプレートに分注し、１２００ＲＰＭで５分間高速回転させた。上清を除去し、段階希釈した抗体３０μＬを添加した。抗体を１０μｇ／ｍＬから５０μｇ／ｍＬの間の出発濃度まで希釈し、次いで、ＦＡＣＳ緩衝剤を使用して３倍段階希釈した。各濃度の抗体を細胞に２連または３連で添加した。４℃で１時間インキュベートした後、ＦＡＣＳ緩衝剤１１０μＬを各ウェルに添加し、プレートを１２００ＲＰＭで５分間高速回転させた。上清を除去した後、抗ヒトＩｇＧ－ＰＥまたは－ＡＰＣまたは－ＦＩＴＺ／Ａｌｅｘａ４８８二次抗体を５００倍希釈でＦＡＣＳ緩衝剤＋０．０１％アジドに添加し、４℃で２５分間インキュベートした。細胞をＦＡＣＳ緩衝剤１１０μＬで洗浄し、高速回転させた。細胞をＦＡＣＳ緩衝剤３０μＬ中に再懸濁させ、結合について、Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ　ＦＡＣＳを使用してＦＡＣＳによる分析を行った。データをＦｌｏ－ＪｏおよびＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを使用して解析した。

【０４６５】

図１０Ａは、活性化可能な遮蔽された抗体のＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞への結合の結果を示す。ＭＭＰ９により消化された抗体は、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞に対照抗ＥＧＦＲ抗体と同様のレベルで結合するが、一方、カットされていない抗体は、乏しい細胞結合を示す。

【０４６６】

図１０Ｂは、活性化可能な遮蔽された抗体のＡ４３１細胞への結合の結果を示す。ＭＭＰ９により消化された抗体は、Ａ４３１細胞に対照抗ＥＧＦＲ抗体と同様のレベルで結合するが、一方、カットされていない抗体は、乏しい細胞結合を示す。

【０４６７】

図１０Ｃは、活性化可能な遮蔽された抗体のＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞への結合の結果を示す。ＭＭＰ９により消化された抗体は、ＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞に対照抗ＥＧＦＲ抗体と比較して高レベルで結合するが、一方、カットされていない抗体は、乏しい細胞結合を示す。

【０４６８】

第１のペプチドリンカーと接合した第１の重鎖可変領域、および第２のペプチドリンカーと接合した第１の軽鎖可変領域を有する活性化可能な遮蔽された抗体であって、第１および第２のペプチドリンカーが、異なる長さおよび配列を含み、また、異なるプロテアーゼで切断可能である、活性化可能な遮蔽された抗体を用いて細胞結合アッセイを行った。例えば、カットされていないか、またはＭＭＰ９プロテアーゼを用いて消化された、活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールｕＰＡ１；ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］の細胞への結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ａｂｉｌｉｔｙ）を、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、Ａ４３１およびＭＤＡ－ＭＢ－４６８細胞について試験した。ＥＣ５０値を以下の表２０に列挙する（＊＊で示されている、カットされていない抗体およびカットされた抗体を参照されたい）。

【０４６９】

これらのＦＡＣＳアッセイから得られたＥＣ５０値と算出されたＥＣ５０の比を以下の表２０に列挙する：

【表２０】

表 20:図 10A～C を参照されたい

細胞株:	カットされていないまたは MMP9 を用いてカットされた抗体:	EC50:	EC50 比:
MDA-MB-231	対照抗 EGFR 抗体	0.43 nM	N/A
	カットされていない[HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]	28 nM	65X
	カットされた[HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]	0.58 nM	
A431	対照抗 EGFR 抗体	3.5 nM	N/A
	カットされていない[HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]	17.5 nM	5X
	カットされた[HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]	3.1 nM	
MDA-MB-468	対照抗 EGFR 抗体	5.8 nM	N/A
	カットされていない[HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]	22.5 nM	3.9X
	カットされた[HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]	5.1 nM	
MDA-MB-231	対照抗 EGFR 抗体	0.43 nM	N/A
	カットされていない[HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ MMP2/9]**	16.4 nM	38X
	カットされた[HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ MMP2/9]**	0.4 nM	
A432	対照抗 EGFR 抗体	3.5 nM	N/A
	カットされていない[HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ MMP2/9]**	21 nM	6X
	カットされた[HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ MMP2/9]**	6 nM	
MDA-MB-468	対照抗 EGFR 抗体	5.8 nM	N/A
	カットされていない[HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ MMP2/9]**	38.9 nM	6.7X
	カットされた[HC-CH3 ホール uPA1、LC-CH3 ノブ MMP2/9]**	2 nM	

【０４７０】

（実施例８）

種々のＩｇＧ型の活性化可能な遮蔽された抗体のＥＬＩＳＡ分析

カットされていない、および、カットされた、活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ型抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］および［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］の結合特徴を比較し、また、対照抗ＥＧＦＲ抗体と比較するために、ＥＬＩＳＡアッセイを行った。

【０４７１】

活性化可能な遮蔽された抗体を、上記の実施例３に記載のプロトコールに従い、ＭＭＰ

９を用いて消化した。組換えＥＧＦＲタンパク質細胞外ドメインをマイクロタイタープレート上に吸着させ、その後、ＰＢＳ中ＢＬＯＣＫＥＲ　Ｃａｓｅｉｎ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ製、カタログ番号３７５２８）を用いてブロッキングした。試験抗体または対照抗体を一連の希釈度で添加した。酵素で標識された、試験抗体に結合する抗ヒトＩｇＧ試薬を添加した。発色基質３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）を添加した。プレートリーダーを使用して色の変化を検出した。過剰な未結合試薬を除去するために、ステップ間に洗浄ステップを含める。

【０４７２】

ＥＬＩＳＡの結果を図１１Ａ～Ｈに示し、ＥＣ５０および比を以下の表２１～２８に列挙する。全ての場合において、抗ＥＧＦＲ抗体はカットされていない。

【０４７３】

図１１Ａ：組換えＥＧＦＲタンパク質と、カットされていない対照抗ＥＧＦＲ抗体（トレースＡ、白抜きの三角形）、カットされていない抗ＥＧＦＲ［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］（トレースＢ、黒塗りの三角形）、およびカットされていない抗ＥＧＦＲ［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］（トレースＣ、黒塗りのひし形）の結合の結合曲線。ＥＣ５０値および比（カットされていない対照抗ＥＧＦＲ抗体のＥＣ５０／カットされていない遮蔽された抗体のＥＣ５０値）を以下の表ＥＥに列挙する。結合曲線およびＥＣ５０値は、カットされていない抗ＥＧＦＲ［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］の遮蔽能が、カットされていない抗ＥＧＦＲ［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］と比較してわずかに良好であることを示す。

【表２１】

表 21:図 11A を参照されたい

抗体:	**EC50:**	**比:**
対照抗 EGFR 抗体	22.9 pM	N/A
カットされていない: [HC-CH3 ホール MMP2/9、 LC-CH3 ノブ MMP2/9]	5.5 nM	240
カットされていない: [HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9]	2.3 nM	100

【０４７４】

図１１Ｂ：組換えＥＧＦＲタンパク質と、カットされていない対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りのひし形）およびカットされていない活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ欠失］（黒塗りの丸）および［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］（黒塗りの四角）および［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］（黒塗りの三角形）および［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］（黒塗りの逆さの三角形）の結合の結合曲線。ＭＭＰ９を用いてカットされた［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］についての結合曲線も示されている（「カットされた」）。ＥＣ５０値を以下の表２２に列挙する。結合曲線およびＥＣ５０値から、カットされていない遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ欠失］の遮蔽能が、図１１Ｂに示されている他のカットされていない遮蔽された抗体と比較してわずかに良好であること、および、［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］がＭＭＰ９で切断されることにより、その標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）が、対照抗ＥＧＦＲ抗体の結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）と比較して部分的に回復することが示される。

【表２２】

表 22:図 11B を参照されたい

抗体:	**EC50:**
カットされていない: 対照抗 EGFR 抗体	22.9 pM
カットされていない: [HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]	5.1 nM
カットされていない: [HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ欠失]	7.3 nM
カットされていない: [HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ切断不可能]	4.1 nM
カットされていない: [HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ伸長]	2.8 nM
カットされた: [HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ切断不可能]	163.5 pM

【０４７５】

図１１Ｃ：組換えＥＧＦＲタンパク質と、カットされていない対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りのひし形）およびカットされていない活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ欠失］（黒塗りの丸）および［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］（黒塗りの四角）および［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］（黒塗りの三角形）および［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］（黒塗りの逆さの三角形）の結合の結合曲線。ＭＭＰ９を用いてカットされた［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］についての結合曲線も示されている（「カットされた」）。ＥＣ５０値を以下の表２３に列挙する。結合曲線およびＥＣ５０値から、カットされていない遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］の遮蔽能が、図１１Ｃに示されている他のカットされていない遮蔽された抗体と比較してわずかに良好であること、および［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］がＭＭＰ９で切断されることにより、その標的抗原に対する結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）が、対照抗ＥＧＦＲ抗体の結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）と比較して部分的に回復することが示される。

【表２３】

表 23:図 11C を参照されたい

抗体:	**EC50:**
カットされていない: 対照抗 EGFR 抗体	34.1 pM
カットされていない: [HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]	5.1 nM
カットされていない: [HC-CH3 ホール切断不可能、LC-CH3 ノブ欠失]	3.4 nM
カットされていない: [HC-CH3 ホール切断不可能、LC-CH3 ノブ切断不可能]	4.4 nM
カットされていない: [HC-CH3 ホール切断不可能、LC-CH3 ノブ伸長]	7.2 nM
カットされた: [HC-CH3 ホール切断不可能、LC-CH3 ノブ伸長]	113.5 pM

【０４７６】

図１１Ｄ：組換えＥＧＦＲタンパク質と、カットされていない対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りのひし形）およびカットされていない活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホール欠失、ＬＣ－ＣＨ３ノブ欠失］（黒塗りの丸）および［ＨＣ－ＣＨ３ホー

ル欠失、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］（黒塗りの四角）および［ＨＣ－ＣＨ３ホール欠失、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］（黒塗りの三角形）および［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］（黒塗りの逆さの三角形）の結合の結合曲線。ＥＣ５０値を以下の表２４に列挙する。結合曲線およびＥＣ５０値から、カットされていない遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホール欠失、ＬＣ－ＣＨ３ノブ欠失］の遮蔽能が、図１１Ｄに示されている他のカットされていない遮蔽された抗体と比較して良好であることが示される。

【表２４】

表 24:図 11D を参照されたい

抗体:	**EC50:**
カットされていない: 対照抗 EGFR 抗体	34.1 pM
カットされていない: [HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]	5.1 nM
カットされていない: [HC-CH3 ホール欠失、LC-CH3 ノブ欠失]	25.2 nM
カットされていない: [HC-CH3 ホール欠失、LC-CH3 ノブ切断不可能]	2.6 nM
カットされていない: [HC-CH3 ホール欠失、LC-CH3 ノブ伸長]	2.3 nM

【０４７７】

図１１Ｅ：組換えＥＧＦＲタンパク質と、カットされていない対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りのひし形）、およびカットされていない状態の活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］（黒塗りの丸）またはＭＭＰ９を用いて消化された活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］（黒塗りの逆さの三角形）の結合の結合曲線。ＥＣ５０値を以下の表２５に列挙する。結合曲線およびＥＣ５０値から、カットされた遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］のその標的抗原への結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）が対照抗ＥＧＦＲ抗体とほぼ同じレベルまで回復することが示される。

【表２５】

表 25:図 11E を参照されたい

抗体:	**EC50:**
カットされていない: 対照抗 EGFR 抗体	34.1 pM
カットされていない: [HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]	5.1 nM
カットされた: [HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]	35.9 pM

【０４７８】

図１１Ｆ：組換えＥＧＦＲタンパク質と、カットされていない対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りの三角形）、およびカットされていない状態の活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］（黒塗りの四角）またはＭＭＰ９を用いて消化された活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ１ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］（黒塗りのひし形）の結合の結合曲線。ＥＣ５０値を以下の表２６に列挙する。結合曲線およびＥＣ５０値から、カットされた遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］のその標的抗原への結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）が対照抗ＥＧＦＲ抗体

と同様のレベルまで回復することが示される。

【表２６】

表 26:図 11F を参照されたい

抗体:	**EC50:**
カットされていない: 対照抗 EGFR 抗体	34.1 pM
カットされていない: [HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9]	3.8 nM
カットされた: [HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9]	43.8 pM

【０４７９】

図１１Ｇ：組換えＥＧＦＲタンパク質と、カットされていない対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りのひし形）、および、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］（黒塗りの四角）またはＭＭＰ９を用いて消化された活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］（黒塗りの丸）の結合の結合曲線。ＥＣ５０値を以下の表２７に列挙する。結合曲線およびＥＣ５０値から、カットされた遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブ切断不可能］のその標的抗原への結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）が対照抗ＥＧＦＲ抗体の結合レベルまで部分的に回復することが示される。

【表２７】

表 27:図 11G を参照されたい

抗体:	**EC50:**
カットされていない: 対照抗 EGFR 抗体	34.1 pM
カットされていない: [HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ切断不可能]	4.1 nM
カットされた: [HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ切断不可能]	163.5 pM

【０４８０】

図１１Ｈ：組換えＥＧＦＲタンパク質と、カットされていない対照抗ＥＧＦＲ抗体（黒塗りのひし形）、およびカットされていない状態の活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］（黒塗りの三角形）またはＭＭＰ９を用いて消化された活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］（黒塗りの丸）の結合の結合曲線。ＥＣ５０値を以下の表２８に列挙する。結合曲線およびＥＣ５０値から、カットされた遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホール切断不可能、ＬＣ－ＣＨ３ノブ伸長］のその標的抗原への結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）が対照抗ＥＧＦＲ抗体の結合レベルまで部分的に回復することが示される。

【表２８】

表 28:図 11H を参照されたい

抗体:	EC50:
カットされていない: 対照抗 EGFR 抗体	34.1 pM
カットされていない: [HC-CH3 ホール切断不可能、LC-CH3 ノブ伸長]	7.2 nM
カットされた: [HC-CH3 ホール切断不可能、LC-CH3 ノブ伸長]	113.5 pM

【０４８１】

（実施例９）

タンパク質－タンパク質結合を測定するためのバイオレイヤー干渉法。

無標識バイオレイヤー干渉法を使用して、市販のヒトＥＧＦＲタンパク質と対照抗ＥＧＦＲ抗体または種々の活性化可能な遮蔽された抗ＥＧＦＲ抗体のいずれかの速度論的結合を測定した。ＡＲ２Ｇ（アミン反応性第２世代）センサー上のカルボキシ基を、ＥＤＣ（１－エチル－３－（３－ジメチル－アミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩）およびＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド）の水溶液中で活性化した。市販の組換えＥＧＦＲを、５μｇ／ｍｌの濃度の酢酸緩衝剤中、ｐＨ５．５で５分間にわたってセンサー上に固定化した。ＥＧＦＲタンパク質と、対照抗ＥＧＦＲ抗体、または、カットされていないかまたはＭＭＰ９もしくはＭＭＰ２プロテアーゼを用いて消化された活性化可能な遮蔽された抗体の時間依存的結合を検出した。対照抗ＥＧＦＲ抗体はＭＭＰ９による消化に供さなかった。試験した抗体は全て、ＰＢＳ緩衝剤中、等しいモル濃度、３０ｎＭであった。データ解析を製造者の指示に従って実施した。データを図１２Ａ～Ｃに示す。

【０４８２】

図１２Ａは、ＭＭＰ９プロテアーゼを用いて消化された活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］の結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）が、対照抗ＥＧＦＲ抗体の結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）と比較してわずかに良好であることを示す。

【０４８３】

図１２Ｂは、ＭＭＰ９プロテアーゼを用いて消化された活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］の結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）が、対照抗ＥＧＦＲ抗体の結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）と比較してわずかに良好であることを示す。

【０４８４】

図１２Ｃは、ＭＭＰ２プロテアーゼを用いて消化された活性化可能な遮蔽された抗体［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］の結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）が対照抗ＥＧＦＲ抗体の結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｃｉｔｙ）と同様であることを示す。［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］抗体の結合速度論値を以下の表２９に列挙する。

【表２９】

表 29:図 12C を参照されたい

IgG	推定 Kd (M)	Kon (1/Ms)	Kdis (1/s)
対照抗 EGFR 抗体	6.0E-10	3.7E6	2.3E-3
カットされていない: [HC-CH1 MMP2/9、LC-CL カッパ MMP2/9]	1.4E-7	4.8E3	1.2E-3
カットされた: [HC-CH1 MMP2/9、LC-CL カッパ MMP2/9]	2.0E-9	1.0E6	2.1E-3

【０４８５】

（実施例１０）

種々のＩｇＧ型の活性化可能な遮蔽された抗体の熱安定性の決定。

内在性トリプトファン蛍光シフト測定を使用して、種々のＩｇＧ型の活性化可能な遮蔽された抗体の熱安定性を決定した。Ｕｎｃｈａｉｎｅｄ　Ｌａｂｓ（Ｐｌｅａｓａｎｔｏｎ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）のＵＮｃｌｅを使用して、Ｔｍを測定した。典型的な実行において、０．１ｍｇ／ｍＬ～１００ｍｇ／ｍＬの濃度範囲の抗体９μＬをローディングした。３０℃から９０℃までの熱勾配を毎分１℃のスキャン速度で実施し、ＣＣＤデジタルカメラを使用して２５０～７２０ｎｍのスペクトル全域における蛍光を捕捉した。ＢＣＭによって算出された蛍光曲線がＵＮｃｌｅソフトウェアによって自動的に表示され、熱転移温度（Ｔｍ、または熱転移温度）の中点も表示された。結果を以下の表３０～３３に列挙する：

【表３０】

表 30: [HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]についての熱安定性測定:

試料:	Tm (°C)	平均 Tm1 (°C)	Tagg 266 (°C)	平均 Tagg (°C)
1 - 1.23 mg/mL	71	71.1	71.74	71.7
2 - 1.23 mg/mL	70.9		71.64	
3 - 1.23 mg/mL	71.5		71.62	

【表３１】

表 31: [HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9]についての熱安定性測定:

試料:	Tm (°C)	平均 Tm1 (°C)	Tagg 266 (°C)	平均 Tagg (°C)
1 - 1 mg/mL	65.5	65.3	67.8	67.7
2 - 1 mg/mL	65		67.6	
3 - 1 mg/mL	66.2		67.8	

【表３２】

表 32: [HC-CH1 MMP2/9、LC-CL カッパ MMP2/9]についての熱安定性測定:

試料:	Tm (°C)	平均 Tm1 (°C)	Tagg 266 (°C)	平均 Tagg (°C)
1 - 1 mg/mL	60.2	60	65.1	65.3
2 - 1 mg/mL	60.3		65.6	
3 - 1 mg/mL	60		65.2	

【表３３】

表 33:追加的な抗 EGFR IgG 型の活性化可能な遮蔽された抗体についての熱安定性測定:

活性化可能な遮蔽性部分:	Tm 1 (°C)	Tagg 266 (°C)
[HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ホール uPA1]	71	72.2
[HC-CH3 ホール MMP9、LC-CH3 ノブ G4S]	71.5	72.9
[HC-CH3 ホール欠失、LC-CH3 ノブ欠失]	70	71.2
[HC-CH3 ホール欠失、LC-CH3 ノブ切断不可能]	70	71.1
[HC-CH3 ホール欠失、LC-CH3 ノブ伸長]	69.9	71
[HC-CH3 ホール切断不可能、LC-CH3 ノブ欠失]	70.9	72.2
[HC-CH3 ホール切断不可能、LC-CH3 ノブ切断不可能]	69.7	70.6
[HC-CH3 ホール切断不可能、LC-CH3 ノブ MMP9]	69.6	70.8
[HC-CH3 ホール MMP9、LC-CH3 ノブ欠失]	69.2	70
[HC-CH3 ホール MMP9、LC-CH3 ノブ切断不可能]	70	70.8
[HC-CH3 ホール MMP9、LC-CH3 ノブ伸長]	69.5	70.5

【０４８６】

（実施例１１）

活性化可能な遮蔽された抗体を有する種々の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）模倣物の発現。

ＣＡＲまたはＤＡＲを模倣する膜アンカー型抗原結合性タンパク質を発現するトランスジェニックＨｅＬａを、ＦＵＧＥＮＥ６トランスフェクション試薬を使用して調製した。

【０４８７】

膜アンカー型抗原結合性タンパク質ＤＡＲ模倣物は、（１）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、抗体重鎖定常領域（ＣＨ）、ヒンジ領域、および膜貫通領域（ＴＭ）を含むが、細胞内シグナル伝達領域を欠く、第１のポリペプチド、ならびに（２）抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）（例えば、カッパまたはラムダ）、および抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む、第２のポリペプチド、を含むものであった。ＤＡＲ模倣物は、活性化可能な遮蔽性部分を含むものであったか、または活性化可能な遮蔽性部分を欠くものであった。図３ＡおよびＢの活性化可能な遮蔽されたＤＡＲ構築物の概略図を参照されたい。ＥＧＦＲまたはＣＤ３８に結合するＤＡＲ模倣物を調製した。

【０４８８】

ｓｃＦｖ分子に似た膜アンカー型抗原結合性タンパク質ＣＡＲ模倣物は、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）、柔軟なリンカー、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）、ヒンジ領域、および膜貫通

領域（ＴＭ）を含むが、細胞内シグナル伝達領域を欠くものであった。ＣＡＲ模倣物は全て活性化可能な遮蔽性部分を欠くものであった。ＥＧＦＲ、ＣＤ３８またはＢＣＭＡ抗原に結合するＣＡＲ模倣物を調製した。

【０４８９】

ＤＡＲ模倣物の第１および第２のポリペプチド鎖をそれぞれ別々の一過性発現ベクターに作動可能に接合し、それらをＨｅＬａ細胞に同時導入した。ＦＵＧＥＮＥ　ＨＤ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｅ２３１１）を使用して、活性化可能な遮蔽性部分を有する、または有さない、ＣＡＲまたはＤＡＲ抗原結合性タンパク質のいずれかを発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞を調製した。トランスフェクションを製造者の指示に従って行った。簡単に述べると、無血清培地（例えば、ＤＭＥＭ）を伴うエッペンドルフ管中、ＦＵＧＥＮＥ６試薬を混合することによってトランスフェクション溶液を調製した。ＣＡＲまたはＤＡＲ抗原結合性タンパク質をコードするＤＮＡ（例えば、発現プラスミドまたは発現ウイルスベクター）を含有する別の管にＤＭＤＭ／ＦＵＧＥＮＥ６溶液を添加した。ＤＭＥＭ／ＦＵＧＥＮＥ６およびプラスミド溶液を作製するために使用したＦＵＧＥＮＥ６およびＤＮＡの数量は製造者のプロトコールに従った。一般には、１０ｃｍウェルの細胞（約10^4個または10^6個の細胞）に対して、２μｇのＤＮＡと、１：２から１：３の間の比で変動する体積（μＬ単位）のＦＵＧＥＮＥ６試薬。ＦＵＧＥＮＥ６およびプラスミドを含有するＤＭＥＭ培地を室温で１５分間インキュベートすることによって複合体を形成させた。形成された複合体を含有するＤＭＥＭ培地をＨｅＬａ細胞に、上部に滴下し、旋回させて混合することによって直接添加した。細胞をインキュベーターに入れて一晩置き、２日目または３日目にＣＡＲまたはＤＡＲ発現を確認した。

【０４９０】

抗ＥＧＦＲおよび抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物（活性化可能な遮蔽性部分を有するもの、および活性化可能な遮蔽性部分を欠くもの）のヒンジおよび膜貫通部分は血小板由来増殖因子受容体（ＰＤＧＦＲ）に由来するものであった。

【化２５】

PDGFR ヒンジ：　配列番号　**41:**

AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV

PDGFR 膜貫通　　：　配列番号　**42:**

VVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR.

PDGFR ヒンジ／膜貫通　　：　配列番号　**43**

AVGQDTQEVIVVPHSLPFKV VVISAILALVVLTIISLIILIMLWQKKPR

。

【０４９１】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲまたは抗ＣＤ３８　ＤＡＲまたはＣＡＲ（またはＤＡＲ模倣物またはＣＡＲ模倣物）は、ＣＤ２８もしくはＣＤ８、またはＣＤ２８とＣＤ８の両方に由来するヒンジ配列を含み得る。

【化２６】

CD28 ヒンジ： 配列番号 **44**

KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP

CD8 ヒンジ： 配列番号 **45**

AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPR

長いヒンジ配列 ：**CD8** および **CD28** ヒンジ配列 ： 配列番号 **46**

AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAPRKIEVMY
PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP

【０４９２】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲまたは抗ＣＤ３８ ＤＡＲまたはＣＡＲ（またはＤＡＲ模倣物またはＣＡＲ模倣物）は、ＣＤ２８に由来する膜貫通配列を含み得る。

【化２７】

CD28: 膜貫通 ： 配列番号 **47**

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

【０４９３】

一実施形態では、活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲまたは抗ＣＤ３８ ＤＡＲまたはＣＡＲは、少なくとも１種の細胞内シグナル伝達配列を含み得る。

【化２８－１】

4-1BB シグナル伝達領域 ： 配列番号 **48**

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

CD28 シグナル伝達領域 ： 配列番号 **49**

RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

【化２８－２】

CD3 ゼータシグナル伝達領域 ： 配列番号 **50**

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH
MQALPPR

CD3- ゼータシグナル伝達領域 **(ITAM 3):** 配列番号 **51**

RVKFSRSADKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【０４９４】

（実施例１２）

活性化可能な遮蔽性部分を有する種々の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）模倣物のペプチドリンカーの切断。

活性化可能な遮蔽性部分を有する種々の抗ＥＧＦＲ ＤＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞を、ＭＭＰ９を用いた消化に供した。およそ２×１０^{4}個のトランスジェニックＨｅＬａ細胞を、ＤＰＢＳ／２％ウシ胎仔血清中０．４μｇのＭＭＰ９プロテアーゼ（Ｏｒｉｇｅｅｎの組換えヒトＭＭＰ９、ＣＡＴ＃：ＴＰ３０２８７２、またはＲｎＤ Ｓｙｓｔｅｍｓの組換えヒトＭＭＰ９、ＣＡＴ＃９１１－ＭＰ－０１０）と２５℃で約１５時間にわたって反応させた。ＡＰＭＡ活性化は行わなかった。

【０４９５】

（実施例１３）

活性化可能な遮蔽された抗体を有する種々の抗ＥＧＦＲ二量体抗原受容体（ＤＡＲ）模倣物の細胞結合アッセイのＦＡＣＳ分析。

活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞（上記の実施例１１に記載の通り）を、遮蔽性レベルを反映するものとして抗原結合のレベルを評定するため、およびトランスジェニックＨｅＬａ細胞によるＣＡＲまたはＤＡＲ模倣物の発現のレベルを評定するために、フローサイトメトリーを使用した細胞結合アッセイにおいて試験した。活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物は、図３Ａの概略図に示されている通り構成されたものである。抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現するＨｅＬａ細胞および抗ＥＧＦＲ　ＣＡＲ模倣物を発現するＨｅＬａ細胞を、抗ヒトカッパＡＰＣ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ製）と１：１００希釈度で、およびフルオロフォアで標識されたＥＧＦＲ抗原（ＥＧＦＲ－Ａｌｅｘａ　４８８）と１：１００希釈度で反応させた。陽性対照トランスジェニックＨｅＬａ細胞はペプチドリンカーまたは遮蔽性部分を有さない対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現するものであり、陰性対照は非トランスジェニックＨｅＬａ細胞であった。ＦＡＣＳの結果を図１３Ａ～Ｅおよび図１４Ａ～Ｄに示す。

【０４９６】

図１３Ａ：抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ１）ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ１）ＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（左；Ｑ２値は３２．８である）と、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、活性化可能な遮蔽性部分がない対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現する陽性対照トランスジェニックＨｅＬａ細胞（中央；Ｑ２値は７１．５である）のＱ２四分円との、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する陰性対照非トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＱ２四分円（右；Ｑ２値は０．０２２である）との、比較。

【０４９７】

図１３Ｂ：抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞（左；Ｑ２値は６９．０である）を示すＱ２四分円と、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、活性化可能な遮蔽性部分がない対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現する陽性対照トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＱ２四分円（中央；Ｑ２値は７１．５である）との比較、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する陰性対照非トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＱ２四分円（右；Ｑ２値は０．０２２である）との比較。

【０４９８】

図１３Ｃ：抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞（左；Ｑ２値は３６．４である）を示すＱ２四分円と、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、活性化可能な遮蔽性部分がない対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現する陽性対照トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＱ２四分円（中央；Ｑ２値は７１．５である）との比較、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する陰性対照非トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＱ２四分円（右；Ｑ２値は０．０２２である）との比較。

【０４９９】

図１３Ｄ：抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞（左；Ｑ２値は４６．０である）を示すＱ２四分円と、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、活性化可能な遮蔽性部分がない対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現する陽性対照トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＱ２四分円（中央；Ｑ２値は７１．５である）との比較、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する陰性対照非トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＱ２四分円（右；Ｑ２値は０．０２２である）との比較。

【０５００】

図１３Ｅ：抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－３８Ｃ２－ＶＨ　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－３８Ｃ２－ＶＬ　ＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞（左；Ｑ２値は１４．９である）を示すＱ２四分円と、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、活性化可能な遮蔽性部分がない対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現する陽性対照トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＱ２四分円（中央；Ｑ２値は７１．５である）との比較、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する陰性対照非トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＱ２四分円（右；Ｑ２値は０．０２２である）との比較。試験ＤＡＲ模倣物構築物（右）内の対をなす遮蔽性部分は、アルドラーゼ触媒抗体３８Ｃ２由来の可変重鎖領域を含む第１の遮蔽性部分と、アルドラーゼ触媒抗体３８Ｃ２由来の可変軽鎖領域を含む第２の遮蔽性部分とを含む。アルドラーゼ触媒抗体３８Ｃ２は、エナミン機構を介したアルドール反応を触媒して、反応性基質分子（例えば、ケトン）との共有結合／連結を形成し得る反応性アミノ酸残基（例えば、リシン）を有する抗原結合性ドメインを有する（Wagner 1995 Science 270: 1797; Wirshing 1995 Science 270: 1775; Barbas 1997 Science 278:2085; and Hoffmann 1998 Journal of American Chemical Society 120:2768）。

【０５０１】

抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞（図１４Ａ；Ｑ２値は３７．０である）を示すＱ２四分円と、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、ＭＭＰ９を用いて消化された、活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ１　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞のＱ２四分円（図１４Ｂ；Ｑ２値は５５．９である）との比較、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、活性化可能な遮蔽性部分がない対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現する陽性対照トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＱ２四分円（図１４Ｃ；Ｑ２値は５１．８である）との比較、抗ヒトカッパＡＰＣおよび標的抗原ＥＧＦＲ（Ａｌｅｘ　４８８で標識されたもの）に結合する、抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現せず、活性化可能な遮蔽性部分も有さない、陰性対照非トランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１４Ｄ；Ｑ２値は０．２１である）との比較。

【０５０２】

（実施例１４）

活性化可能な遮蔽された抗体を有する種々の抗ＣＤ３８二量体抗原受容体（ＤＡＲ）模倣物の細胞結合アッセイのＦＡＣＳ分析。

活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物を発現するトランスジェニ

ックＨｅＬａ細胞（上記の実施例１１に記載の通り）を、遮蔽性レベルを反映するものとして抗原結合のレベルを評定するため、およびトランスジェニックＨｅＬａ細胞によるＣＡＲまたはＤＡＲ模倣物の発現のレベルを評定するために、フローサイトメトリーを使用した細胞結合アッセイにおいて試験した。活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物は、図３Ａの概略図に示されている通り構成されたものである。抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物を発現するＨｅＬａ細胞および抗ＣＤ３８　ＣＡＲ模倣物を発現するＨｅＬａ細胞を、抗ヒトカッパＡＰＣ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ製）と１：１００希釈度で、およびフルオロフォアで標識されたＥＧＦＲ抗原（ＥＧＦＲ－Ａｌｅｘａ　４８８）と１：１００希釈度で反応させた。陽性対照トランスジェニックＨｅＬａ細胞はペプチドリンカーまたは遮蔽性部分を有さない対照抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物またはＣＡＲ模倣物を発現するものであり、陰性対照は非トランスジェニックＨｅＬａ細胞であった。ＦＡＣＳの結果を図１５Ａ～Ｈおよび図１６Ａ～Ｆに示す。

【０５０３】

ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１５Ａ；Ｑ２値は１７．１である）と、陽性対照である、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、活性化可能な遮蔽性部分を有さない抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１５Ｂ；Ｑ２値は４９．１である）との比較、陽性対照である、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、抗ＣＤ３８　ＣＡＲ模倣物を発現するが、活性化可能な遮蔽性部分を欠くトランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１５Ｃ；Ｑ２値は６３．８である）との比較、陽性対照である、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物を発現せず、活性化可能な遮蔽性部分も有さない陰性対照非トランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１５Ｄ；Ｑ２値は０．５６である）との比較。

【０５０４】

ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１５Ｅ；Ｑ２値は４．３２である）と、陽性対照である、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、活性化可能な遮蔽性部分を有さない抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１５Ｆ、これは図１５Ｂと同じである；Ｑ２値は４９．１である）との比較、陽性対照である、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、抗ＣＤ３８　ＣＡＲ模倣物を発現するが、活性化可能な遮蔽性部分を欠くトランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１５Ｇ、これは図１５Ｃと同じである；Ｑ２値は６３．８である）との比較、陽性対照である、ＰＥで標識されたＣＤ３８　ＦｃおよびＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体に結合する、抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物を発現せず、活性化可能な遮蔽性部分も有さない陰性対照非トランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１５Ｈ、これは図１５Ｄと同じである；Ｑ２値は０．５６である）との比較。

【０５０５】

ＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体およびＰＥで標識されたＣＤ３８　Ｆｃに結合する、活性化可能な遮蔽性部分を欠く抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１６Ａ；Ｑ２値は３６．６である）の、ＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体およびＰＥで標識されたＣＤ３８　Ｆｃに結合する、活性化可能な遮蔽性部分を欠く抗ＣＤ３８　ＣＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１６Ｂ；Ｑ２値は４２．３である）との比較、ＡＰＣで標識された抗

ヒンジ抗体およびＰＥで標識されたＣＤ３８　Ｆｃに結合する、活性化可能な遮蔽性部分を欠く抗ＢＣＭＡ　ＣＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１６Ｃ；Ｑ２値は５．０３である）との比較、ＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体およびＰＥで標識されたＣＤ３８　Ｆｃに結合する、非トランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１６Ｄ、Ｑ２値は０．１１である）との比較、ＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体およびＰＥで標識されたＣＤ３８　Ｆｃに結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３（ＩｇＧ４）ＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１６Ｄ；Ｑ２値は９．１９である）との比較、ＡＰＣで標識された抗ヒンジ抗体およびＰＥで標識されたＣＤ３８　Ｆｃに結合する、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＣＤ３８　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞を示すＱ２四分円（図１６Ｆ；Ｑ２値は５．６６である）との比較。

【０５０６】

（実施例１５）

活性化可能な遮蔽性部分を有する種々の抗ＥＧＦＲ二量体抗原受容体（ＤＡＲ）模倣物の画像化細胞結合アッセイ。

Ｉｎｃｕｃｙｔｅ　ｉｍａｇｉｎｇ　ｓｙｓｔｅｍ（Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ製）を使用して、ＭＭ１Ｒヒト多発性骨髄腫細胞からの馴化培地の存在下または非存在下で、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］の遮蔽性および結合能（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｃａｐａｂｉｌｉｔｙ）を評定した。

【０５０７】

１日目に、およそ２×１０^{4}個のＨｅＬａ細胞に、活性化可能な遮蔽性部分を欠く対照抗ＥＧＦＲ抗体をコードするか、または活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物をコードする配列を有する発現ベクターを、上記の実施例１１に記載の通り、ＦＵＧＥＮＥ６試薬を使用してトランスフェクトした。２日目に、培地を、新しく培養した腫瘍細胞株ＭＭ１ＲからのＭＭ１Ｒ馴化培地で置き換え、３７℃で２４時間インキュベートした。３日目に、ＨｅＬａ細胞を、４％パラホルムアルデヒドを用いて室温で１５分間にわたって固定し、その後、ＤＰＢＳで２回洗浄した。細胞を、０．５％Ｔｒｉｔｏｎ（登録商標）　Ｘ－１００を用いて室温で１０分間にわたって処理し、次いで、ＤＰＢＳで２回洗浄した。３％ＢＳＡ／ＤＰＢＳを用いてブロッキングステップを行い、マウス抗ヒトＬＣカッパ／ヤギ抗マウスＡｌｅｘａ　５９４およびＡｌｅｘａ　４８８で標識されたＥＧＦＲ　Ｆｃを用いて２重染色を行った。

【０５０８】

図１７は、抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞と、抗ヒトカッパＡＰＣまたはＡｌｅｘａ　４８８で標識されたＥＧＦＲ抗原のいずれかとの間の結合／染色を示す。図１７の顕微鏡画像（左から右への列）は、抗ヒトカッパＡＰＣを用いた染色、およびＡｌｅｘ　４８８で標識されたＥＧＦＲ抗原を用いた染色の明視野画像を示す。

【０５０９】

図１７において、一番上の行は、遮蔽性部分を欠く抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現する陽性対照トランスジェニックＨｅＬａ細胞の画像を示す。

【０５１０】

２行目は、抗ＥＧＦＲ抗体を発現しない陰性対照非トランスジェニックＨｅＬａ細胞の画像を示す。

【０５１１】

３行目は、ＭＭ１Ｒヒト多発性骨髄腫細胞からの馴化培地の非存在下における、カットされていない状態の遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ　ＭＭＰ

２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞の画像を示す。遮蔽性部分を有さないＤＡＲ模倣物を発現する対照ＨｅＬａ細胞（一番上の行）と遮蔽性部分を有するＤＡＲ模倣物を発現するＨｅＬａ細胞（３行目）との間でＡＰＣによる染色強度が同様であり、これにより、これらのトランスジェニックＨｅＬａ細胞が同様のレベルの抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物を発現することが示される。遮蔽性部分を欠くＤＡＲ模倣物を発現する陽性対照トランスジェニックＨｅＬａ細胞のＡｌｅｘ　４８８による染色強度は、カットされていない状態の遮蔽性部分を有するＤＡＲ模倣物を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞の染色強度と比較して高く、これにより、インタクトな遮蔽性部分により、ＤＡＲ模倣物とＥＧＦＲ抗原の結合が低減することが示される。

【０５１２】

一番下の行は、ＭＭ１Ｒヒト多発性骨髄腫細胞からの馴化培地の存在下における、カットされていない状態の遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ模倣物［ＨＣ－ＣＨ　ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬカッパＭＭＰ２／９］を発現するトランスジェニックＨｅＬａ細胞の画像を示す。ＭＭ１Ｒ馴化培地の非存在と存在下との間で、遮蔽性部分を有するＤＡＲ模倣物を発現するＨｅＬａ細胞のＡｌｅｘ　４８８による染色強度は同様であり、これにより、馴化培地に活性化可能な遮蔽性部分を切断するために十分なレベルのＭＭＰ９プロテアーゼが含有されず、したがって、遮蔽性部分がインタクトであり、それによりＤＡＲ模倣物とＥＧＦＲ抗原の結合が低減したことを示す。

【０５１３】

（実施例１６）

ＡＤＣＣアッセイにおけるＮＫ細胞傷害性：

ＡＤＣＣアッセイを行って、活性化可能な遮蔽性部分を有する種々の抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ型抗体のＥＣ５０値を決定した。ＮＫ（ナチュラルキラー）細胞を、ＥＡＳＹＳＥＰ　Ｈｕｍａｎ　ＮＫ　ｃｅｌｌ　ｅｎｒｉｃｈｍｅｎｔ　ｋｉｔ（ＳｔｅｍＣｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１９０５５）を使用してＰＢＭＣから精製し、ＲＰＭＩ　１０％ＦＢＳ中、２０～５０ＩＵ／ｍｌのＩＬ２の存在下でインキュベートした。ＥＧＦＲ陽性腫瘍細胞株Ｈ２９２細胞（前日にＣＦＳＥで標識した）を９６ウェルプレートにウェル当たり細胞１５，０００個で播種した。対照抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ型抗体またはカットされていない状態の遮蔽性部分を有する種々の抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ型抗体をＰＢＳ緩衝剤中に段階希釈し、１００ｎＭから１ｐＭ（０．０００００１ｎＭ）までの漸減濃度で９６ウェルプレート中のＨ２９２細胞に添加し、次いで、２０分間インキュベートした。ＮＫ細胞を各ウェルにＥ：Ｔ比（エフェクター細胞ＮＫ：標的細胞Ｈ２９２）が１：１になるように添加し、プレートを組織培養チャンバー中、およそ１４時間インキュベートした。ＦＡＣＳを使用して、アネキシン－Ｖ染色試薬を使用すると同時にＣＦＳＥで標識された標的Ｈ２９２細胞集団に対してゲーティングを行い、アポトーシス性標的細胞のパーセンテージを決定した（図１８を参照されたい）。ＥＣ５０値を決定し、それを以下の表３４に列挙する。

【０５１４】

ＡＤＣＣアッセイの結果から、対照抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ抗体と比較して、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ型抗体［ＨＣ－ＣＨ１ＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＬラムダＭＭＰ２／９］のＥＣ５０値が約７倍高く、カットされていない状態の活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ型抗体［ＨＣ－ＣＨ３ホールＭＭＰ２／９、ＬＣ－ＣＨ３ノブＭＭＰ２／９］または［ＨＣ－ＣＨ３ホール欠失、ＬＣ－ＣＨ３ノブ欠失］のＥＣ５０値が約７０倍高いことが示される。

【表３４】

表 34:図 18 を参照されたい

IgG 型抗体:	EC50:
対照抗 EGFR IgG 抗体	10.4 pM
[HC-CH3 ホール MMP2/9、LC-CH3 ノブ MMP2/9]	713.2 pM
[HC-CH3 ホール欠失、LC-CH3 ノブ欠失]	710.9 pM
[HC-CH1 MMP2/9、LC-CL ラムダ MMP2/9]	74.5 pM

【０５１５】

（実施例１７）

活性化可能な遮蔽された抗体を有し、細胞内シグナル伝達ドメインを有する種々の二量体抗原受容体（ＤＡＲ）の発現。

ｐｈｏｅｎｉｘ－ＥＣＯ（ヒト胎児由来腎臓細胞株）に、活性化可能な遮蔽性部分を有する抗ＥＦＧＲ　ＤＡＲ（細胞内シグナル伝達ドメインを有する）を発現させるために、ＦｕＧＥＮＥを使用してトランスフェクトを行った。

【０５１６】

遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ前駆体ポリペプチド鎖をコードする核酸をＭＦＧウイルスベクターにクローニングした。ｐｈｏｅｎｉｘ－ＥＣＯ細胞２００万個をＴ２５フラスコに播種し、３７℃、５％CO_2で一晩培養した。翌日、ＤＮＡ８μｇとＦｕＧＥＮＥ２４μＬ（１：３の比）をｐｈｏｅｎｉｘ－ＥＣＯ細胞と混合し、細胞を３７℃、５％CO_2でインキュベートした。トランスフェクションの４８時間後および９６時間後に、ウイルス上清を１６００ＲＰＭで８分間、高速回転させることによって収集した。ウイルス上清を使用してＰＧ１３細胞に形質導入した。

【０５１７】

ＲｅｔｒｏＮｅｃｔｉｎでコーティングした組織処理していない６ウェルプレートをＰＧ１３形質導入のために使用した。ｐｈｏｅｎｉｘ－ＥＣＯから採取したウイルス上清２ｍＬを添加し、ＲＴ、２５００ＲＰＭで２時間、高速回転させた。ウイルス上清を吸引し、次いで、ウイルス上清２ｍＬにＰＧ１３細胞６０万個を添加した。ＲＴ、２５００ＲＰＭで１時間、高速回転させた。細胞を３７℃、５％CO_2で一晩インキュベートした。翌日、形質導入を繰り返した。ＤＡＲ発現レベルがＤＡＲのＴ細胞への形質導入に必要なレベルである約９０％になるまで形質導入反応を２～３回繰り返した。ＤＡＲ発現レベルは、１：２００ＡＰＣ抗ヒトカッパＬＣを使用したフローサイトメトリーによって検出した。形質導入後４８時間、７２時間および９６時間の時点でそれぞれＰＧ１３ウイルス上清を収集した。Ｔ細胞への形質導入のためにＰＧ１３ウイルス上清を新しく調製して使用したかまたは－今後のＴ細胞形質導入反応のために－８０℃で保管した。

【０５１８】

ＰＢＭＣ（ヒト血液から新しく単離されたものまたは凍結されていたもの）をヒトＣＤ３／ＣＤ２８　Ｔ細胞活性化因子で処理した：ＰＢＭＣ１００万個当たりＴ細胞活性化因子３μＬ。活性化後２日目または３日目に、ＣＤ３集団およびＴ細胞活性化マーカーＣＤ２５をフローサイトメトリーによって確認した。概してＣＤ３＋集団は８５％を超えた。２日目または３日目の活性化Ｔ細胞をＤＡＲ形質導入に使用した。

【０５１９】

ウイルス上清２ｍＬをＰＧ細胞から採取し、ＲｅｔｒｏＮｅｃｔｉｎでコーティングした６ウェルプレートに添加し、室温、２５００ＲＰＭで２時間、高速回転させた。ウイルス上清を吸引し、次いで、活性化Ｔ細胞１００万個をウイルス上清２ｍＬに添加した。２５００ＲＰＭで１時間、高速回転させた。形質導入された活性化Ｔ細胞を３～４時間イン

キュベートし、次いで、培地をＴ細胞培養培地＋３００ＩＵ／ｍｌのＩＬ２と交換した。形質導入されたＴ細胞を３７℃、５％CO_2で一晩インキュベートした。最適なＤＡＲ発現に達するまでＴ細胞形質導入を１～４回繰り返した。

【０５２０】

遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲは、第１および第２のポリペプチド鎖を含み、ここで、（ａ）第１のポリペプチド鎖は、（ｉ）配列番号２４のアミノ酸配列を有する第１の遮蔽性部分；（ｉｉ）ＭＭＰ９またはｕＰＡで切断可能であるか、または切断不可能なリンカーを有し、それぞれ配列番号３２、５２または３４のアミノ酸配列を有する、第１のペプチドリンカー；（ｉｉｉ）配列番号２のアミノ酸配列の一部を有する抗体重鎖可変領域（ＶＨ）；（ｉｖ）配列番号２のアミノ酸配列の一部を有する抗体重鎖定常領域（ＣＨ）；（ｖ）配列番号４４のアミノ酸配列を有するＣＤ２８ヒンジ領域；（ｖｉ）配列番号４７のアミノ酸配列を有するＣＤ２８膜貫通領域（ＴＭ）；ならびに（ｖｉｉ）４－１ＢＢおよびＣＤ３ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含み、それぞれ配列番号４８および５０のアミノ酸配列を有する細胞内シグナル伝達領域、を含み、（ｂ）第２のポリペプチド鎖は、（ｉ）配列番号２５のアミノ酸配列を有する第２の遮蔽性部分；（ｉｉ）ＭＭＰ９またはｕＰＡで切断可能であるか、または切断不可能なリンカーを有し、それぞれ配列番号３２、５２または３４のアミノ酸配列を有する、第２のペプチドリンカー；（ｉｉｉ）配列番号５のアミノ酸配列の一部を有する抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）；ならびに（ｉｖ）配列番号５のアミノ酸配列の一部を有する抗体軽鎖定常領域（ＣＬ）、を含む。これらの遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲは、第１および第２の細胞内シグナル伝達ドメインを含有するが、第３の細胞内ドメインは欠くものであった（図３Ａに示されているＤＡＲ分子の実施形態）。

【０５２１】

対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ：トランスジェニックＴ細胞に、第１のポリペプチド鎖、自己切断性配列（例えば、Ｔ２Ａ）、および第２のポリペプチド鎖を含有し、配列番号５３のアミノ酸配列を含む対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ前駆体ポリペプチド鎖を発現させた（図２３を参照されたい）。Ｔ２Ａ配列により、前駆体分子の切断が媒介されて第１および第２のポリペプチド鎖が生成し、それらがアセンブルして、４－１ＢＢおよびＣＤ３ゼータ由来の細胞内シグナル伝達ドメインを有する、膜に埋め込まれたＤＡＲが形成された。Ｉｇガンマ－１　ＣＨ３遮蔽性部分を欠き、切断可能なリンカーを欠く遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲの予測された第１のポリペプチド鎖は、配列番号５４のアミノ酸配列を含む。Ｉｇガンマ－１　ＣＨ３遮蔽性部分を欠き、切断可能なリンカーを欠く遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲの予測された第２のポリペプチド鎖は、配列番号５５のアミノ酸配列を含む。重鎖および軽鎖リーダー配列は太字で下線が引かれている。

【０５２２】

ＭＭＰ２／９で切断可能なリンカーを有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ：トランスジェニックＴ細胞に、第１のポリペプチド鎖、自己切断性配列（例えば、Ｔ２Ａ）、および第２のポリペプチド鎖を含有し、配列番号５６のアミノ酸配列を含む抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ前駆体ポリペプチド鎖を発現させた（図２４を参照されたい）。Ｔ２Ａ配列により前駆体分子の切断が媒介されて、第１および第２のポリペプチド鎖が生成し、それらがアセンブルして、４－１ＢＢおよびＣＤ３ゼータ由来の細胞内シグナル伝達ドメインを有する膜に埋め込まれたＤＡＲが形成された。ＭＭＰ２／９で切断可能なリンカーと連結したＩｇガンマ－１ＣＨ３遮蔽性部分を有する遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲの予測された第１のポリペプチド鎖（表３５）は、配列番号５７のアミノ酸配列を含む。ＭＭＰ２／９で切断可能なリンカーと連結したＩｇガンマ－１　ＣＨ３遮蔽性部分を有する遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲの予測された第２のポリペプチド鎖は、配列番号５８のアミノ酸配列を含む。重鎖および軽鎖リーダー配列は太字で下線が引かれている。ＭＭＰ２／９で切断可能なリンカー配列はイタリック体で示され、灰色で強調表示されている。

【０５２３】

ｕＰＡで切断可能なリンカーを有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ：トランスジェニックＴ細胞

に、第１のポリペプチド鎖、自己切断性配列（例えば、Ｔ２Ａ）、および第２のポリペプチド鎖を含有し、配列番号５９のアミノ酸配列を含む抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ前駆体ポリペプチド鎖を発現させた（図２５を参照されたい）。Ｔ２Ａ配列により前駆体分子の切断が媒介されて、第１および第２のポリペプチド鎖が生成し、それらがアセンブルして、４－１ＢＢおよびＣＤ３ゼータ由来の細胞内シグナル伝達ドメインを有する膜に埋め込まれたＤＡＲが形成された。ｕＰＡで切断可能なリンカーと連結したＩｇガンマ－１　ＣＨ３遮蔽性部分を有する遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲの予測された第１のポリペプチド鎖（表３５）は、配列番号６０のアミノ酸配列を含む。ｕＰＡで切断可能なリンカーと連結したＩｇガンマ－１　ＣＨ３遮蔽性部分を有する遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲの予測された第２のポリペプチド鎖は、配列番号６１のアミノ酸配列を含む。重鎖および軽鎖リーダー配列は太字で下線が引かれている。ｕＰＡで切断可能なリンカー配列はイタリック体で示され、灰色で強調表示されている。

【０５２４】

切断不可能なリンカーを有する抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ：トランスジェニックＴ細胞に、第１のポリペプチド鎖、自己切断性配列（例えば、Ｔ２Ａ）、および第２のポリペプチド鎖を含有し、配列番号６２のアミノ酸配列を含む抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ前駆体ポリペプチド鎖を発現させた（図２６を参照されたい）。Ｔ２Ａ配列により前駆体分子の切断が媒介されて、第１および第２のポリペプチド鎖が生成し、それらがアセンブルして、４－１ＢＢおよびＣＤ３ゼータ由来の細胞内シグナル伝達ドメインを有する膜に埋め込まれたＤＡＲが形成された。切断不可能なリンカーと連結したＩｇガンマ－１　ＣＨ３遮蔽性部分を有する遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲの予測された第１のポリペプチド鎖（表３５）は、配列番号６３のアミノ酸配列を含む。切断不可能なリンカーと連結したＩｇガンマ－１　ＣＨ３遮蔽性部分を有する遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲの予測された第２のポリペプチド鎖は、配列番号６４のアミノ酸配列を含む。重鎖および軽鎖リーダー配列は太字で下線が引かれている。ｕＰＡで切断可能なリンカー配列はイタリック体で示され、灰色で強調表示されている。

【表３５】

表 35:

抗EGFR遮蔽されたDAR構築物	ペプチドリンカー配列　　：
[HC-CH3 MMP2/9, LC-CH3 MMP2/9]	LSLSPGKGGPLGVRGG 配列番号 32
[HC-CH3 uPA, LC-CH3 uPA]	GLSGRSDNHG 配列番号 52
[HC-CH3 NC, LC-CH3 NC]	LSLSPGKGGSGGGSGG 配列番号 34

【０５２５】

（実施例１８）

活性化可能な遮蔽された抗体を有する抗ＥＧＦＲ二量体抗原受容体（ＤＡＲ）の特徴付け。

上記の実施例１７に記載の遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲを、３００ＩＵ／ｍＬのＩ－２を伴うＴ細胞増大ＳＦＭ培地中で培養した。培地を２～３日ごとに交換した。自社のＡｌｅｘａ－４８８とコンジュゲートしたＥＧＦＲ－ｈｉｓを調製した。およそ５０，０００個のＤＡＲ－Ｔ細胞または遮蔽されたＤＡＲ－Ｔ細胞を１回洗浄し、結合緩衝剤５０μＬに再懸濁させ、１：２００のＡＰＣ抗ヒトカッパおよび１：１００のＥＧＦＲ－Ａｌｅｘａ－４８８を添加し、氷上で３０分間インキュベートした。細胞をＰＢＳプラス２％Ｆ

ＢＳで１回すすいだ。細胞を、ＩＱｕｅＳｃｒｅｅｎｅｒを使用したフローサイトメトリーによってアッセイした。図１９に結果を示す。

【０５２６】

（実施例１９）

ＥＧＦＲを発現する腫瘍細胞株に対する細胞傷害性の活性化可能な遮蔽された抗体を有する抗ＥＧＦＲ二量体抗原受容体（ＤＡＲ）。

ｘＣＥＬＬｉｇｅｎｃｅ機器を使用したリアルタイム細胞傷害性アッセイ（ＲｅａｌＴｉｍｅ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ　Ａｓｓａｙ）（ＲＴＣＡ）で細胞傷害性アッセイを行った。細胞株化したＡ５４９を標的細胞株として使用した。Ａ５４９は、高レベルのＥＧＦＲを発現する非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）腫瘍細胞株である。Ｅ－プレートにウェル当たり１０，０００個のＡ５４９細胞を播種し、２４時間インキュベートした。対照抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ　Ｔ細胞および遮蔽された抗ＥＧＦＲ　ＤＡＲ　Ｔ細胞をエフェクター対標的比５：１または２０：１で添加した。細胞指数値を速度論的に最大７２時間にわたってモニタリングした。このモニタリングにより、細胞生存率が示される。陰性対照として、エフェクターなし（Ａ５４９細胞単独）および活性化Ｔ細胞を含めた。正規化された細胞指数はエフェクター細胞を添加した時点のものである（図２０Ａおよび２１Ａを参照されたい）。Ｅ：Ｔ比５：１および２０：１での結果をそれぞれ図２０Ａおよび２１Ａに示す。

【０５２７】

（実施例２０）

活性化可能な遮蔽された抗体を有する抗ＥＧＦＲ二量体抗原受容体（ＤＡＲ）のサイトカイン放出アッセイ

上記の実施例１９に記載の細胞傷害性アッセイからの上清を取っておき、それを使用して、サイトカイン放出アッセイを行った。ＩＦＮ－ガンマＨＴＦＲアッセイキットを使用した。試料およびＩＦＮ標準物質を希釈緩衝剤で１：３に希釈した。試料またはＩＦＮ－ガンマ標準物質１６μＬを９６Ｗの小体積、白色プレートに添加し、混合したドナー抗体とアクセプター抗体４μＬを添加した。プレートを密閉し、室温で少なくとも２時間インキュベートし、次いで、プレートを、ＨＴＲＦをＴＥＣＡＮの設定で使用して読み取った。ＩＦＮ－ガンマの量を標準曲線に基づいて算出した。結果を図２２Ａおよび２２Ｂに示す。

【図面】

【図１】

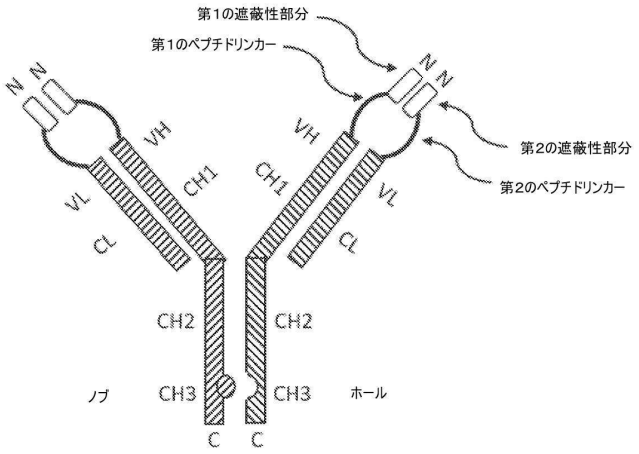


FIG. 1

【図２】

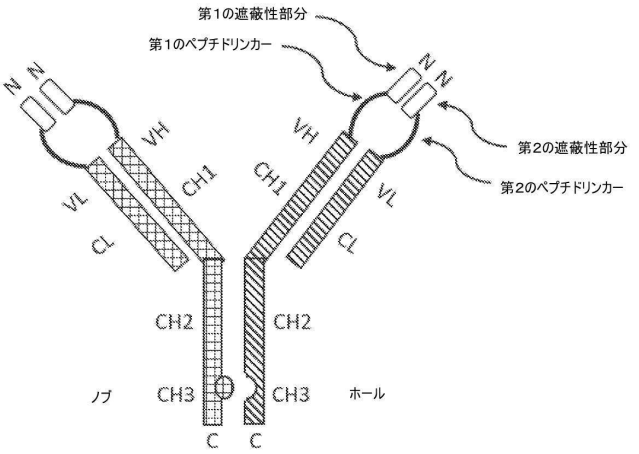


FIG. 2

【図３Ａ】

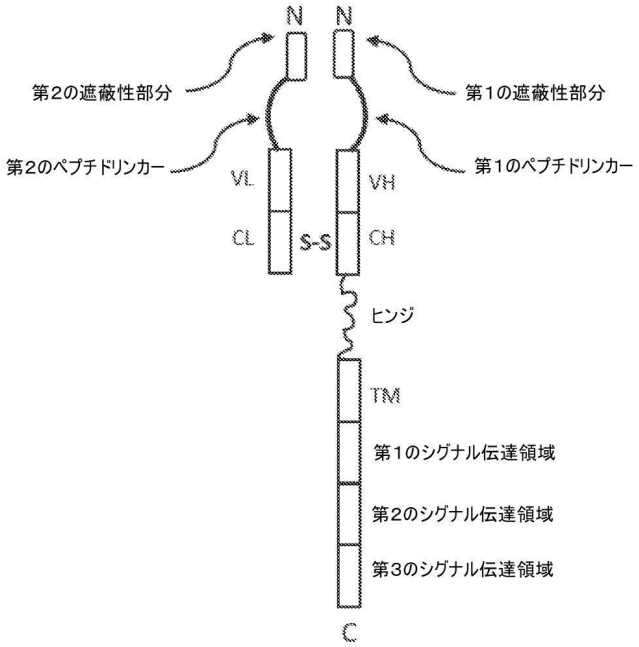


FIG. 3A

【図３Ｂ】

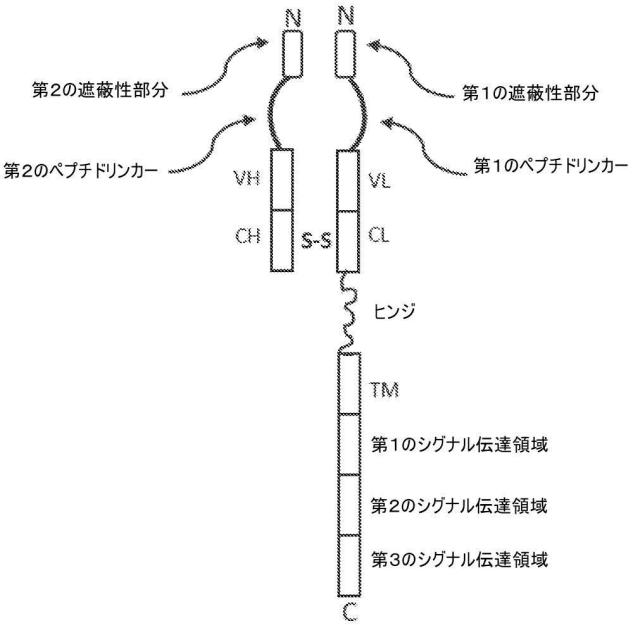


FIG. 3B

【図４－１】

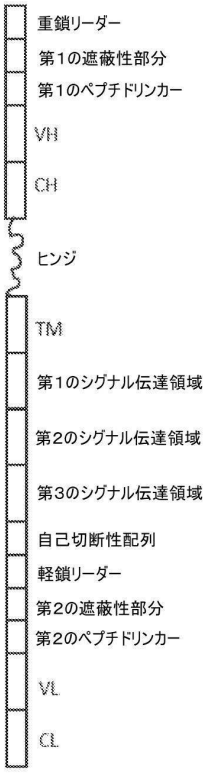


FIG. 4A



FIG. 4B

【図４－２】

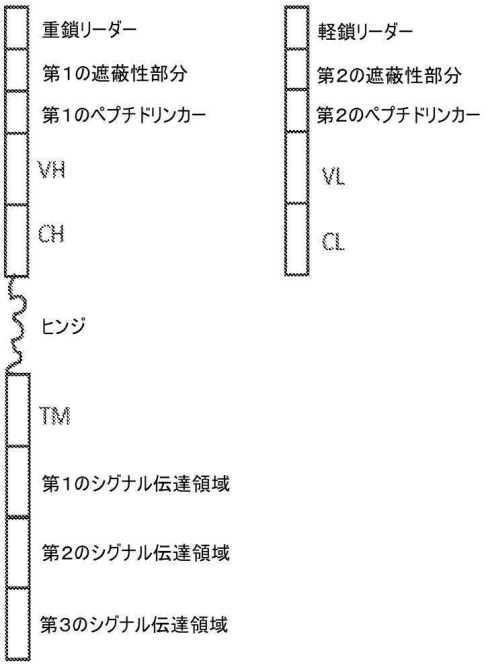


FIG. 4C

【図４－３】

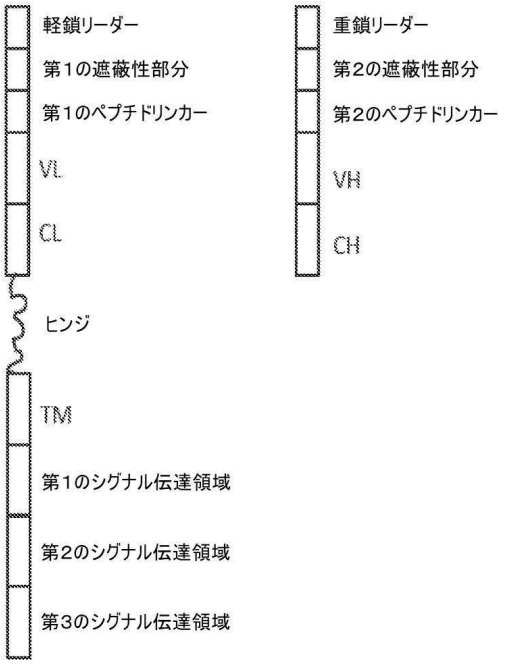


FIG. 4D

【図５】

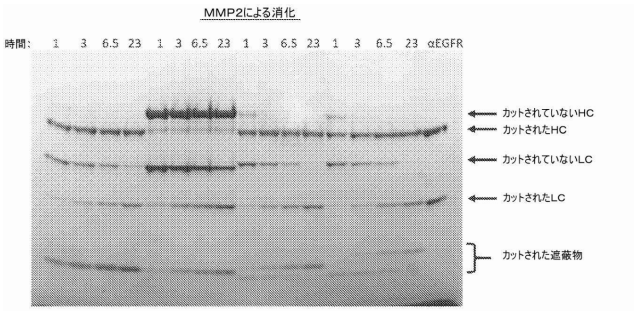


FIG. 5A

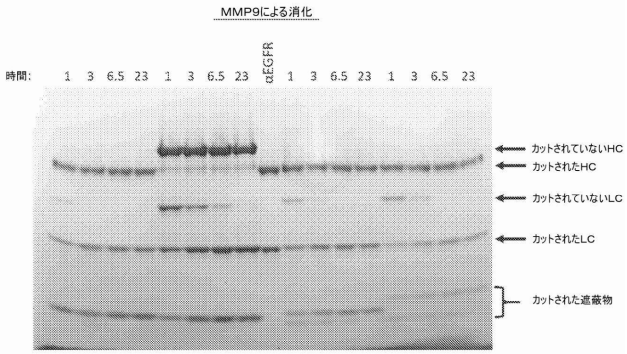


FIG. 5B

【図６－１】

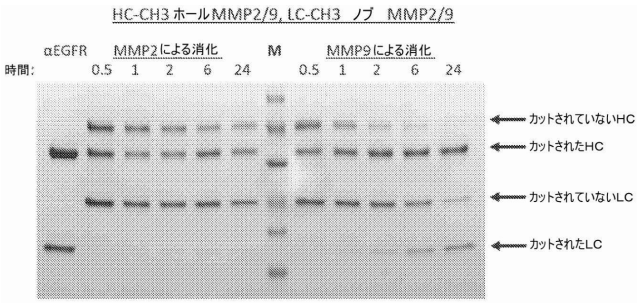


FIG. 6A

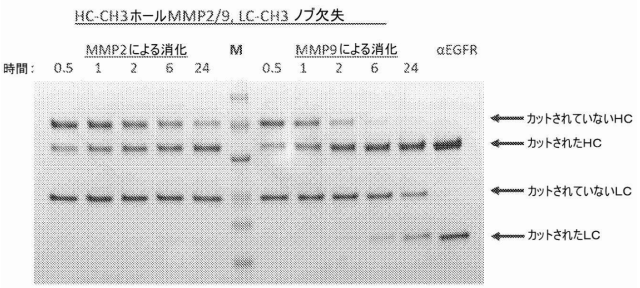


FIG. 6B

【図６－２】

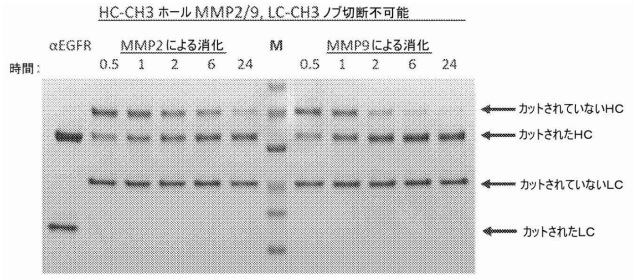


FIG. 6C

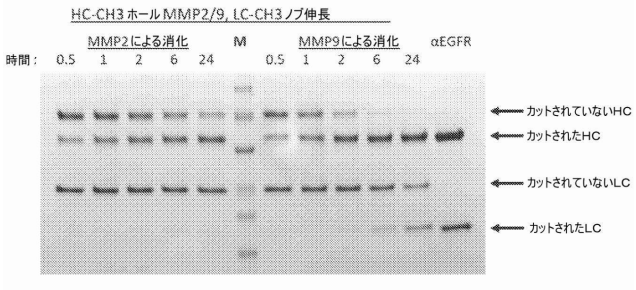


FIG. 6D

【図６－３】

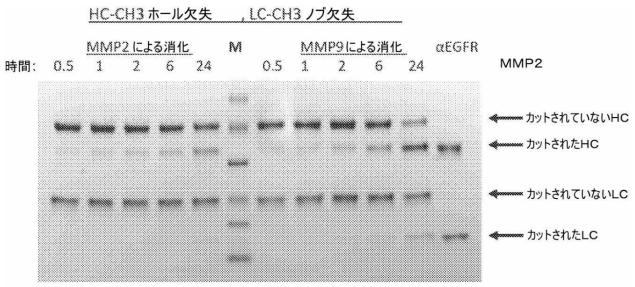


FIG. 6E

【図７－１】

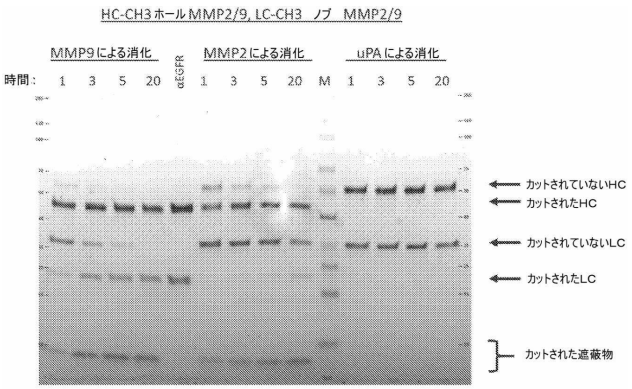


FIG. 7A

【図７－２】

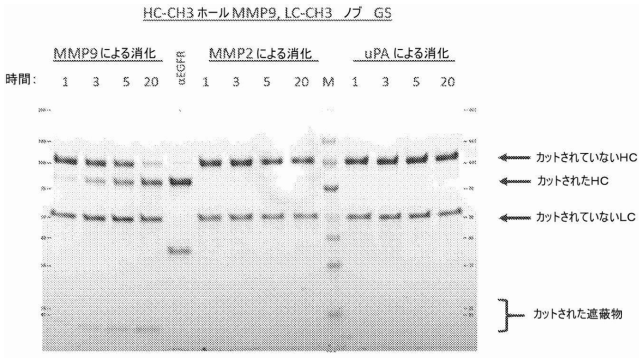


FIG. 7B

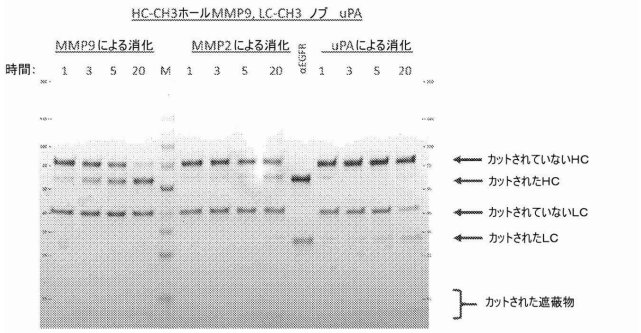


FIG. 7C

【図８－１】

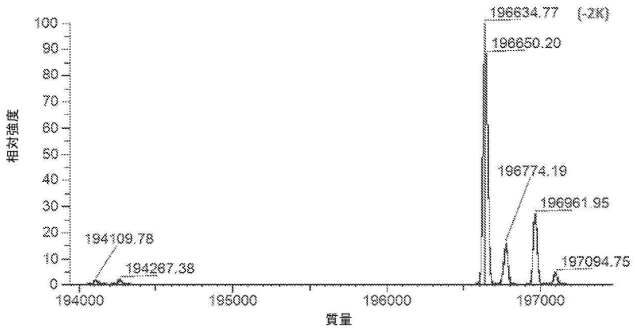


FIG. 8A

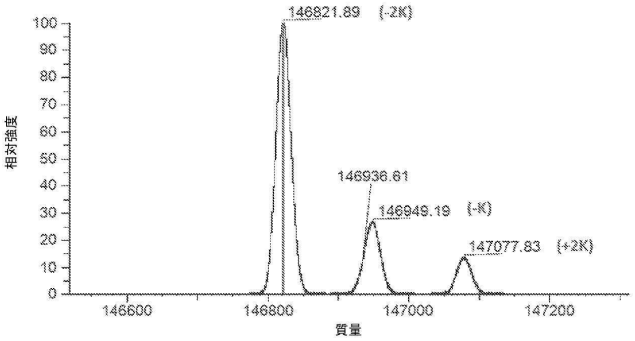


FIG. 8B

【図８－２】

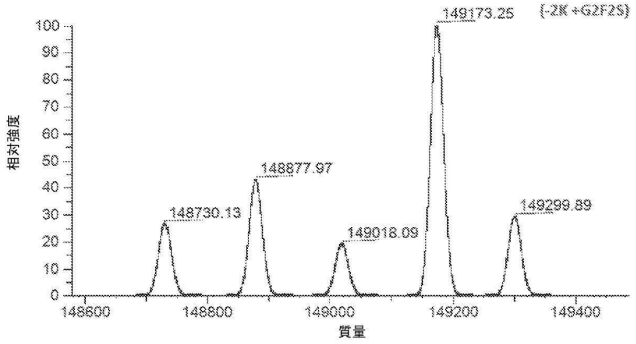


FIG. 8C

【図９－１】

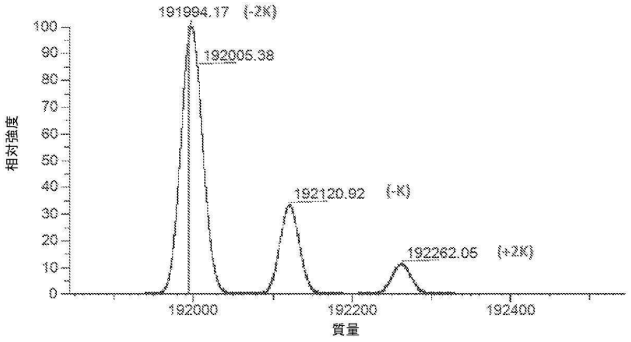


FIG. 9A

【図９－２】

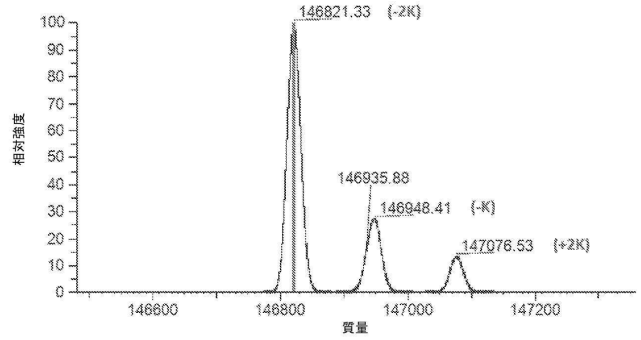


FIG. 9B

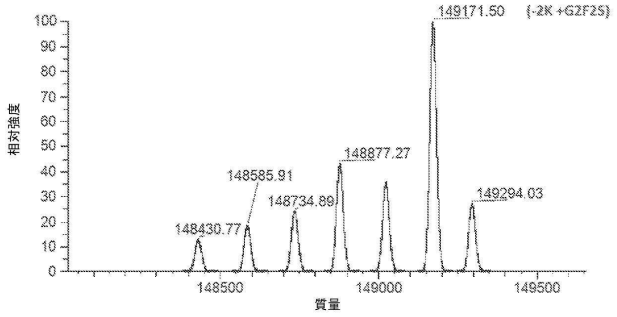


FIG. 9C

【図１０Ａ】

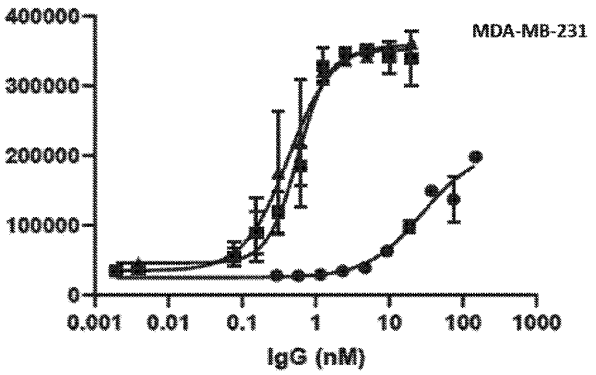


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

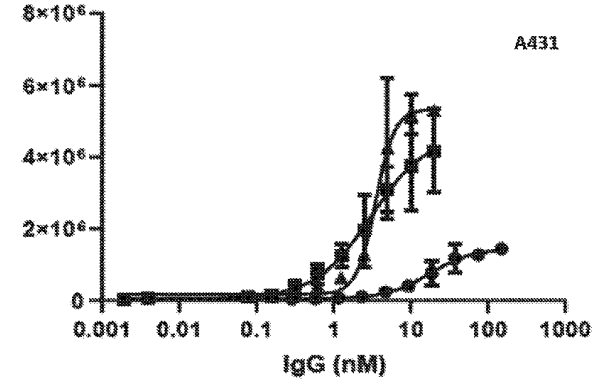


FIG. 10B

【図１０Ｃ】

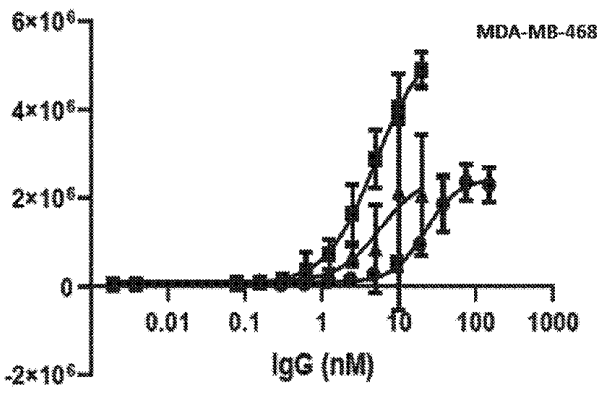


FIG. 10C

【図１１－１】

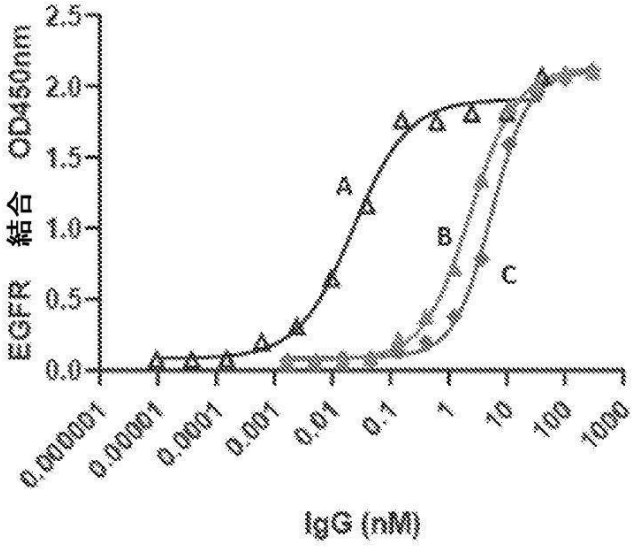


FIG. 11A

【図１１－２】

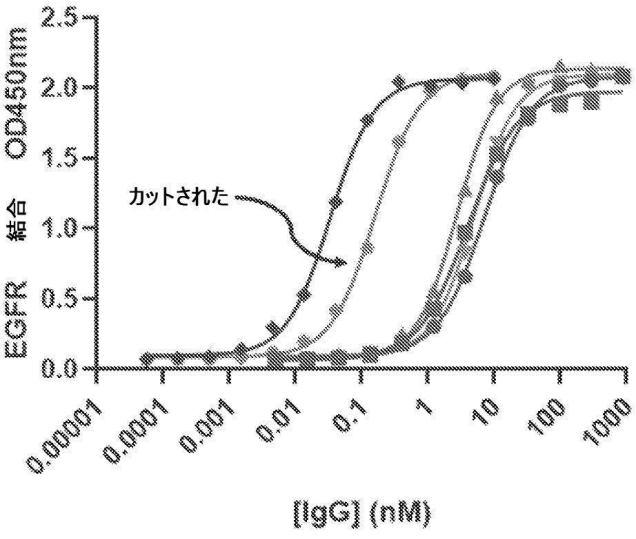


FIG. 11B

【図１１－３】

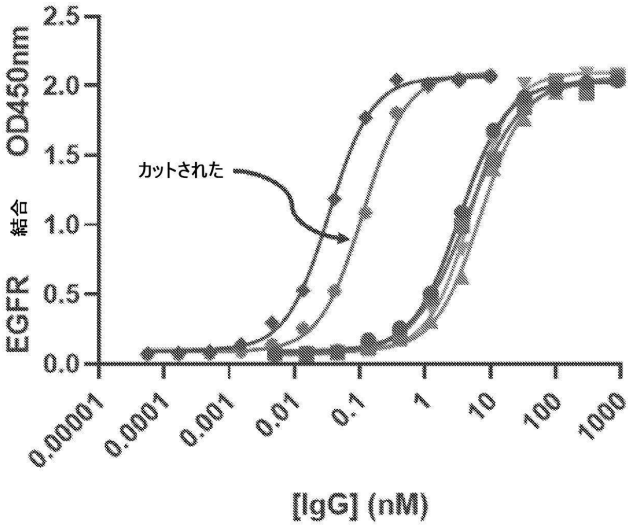


FIG. 11C

【図１１－４】

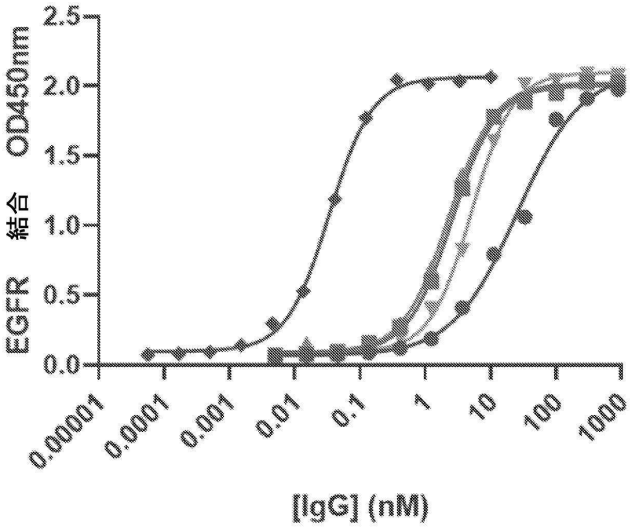


FIG. 11D

【図１１－５】

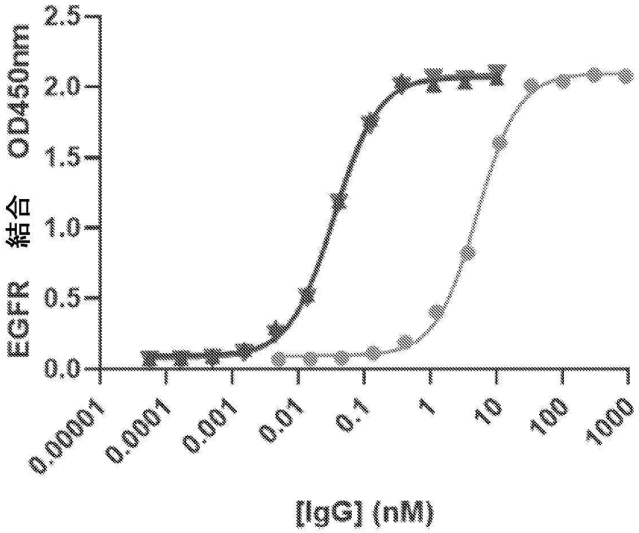


FIG. 11E

【図１１－６】

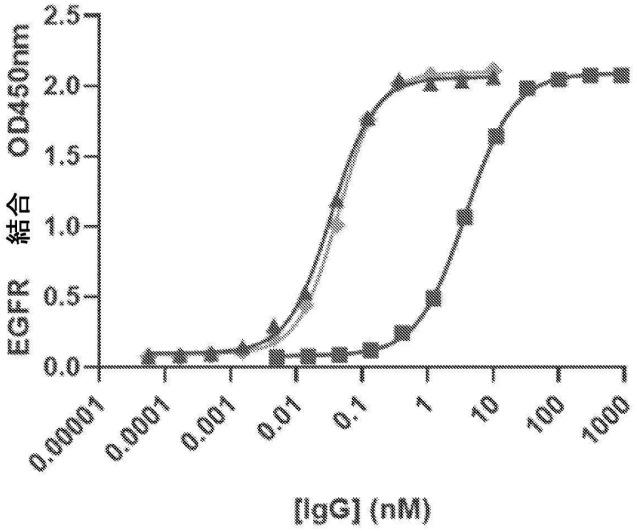


FIG. 11F

【図１１－７】

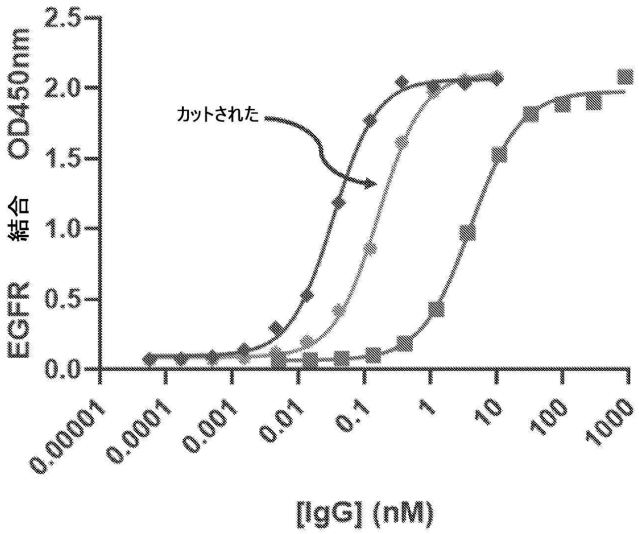


FIG. 11G

【図１１－８】

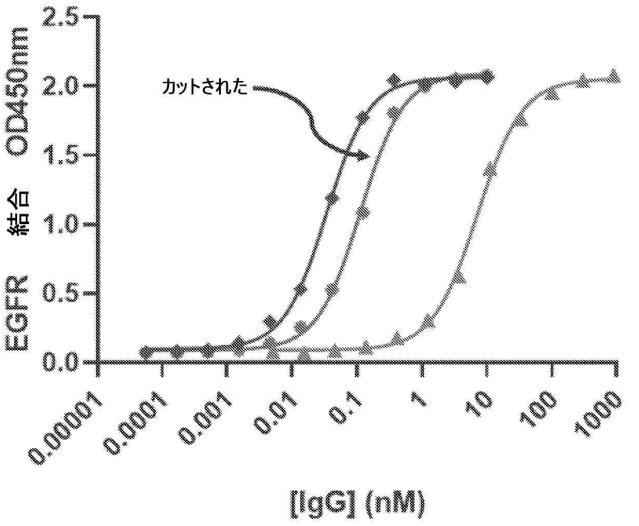


FIG. 11H

【図１２－１】

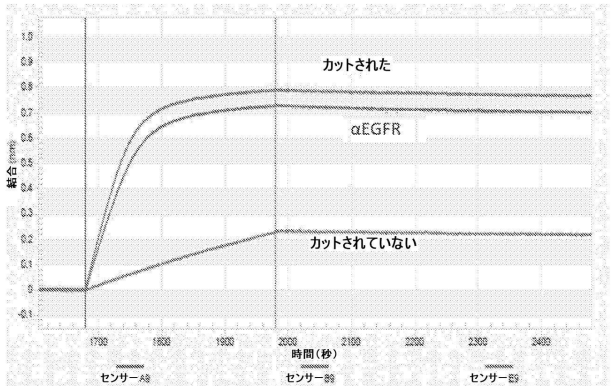


FIG. 12A

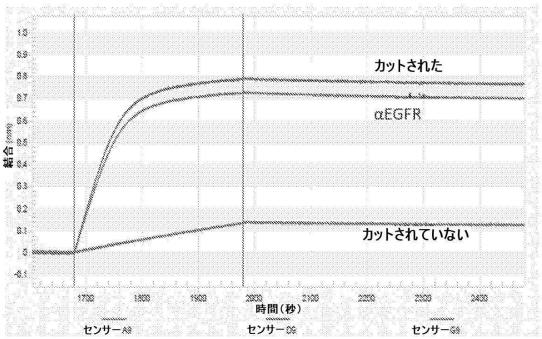


FIG. 12B

【図１２－２】

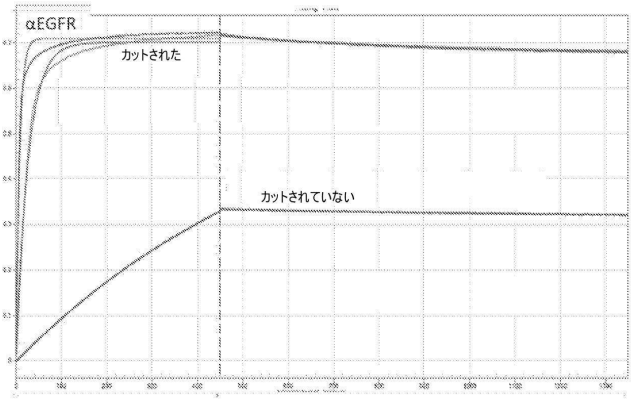


FIG. 12C

【図１３－１】

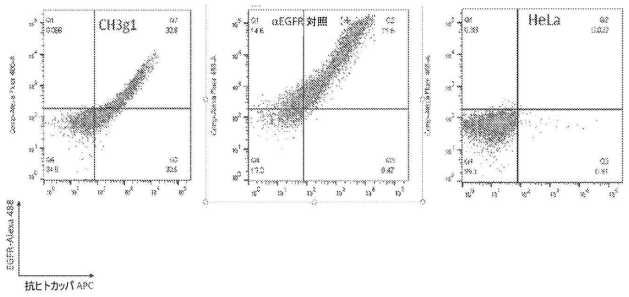


FIG. 13A

【図１３－２】

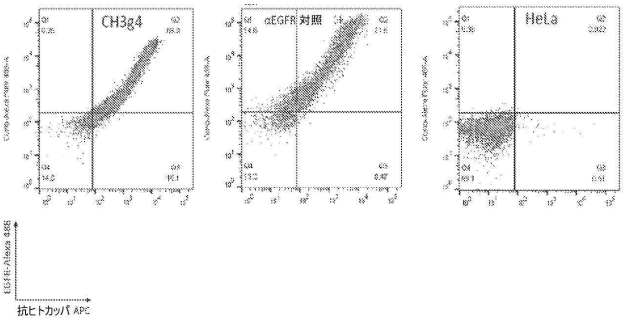


FIG. 13B

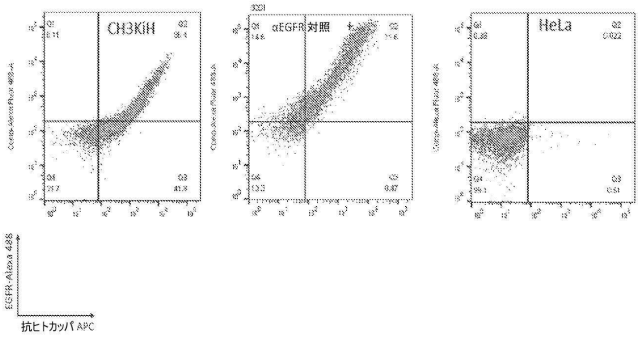


FIG. 13C

【図１３－３】

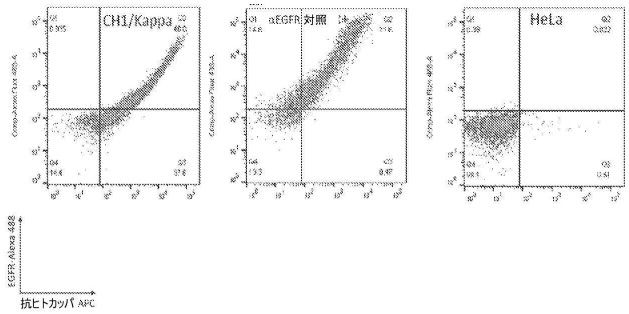


FIG. 13D

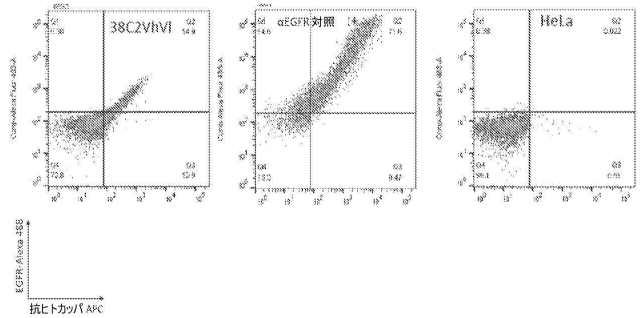


FIG. 13E

【図１４】

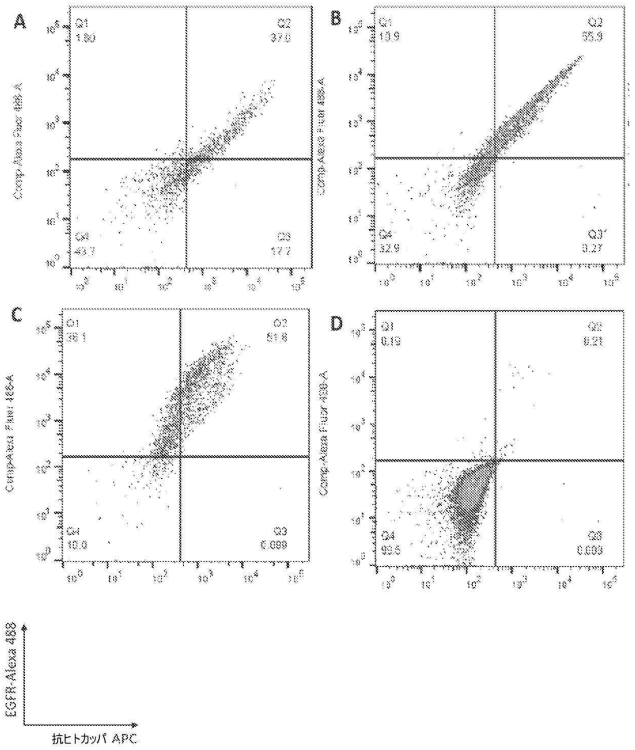


FIG. 14

【図１５－１】

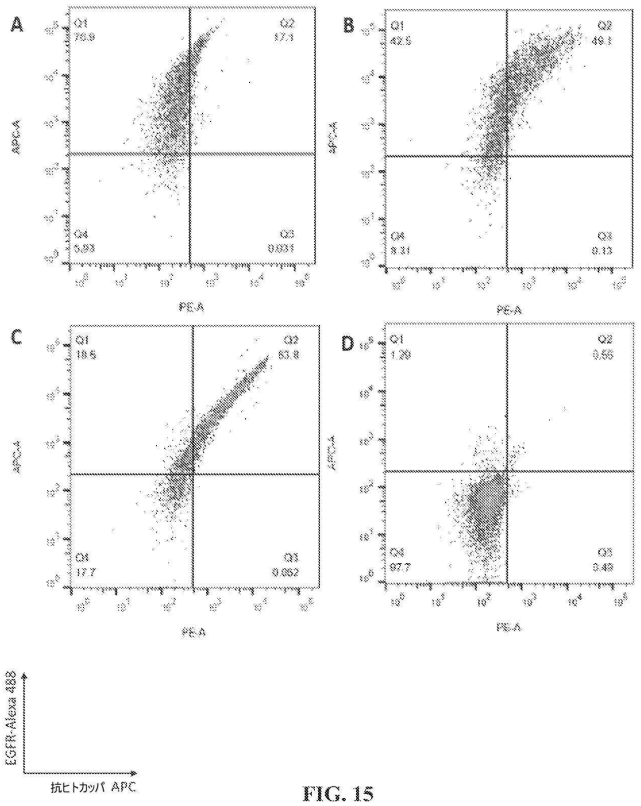


FIG. 15

【図１５－２】

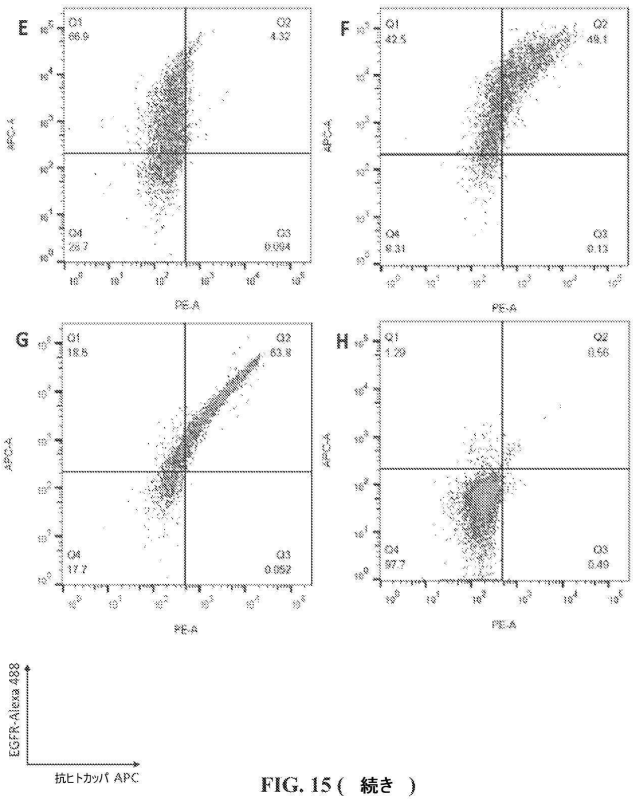


FIG. 15 (続き)

【図１６－１】

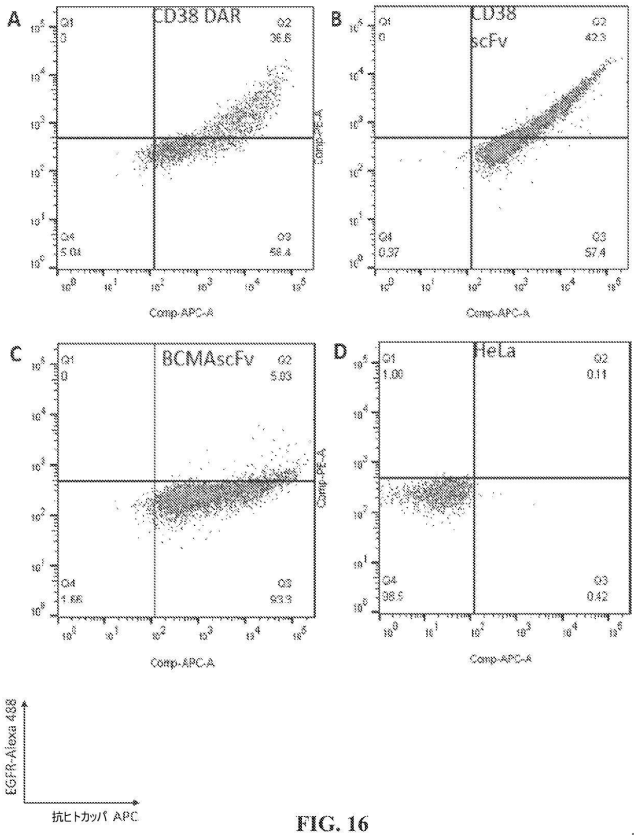


FIG. 16

【図１６－２】

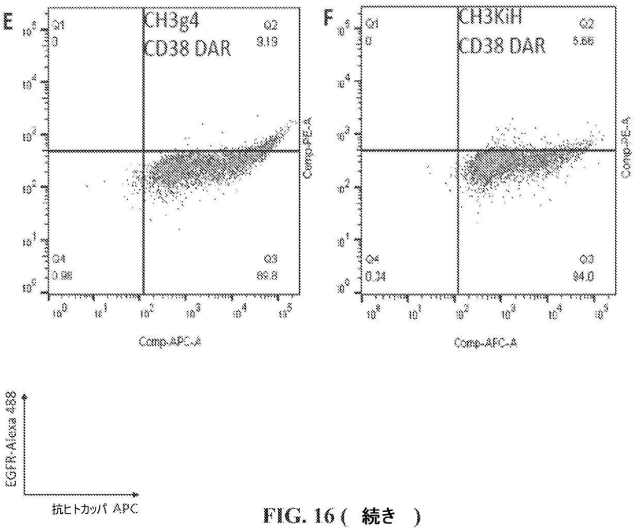


FIG. 16 (続き)

【図１７】

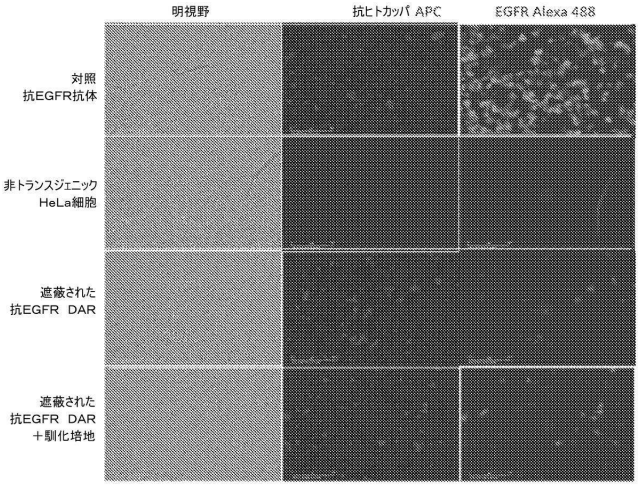
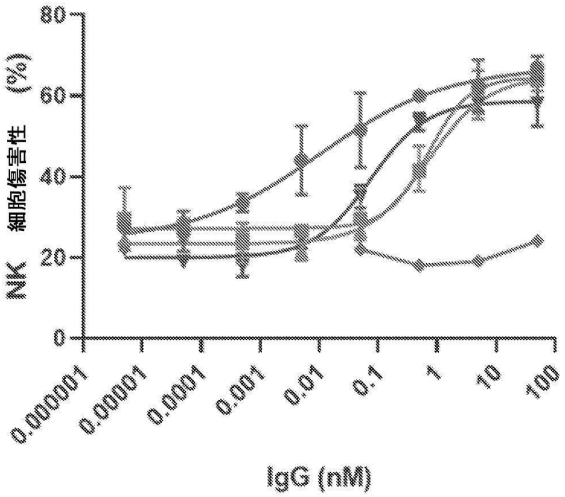


FIG. 17

【図１８】



遮蔽性部分がない対照抗EGFR抗体

[HC-CH3 ホール MMP2/9, LC-CH3 ノブ MMP2/9]

[HC-CH3 ホール欠失 , LC-CH3 ノブ欠失]

[HC-CH1 MMP2/9, LC-CL ラムダ MMP2/9]

抗体を有さないH292細胞

FIG. 18

【図１９】

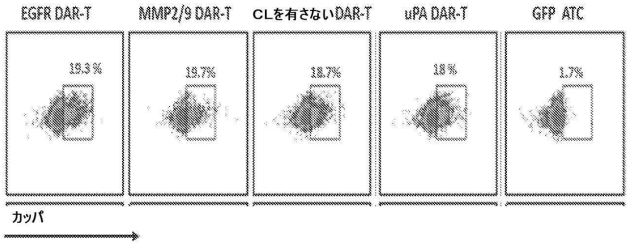


FIG. 19

【図２０Ａ】

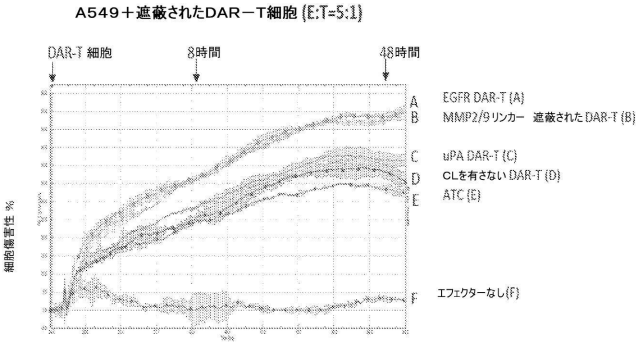


FIG. 20A

【図２０Ｂ】

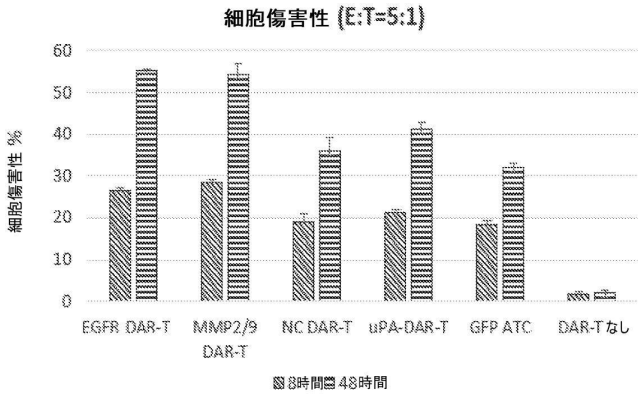


FIG. 20B

【図２１Ａ】

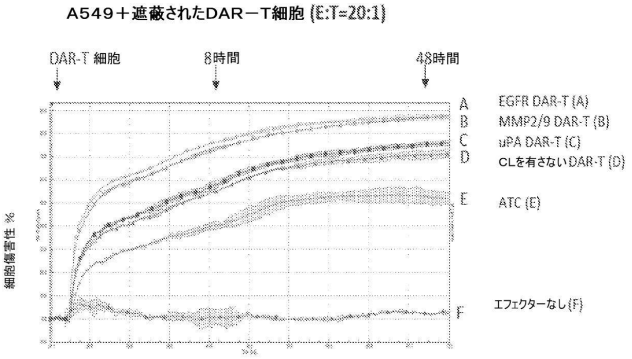


FIG. 21A

【図２１Ｂ】

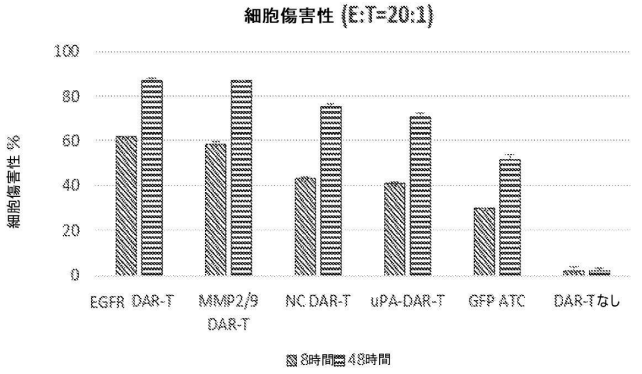


FIG. 21B

【図２２Ａ】

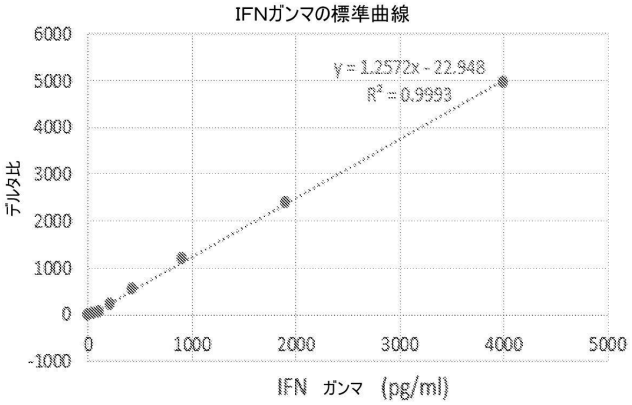


FIG. 22A

【図２２Ｂ】

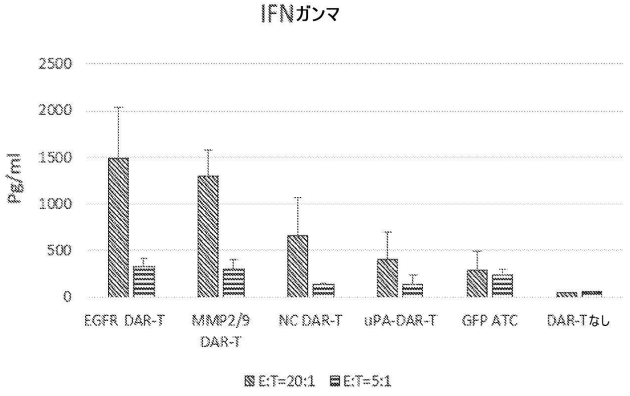


FIG. 22B

【図２３】

4－1BB＋CD3ゼータ細胞内領域を有し、切断可能なリンカーを有さず、遮蔽性部分も有さない、抗EGFR DAR

前駆体ポリペプチド：配列番号53

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI
WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAAS
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLF
PGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEE
GGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMS
VPTQVLGLLLLWLTDARCDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYAS
ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

第1のポリペプチド鎖：配列番号54

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN
KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN
TKVDKRVEPKSCDKTHTKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLAC
YSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQ
QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

第2のポリペプチド鎖：配列番号55

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD
FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC

FIG. 23

【図２４】

4－1BB＋CD3ゼータ細胞内領域を有し、MMP2／9切断可能なリンカーおよびCH3遮蔽性部分を有する、抗EGFR DAR

前駆体ポリペプチド：配列番号56

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGPLGVRGGQVQLK
QSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSK
SQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLV
TVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQ
LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMSVPTQVLGLLLLWLTDARCGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGPLGVRGGDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIG
TNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGA
GTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

第1のポリペプチド鎖：配列番号57

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGPLGVRGGQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTV
SGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYY
CARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTKIEVMYP
PPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

第2のポリペプチド鎖：配列番号58

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGPLGVRGGDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCR
ASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNW
PTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 24

【図２５】

4－1BB＋CD3ゼータ細胞内領域を有し、uPA切断可能なリンカーおよびCH3遮蔽性部分を有する、抗EGFR DAR

前駆体ポリペプチド：配列番号59

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGLSGRSDNHGQVQL
KQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNS
KSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KRVEPKSCDKTHTKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLL
VTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMSVPTQVLGLLLLWLTDARCGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGLSGRSDNHGDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQS
IGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF
GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

第1のポリペプチド鎖：配列番号60

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGLSGRSDNHGQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCT
VSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIY
YCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTKIEVMY
PPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLY
IFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRPGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR

第2のポリペプチド鎖：配列番号61

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGLSGRSDNHGDILLTQSPVILSVSPGERVSFSC
RASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN
WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 25

【図２６】

4－1BB＋CD3ゼータ細胞内領域を有し、切断不可能なリンカーおよびCH3遮蔽性部分を有する、
抗EGFR DAR

前駆体ポリペプチド：配列番号62

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGQFREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGSGGSGQVQLK
QSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVPQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSK
SQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLV
TVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQ
LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGEGRGSLLTCGDVEENPGPMSVPTQVLGLLLLWLTDARCGQFREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGSGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIG
TNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGA
GTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

第1のポリペプチド鎖：配列番号63

GQFREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGSGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTV
SGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYY
CARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTKIEVMYP
PPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYI
FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELKVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR

第2のポリペプチド鎖：配列番号64

GQFREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGSGGSGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCR
ASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNW
PTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 26

【配列表】

2023515573000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/019331

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-56

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/019331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61K39/00 C07K16/46
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/108733 A2 (SEATTLE GENETICS INC [US]) 6 June 2019 (2019-06-06) paragraphs [0276], [0293]; claim 59 -----	1-7, 10-15, 18-52, 54-56
X	WO 2018/213335 A1 (SCALMIBIO INC [US]) 22 November 2018 (2018-11-22) claims 29, 60; figure 1A -----	1-7, 10-15, 18-52, 54-56

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 June 2021	18/08/2021

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Covone-van Hees, M

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/019331

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WONG KENNETH R ET AL: "In vivoimaging of protease activity by Probody therapeutic activation", BIOCHIMIE, MASSON, PARIS, FR, vol. 122, 4 November 2015 (2015-11-04), pages 62-67, XP029410763, ISSN: 0300-9084, DOI: 10.1016/J.BIOCHI.2015.11.003 figure 1	53
A	WO 2019/113385 A1 (JANUX THERAPEUTICS INC [US]) 13 June 2019 (2019-06-13) paragraph [0142]; figure 1	1-56

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2021/019331

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019108733 A2	06-06-2019	AR 113862 A1	17-06-2020
		AU 2018375375 A1	28-05-2020
		BR 112020009805 A2	13-10-2020
		CA 3083946 A1	06-06-2019
		CN 111448213 A	24-07-2020
		EA 202091339 A1	21-10-2020
		EP 3717515 A2	07-10-2020
		JP 2021503927 A	15-02-2021
		KR 20200091901 A	31-07-2020
		SG 11202004864T A	29-06-2020
		TW 201925227 A	01-07-2019
		US 2019185561 A1	20-06-2019
		WO 2019108733 A2	06-06-2019
WO 2018213335 A1	22-11-2018	EP 3625253 A1	25-03-2020
		US 2020062851 A1	27-02-2020
		WO 2018213335 A1	22-11-2018
WO 2019113385 A1	13-06-2019	US 2020385440 A1	10-12-2020
		US 2021115106 A1	22-04-2021
		WO 2019113385 A1	13-06-2019
		WO 2019113386 A1	13-06-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

International Application No. PCT/US2021/019331

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-56

An activatable masked antigen binding protein having an IgG type antibody structure, comprising:a) a first antigen binding domain which comprises a first heavy chain variable region and a first light chain variable region andb) a second antigen binding domain which comprises a second heavy chain variable region and a second light chain variable region, wherein(i) the N-terminal end of the first heavy chain variable region is joined to a first masking moiety via a first peptide linker having a first cleavable site,(ii) the N-terminal end of the first light chain variable region is joined to a second masking moiety via a second peptide linker having a second cleavable site,(iii) the first and second masking moieties do not specifically bind the first antigen binding domain,(iv) the first cleavable site is cleavable with a first protease, and(v) the second cleavable site is cleavable with a second protease, and wherein(vi) the N-terminal end of the second heavy chain variable region is joined to a third masking moiety via a third peptide linker having a third cleavable site,(vii) the N-terminal end of the second light chain variable region is joined to a fourth masking moiety via a fourth peptide linker having a fourth cleavable site,(viii) the third and fourth masking moieties do not specifically bind the second antigen binding domain,(ix) the third cleavable site is cleavable with a third protease, and(x) the fourth cleavable site is cleavable with a fourth protease, wherein the first, second, third and fourth cleavable sites are cleavable with the same protease or different proteases. Furthermore vectors, host cells and methods of producing the aforementioned antibody.

---

2. claims: 57-95

An activatable masked antigen binding protein having a dimeric antigen receptor (DAR) structure, comprising a first and second polypeptide chain, wherein the a) first polypeptide chain comprises: (i) a first masking moiety, (ii) a first peptide linker, (iii) an antibody heavy chain variable region (VH), (iv) an antibody heavy chain constant region (CH), (v) an optional hinge region, (vi) a transmembrane region (TM), and (vii) an intracellular signaling region, and wherein the b) second polypeptide chain comprises: (i) a second masking moiety, (ii) a second peptide linker, (iii) an antibody light chain variable region (VL) (e.g., kappa or lambda), and (iv) an antibody light chain constant region (CL),wherein the antibody heavy chain variable region (VH) and the antibody light chain variable region (VL) form an antigen binding domain that binds a target antigen.

International Application No. PCT/US2021/019331

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/46	*(2006.01)*	C07K	16/46		4H045
C07K 19/00	*(2006.01)*	C07K	19/00		
C12P 21/08	*(2006.01)*	C12P	21/08		
C12N 1/15	*(2006.01)*	C12N	1/15		
C12N 1/19	*(2006.01)*	C12N	1/19		
C12N 1/21	*(2006.01)*	C12N	1/21		
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N	5/10		
C12Q 1/37	*(2006.01)*	C12Q	1/37		
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61K	39/395	T	
A61P 35/02	*(2006.01)*	A61K	39/395	Y	
A61K 47/68	*(2017.01)*	A61P	35/00		
G01N 33/53	*(2006.01)*	A61P	35/02		
G01N 33/574	*(2006.01)*	A61K	47/68		
C07K 16/30	*(2006.01)*	G01N	33/53	D	
		G01N	33/574	A	
		C07K	16/30		

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

アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１２１， サンディエゴ， ディレクターズ プレイス ４９５５， ソレント セラピューティクス， インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 パイ， チン－イ

アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２１２１， サンディエゴ， ディレクターズ プレイス ４９５５， ソレント セラピューティクス， インコーポレイテッド 気付

Fターム（参考） 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ36 QR48 QS33 QX01
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA14 DA20
4B065 AA91X AB01 AC14 BA01 CA25 CA44 CA46
4C076 AA95 CC27 EE41 EE59
4C085 AA14 AA16 AA19 AA27 BB01 BB36 CC23 DD62
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 EA28 EA50 FA74