(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2021-512122
(P2021-512122A)
(43)公表日　令和3年5月13日(2021.5.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C40B 40/08	(2006.01)	C40B	40/08	ZNA	2G045
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B064
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4B065
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4C076
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 112 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-541957 (P2020-541957)
(86)(22)出願日　平成31年2月2日 (2019.2.2)
(85)翻訳文提出日　令和2年9月30日 (2020.9.30)
(86)国際出願番号　PCT/CN2019/074581
(87)国際公開番号　WO2019/149282
(87)国際公開日　令和1年8月8日 (2019.8.8)
(31)優先権主張番号　PCT/CN2018/075065
(32)優先日　平成30年2月2日 (2018.2.2)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国 (CN)

(71)出願人　520053809
アダジーン　インコーポレイテッド
英国領ケイマン諸島　グランド　ケイマン　ケーワイ１－１１０３，　サウス　チャーチ　ストリート　１０３，　ハーバープレイス，　ピー．オー．ボックス　２５８２
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人

最終頁に続く

(54)【発明の名称】活性化可能抗体ならびにその作製及び使用方法

(57)【要約】
活性化可能結合ポリペプチドをコードする合成ポリヌクレオチドを含有するライブラリーが、本明細書に提供される。活性化可能結合ポリペプチド及びこのような活性化可能結合ポリペプチドを含有するポリペプチドライブラリーが、本明細書にさらに提供される。ベクター、ベクターライブラリー、細胞、キット、及び活性化可能ポリペプチドライブラリーを作製及び使用する方法も、本明細書に提供される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ポリヌクレオチドを含むライブラリーであって、前記ポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドをコードし、
前記ＦＰが、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍが２～１０であり、ｎが３～１０であり、ｏが１～１０であり、各Ｘが独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、
前記ＣＭが、少なくとも第１の切断部位を含み、
前記ＴＢＭが、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む、前記ライブラリー。
【請求項２】
前記ライブラリー中の前記ポリヌクレオチドが、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、または少なくとも１０個の固有のポリペプチドをコードし、各固有のポリペプチドが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含み、
前記ＦＰが、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍが２～１０であり、ｎが３～１０であり、ｏが１～１０であり、各Ｘが独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、
前記ＣＭが、少なくとも第１の切断部位を含み、
前記ＴＢＭが、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む、請求項１に記載のライブラリー。
【請求項３】
前記ライブラリー中の前記ポリヌクレオチドのそれぞれが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドをコードし、
前記ＦＰが、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍが２～１０であり、ｎが３～１０であり、ｏが１～１０であり、各Ｘが独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、
前記ＣＭが、少なくとも第１の切断部位を含み、
前記ＴＢＭが、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む、請求項１または請求項２に記載のライブラリー。
【請求項４】
前記ＦＰが、式（ＸＩＶ）：$(NNK)_mTGY(NNK)_nTGY(NNK)_o$（配列番号８７）に従う核酸配列を含むポリヌクレオチド配列によってコードされ、式中、各Ｎが独立して、Ａ、Ｇ、Ｔ、またはＣであり、各Ｋが独立して、ＴまたはＧであり、各Ｙが独立して、ＴまたはＣである、請求項１～３のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項５】
各Ｘが、Ｍ、Ｗ、またはＣではない、請求項１～４のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項６】
式（ＸＩＩＩ）のX_mにおける各Ｘが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項１～５のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項７】
式（ＸＩＩＩ）のX_nにおける各Ｘが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項１～６のいずれか一

項に記載のライブラリー。
【請求項８】
式（ＸＩＩＩ）のＸ$_o$における各Ｘが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項１～７のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項９】
ｍが２または３～６である、請求項１～８のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項１０】
ｎが６～８である、請求項１～９のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項１１】
ｎが６である、請求項１～９のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項１２】
ｏが１～２である、請求項１～１１のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項１３】
ｏが２である、請求項１～１１のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項１４】
前記ＦＰが、そのＮ末端に追加のアミノ酸配列をさらに含む、請求項１～１３のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項１５】
前記追加のアミノ酸配列が、配列番号１６のアミノ酸配列を含む、請求項１４に記載のライブラリー。
【請求項１６】
前記第１の切断部位が、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ－１（ＭＭＰ－１）、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、第Ｘ因子、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥからなる群から選択されるプロテアーゼのプロテアーゼ切断部位である、請求項１～１５のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項１７】
前記ＣＭが、前記第１の切断部位のＣ末端に第１のリンカー（Ｌ$_1$）をさらに含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項１８】
前記Ｌ$_1$が、配列番号１７～２４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１７に記載のライブラリー。
【請求項１９】
前記ＣＭが、第２の切断部位をさらに含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項２０】
前記第２の切断部位が、前記Ｌ$_1$のＣ末端にある、請求項１９に記載のライブラリー。
【請求項２１】
前記第２の切断部位が、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ－１（ＭＭＰ－１）、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、第Ｘ因子、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７

、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥからなる群から選択されるプロテアーゼのプロテアーゼ切断部位である、請求項１９または請求項２０に記載のライブラリー。

【請求項２２】

前記第１及び第２の切断部位が異なる、請求項１９～２１のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項２３】

前記ＣＭが、前記第２の切断部位のＣ末端に第２のリンカー（$Ｌ_{2}$）をさらに含む、請求項１９～２２のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項２４】

前記$Ｌ_{2}$が、配列番号１７～２４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項２３に記載のライブラリー。

【請求項２５】

前記ポリペプチドが、式（ＩＩＩ）：ＥＶＧＳＹ$X_{1}$$X_{2}$$X_{3}$$X_{4}$$X_{5}$$X_{6}$Ｃ$X_{7}$$X_{8}$$X_{9}$$X_{10}$$X_{11}$$X_{12}$Ｃ$X_{13}$$X_{14}$ＳＧＲＳＡＧＧＧＧＴＥＮＬＹＦＱＧＳＧＧＳ（配列番号３）に従うアミノ酸配列を含み、式中、X_{1}が、Ａ、Ｄ、Ｉ、Ｎ、Ｐ、またはＹであり、X_{2}が、Ａ、Ｆ、Ｎ、Ｓ、またはＶであり、X_{3}が、Ａ、Ｈ、Ｌ、Ｐ、Ｓ、Ｖ、またはＹであり、X_{4}が、Ａ、Ｈ、Ｓ、またはＹであり、X_{5}が、Ａ、Ｄ、Ｐ、Ｓ、Ｖ、またはＹであり、X_{6}が、Ａ、Ｄ、Ｌ、Ｓ、またはＹであり、X_{7}が、Ｄ、Ｐ、またはＶであり、X_{8}が、Ａ、Ｄ、Ｈ、Ｐ、Ｓ、またはＴであり、X_{9}が、Ａ、Ｄ、Ｆ、Ｈ、Ｐ、またはＹであり、X_{10}が、Ｌ、Ｐ、またはＹであり、X_{11}が、Ｆ、Ｐ、またはＹであり、X_{12}が、Ａ、Ｐ、Ｓ、またはＹであり、X_{13}が、Ａ、Ｄ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、またはＹであり、X_{14}が、Ａ、Ｓ、またはＹである、請求項１～２４のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項２６】

前記ライブラリー中の前記ポリヌクレオチドのそれぞれが、式（ＩＩＩ）に従うアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする、請求項２５に記載のライブラリー。

【請求項２７】

前記ポリペプチドが、配列番号２５～４６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１～２６のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項２８】

前記ＴＢＭが、抗体軽鎖可変領域を含む、請求項１～２７のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項２９】

前記ポリペプチドが、前記軽鎖可変領域のＣ末端に重鎖可変領域をさらに含む、請求項２８に記載のライブラリー。

【請求項３０】

１つ以上の抗体重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項２８に記載のライブラリー。

【請求項３１】

前記ＴＢＭが、抗体重鎖可変領域を含む、請求項１～２７のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項３２】

前記ポリペプチドが、前記重鎖可変領域のＣ末端に軽鎖可変領域をさらに含む、請求項３１に記載のライブラリー。

【請求項３３】

１つ以上の抗体軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドをさらに含む、請求項３１に記載のライブラリー。

【請求項３４】

前記ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つが、ベクター中にある、請求項１～３３のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項３５】
前記ベクターが、発現ベクターまたは提示ベクターである、請求項３４に記載のライブラリー。
【請求項３６】
前記ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つが、細胞中にある、請求項１～３５のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項３７】
前記細胞が、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞である、請求項３６に記載のライブラリー。
【請求項３８】
活性化可能抗体の産生方法であって、請求項３６または請求項３７に記載の細胞を前記活性化可能抗体の産生に好適な条件下で培養することを含む、前記方法。
【請求項３９】
前記細胞によって産生された前記活性化可能抗体を回収することをさらに含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記活性化可能抗体を、可溶性でありながら活性化可能表現型を維持する能力について試験することをさらに含む、請求項３９に記載の方法。
【請求項４１】
請求項１～３７のいずれか一項に記載のライブラリーを使用して、標的に結合する活性化可能抗体をスクリーニングする方法であって、
ａ）前記ライブラリーの発現産物を、前記ＣＭが切断される前に、前記標的と接触させることと、
ｂ）前記ライブラリーの前記発現産物を、前記ＣＭが切断された後に、前記標的と接触させることと、
ｃ）前記ＣＭが切断された後に、前記標的に結合するが、前記ＣＭが切断される前には、前記標的に対して低減された結合を有する、前記発現産物のうちの１つ以上を単離することと、を含む、前記方法。
【請求項４２】
発現産物は、前記ＣＭが切断された後の前記発現産物の結合親和性が、前記ＣＭが切断される前の前記発現産物の前記結合親和性の少なくとも２倍である場合、単離される、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記ＣＭが、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ－１（ＭＭＰ－１）、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、第Ｘ因子、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥからなる群から選択されるプロテアーゼの少なくとも１つの第１のプロテアーゼ切断部位を含む、請求項４１または４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記標的が、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７である、請求項４１～４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
請求項１～３７のいずれか一項に記載のライブラリーからの１つ以上のポリヌクレオチ

ドによってコードされる、ポリペプチド。
【請求項４６】
請求項１～３７のいずれか一項に記載のライブラリーを含む、キット。
【請求項４７】
抗原結合ドメインを含むライブラリーであって、前記抗原結合ドメインのうちの少なくとも１つが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドを含み、
前記ＦＰが、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍが２～１０であり、ｎが３～１０であり、ｏが１～１０であり、各Ｘが独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、
前記ＣＭが、少なくとも第１の切断部位を含み、
前記ＴＢＭが、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む、前記ライブラリー。
【請求項４８】
前記抗原結合ドメインのうちの少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、または少なくとも１０個が、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含む固有のポリペプチドを含み、
前記ＦＰが、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍが２～１０であり、ｎが３～１０であり、ｏが１～１０であり、各Ｘが独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、
前記ＣＭが、少なくとも第１の切断部位を含み、
前記ＴＢＭが、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む、請求項４７に記載のライブラリー。
【請求項４９】
前記抗原結合ドメインのそれぞれが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含み、
前記ＦＰが、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍが２～１０であり、ｎが３～１０であり、ｏが１～１０であり、各Ｘが独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、
前記ＣＭが、少なくとも第１の切断部位を含み、
前記ＴＢＭが、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む、請求項４７または請求項４８に記載のライブラリー。
【請求項５０】
前記ＴＢＭが、抗体軽鎖可変領域を含み、前記抗原結合ドメインが、抗体重鎖可変領域をさらに含む、請求項４７～４９のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項５１】
前記ＴＢＭが、抗体重鎖可変領域を含み、前記抗原結合ドメインが、抗体軽鎖可変領域をさらに含む、請求項４７～４９のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項５２】
各Ｘが、Ｍ、Ｗ、またはＣではない、請求項４７～５１のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項５３】
式（ＸＩＩＩ）のX_mにおける各Ｘが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項４７～５２のいずれか一項に記載のライブラリー。
【請求項５４】

式（ＸＩＩＩ）のＸ$_{n}$における各Ｘが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項４７～５３のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項５５】

式（ＸＩＩＩ）のＸ$_{o}$における各Ｘが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項４７～５４のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項５６】

前記抗原結合ドメインのそれぞれが、細胞表面上またはファージ上に提示される、請求項４７～５５のいずれか一項に記載のライブラリー。

【請求項５７】

Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドを含む、抗体軽鎖であって、

前記ＦＰが、式（Ｉ）：Ｘ$_{m}$ＣＸ$_{n}$ＣＺ$_{o}$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍが２～１０であり、ｎが３～１０であり、ｏが１～１０であり、各Ｘが独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、

前記ＣＭが、少なくとも第１の切断部位を含み、

前記ＴＢＭが、抗体軽鎖可変領域を含む、前記抗体軽鎖。

【請求項５８】

重鎖及び軽鎖を含む抗体であって、前記軽鎖が、請求項５７に記載の軽鎖である、前記抗体。

【請求項５９】

Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドを含む、抗体重鎖であって、

前記ＦＰが、式（Ｉ）：Ｘ$_{m}$ＣＸ$_{n}$ＣＺ$_{o}$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍが２～１０であり、ｎが３～１０であり、ｏが１～１０であり、各Ｘが独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、

前記ＣＭが、少なくとも第１の切断部位を含み、

前記ＴＢＭが、抗体重鎖可変領域を含む、前記抗体重鎖。

【請求項６０】

重鎖及び軽鎖を含む抗体であって、前記重鎖が、請求項５９に記載の重鎖である、前記抗体。

【請求項６１】

表面上で提示された少なくとも１つのポリペプチドを含む細胞であって、前記少なくともポリペプチドが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含み、

前記ＦＰが、式（Ｉ）：Ｘ$_{m}$ＣＸ$_{n}$ＣＺ$_{o}$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍが２～１０であり、ｎが３～１０であり、ｏが１～１０であり、各Ｘが独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、

前記ＣＭが、少なくとも第１の切断部位を含み、

前記ＴＢＭが、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む、前記細胞。

【請求項６２】

前記細胞が、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞である、請求項６１に記載の細胞。

【請求項６３】
各Ｘが、Ｍ、Ｗ、またはＣではない、請求項６１または請求項６２に記載の細胞。
【請求項６４】
式（Ｉ）のＸ$_{m}$における各Ｘが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項６１～６３のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項６５】
式（Ｉ）のＸ$_{n}$における各Ｘが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項６１～６４のいずれか一項に記載の細胞。
【請求項６６】
活性化可能抗体であって、
Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含む第１のポリペプチドを含み、
前記ＭＭが、式（Ｉ）：Ｘ$_{m}$ＣＸ$_{n}$ＣＺ$_{o}$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍが２～１０であり、ｎが３～１０であり、ｏが１～１０であり、各Ｘが独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、前記ＭＭは、前記ＣＭが切断されていない場合、前記活性化可能抗体のヒトＣＤ１３７への結合を阻害し、
前記ＣＭが、少なくとも第１の切断部位を含み、
ａ）前記ＴＢＭが、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、前記活性化可能抗体が、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む第２のポリペプチドをさらに含むか、
ｂ）前記ＴＢＭが、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、前記活性化可能抗体が、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む第２のポリペプチドをさらに含むか、
ｃ）前記ＴＢＭが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）及び抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含むか、または
ｄ）前記ＴＢＭが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）及び抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、
前記活性化可能抗体は、前記ＣＭが切断されている場合、前記ＶＨ及びＶＬを介してヒトＣＤ１３７に結合する、前記活性化可能抗体。
【請求項６７】
前記ＴＢＭが、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、前記活性化可能抗体が、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む第２のポリペプチドをさらに含む、請求項６６に記載の活性化可能抗体。
【請求項６８】
ｍが２または３～６である、請求項６６または請求項６７に記載の活性化可能抗体。
【請求項６９】
ｎが６～８である、請求項６６～６８のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。
【請求項７０】
ｎが６である、請求項６９に記載の活性化可能抗体。
【請求項７１】
ｏが１または２である、請求項６６～６９のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。
【請求項７２】
各ＸがＭ、Ｗ、またはＣではない、請求項６６～７１のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。
【請求項７３】
式（Ｉ）のＸ$_{m}$における各Ｘが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項６６～７２のいずれか一項

に記載の活性化可能抗体。
【請求項７４】
式（Ｉ）のＸ$_n$における各Ｘが独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項６６～７３のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。
【請求項７５】
前記ＭＭが、配列番号７９～８５、ならびにＸ$_m$ＣＡＤＡＰＮＨＣＸＸ（配列番号８８）、Ｘ$_m$ＣＨＨＳＰＡＮＣＸＸ（配列番号８９）、Ｘ$_m$ＣＰＩＬＲＨＲＣＸＸ（配列番号９０）、Ｘ$_m$ＣＫＷＲＰＳＲＣＸＸ（配列番号９１）、Ｘ$_m$ＣＲＶＬＰＲＲＣＸＸ（配列番号９２）、Ｘ$_m$ＣＬＷＲＨＲＳＣＸＸ（配列番号９３）、及びＸ$_m$ＣＰＲＬＲＲＫＣＸＸ（配列番号９４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、式中、ｍが２～１０であり、各Ｘが独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸である、請求項６６～７４のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。
【請求項７６】
前記ＭＭが、そのＮ末端に追加のアミノ酸配列をさらに含む、請求項６６～７５のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。
【請求項７７】
前記追加のアミノ酸配列が、配列番号１６のアミノ酸配列を含む、請求項７６に記載の活性化可能抗体。
【請求項７８】
前記第１の切断部位が、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ－１（ＭＭＰ－１）、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、第Ｘ因子、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥからなる群から選択されるプロテアーゼのプロテアーゼ切断部位である、請求項６６～７７のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。
【請求項７９】
前記ＣＭが、前記第１の切断部位のＣ末端に第１のリンカー（Ｌ$_1$）をさらに含む、請求項６６～７８のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。
【請求項８０】
前記Ｌ$_1$が、配列番号１７～２４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項７９に記載の活性化可能抗体。
【請求項８１】
前記ＣＭが、第２の切断部位をさらに含む、請求項６６～８０のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。
【請求項８２】
前記第２の切断部位が、前記Ｌ$_1$のＣ末端にある、請求項８１に記載の活性化可能抗体。
【請求項８３】
前記第２の切断部位が、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ－１（ＭＭＰ－１）、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、第Ｘ因子、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７

、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥからなる群から選択されるプロテアーゼのプロテアーゼ切断部位である、請求項８１または請求項８２に記載の活性化可能抗体。

【請求項８４】

前記第１及び第２の切断部位が異なる、請求項８１～８３のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。

【請求項８５】

前記ＣＭが、前記第２の切断部位のＣ末端に第２のリンカー（L_2）をさらに含む、請求項８１～８４のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。

【請求項８６】

前記L_2が、配列番号１７～２４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項８５に記載の活性化可能抗体。

【請求項８７】

前記ＣＭが、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位を含み、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ－１（ＭＭＰ－１）、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、第Ｘ因子、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥからなる群から選択される１つ以上のプロテアーゼで切断される、請求項６６～８６のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。

【請求項８８】

前記活性化可能抗体が、式（ＩＩＩ）：ＥＶＧＳＹ$X_1$$X_2$$X_3$$X_4$$X_5$$X_6$Ｃ$X_7$$X_8$$X_9$$X_{10}$$X_{11}$$X_{12}$Ｃ$X_{13}$$X_{14}$ＳＧＲＳＡＧＧＧＧＴＥＮＬＹＦＱＧＳＧＧＳ（配列番号３）に従うアミノ酸配列を含み、式中、X_1が、Ａ、Ｄ、Ｉ、Ｎ、Ｐ、またはＹであり、X_2が、Ａ、Ｆ、Ｎ、Ｓ、またはＶであり、X_3が、Ａ、Ｈ、Ｌ、Ｐ、Ｓ、Ｖ、またはＹであり、X_4が、Ａ、Ｈ、Ｓ、またはＹであり、X_5が、Ａ、Ｄ、Ｐ、Ｓ、Ｖ、またはＹであり、X_6が、Ａ、Ｄ、Ｌ、Ｓ、またはＹであり、X_7が、Ｄ、Ｐ、またはＶであり、X_8が、Ａ、Ｄ、Ｈ、Ｐ、Ｓ、またはＴであり、X_9が、Ａ、Ｄ、Ｆ、Ｈ、Ｐ、またはＹであり、X_{10}が、Ｌ、Ｐ、またはＹであり、X_{11}が、Ｆ、Ｐ、またはＹであり、X_{12}が、Ａ、Ｐ、Ｓ、またはＹであり、X_{13}が、Ａ、Ｄ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、またはＹであり、X_{14}が、Ａ、Ｓ、またはＹである、請求項６６～８７のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。

【請求項８９】

前記活性化可能抗体が、配列番号４０～４６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項６６～８８のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。

【請求項９０】

前記ＶＬが、配列番号６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、請求項６６～８９のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。

【請求項９１】

前記ＶＬが、配列番号５０のアミノ酸配列を含む、請求項６６～９０のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。

【請求項９２】

前記ＶＨが、配列番号６５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号６７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、請求項６６～９１のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。

【請求項９３】
前記ＶＨが、配列番号４９のアミノ酸配列を含む、請求項６６～９２のいずれか一項に記載の活性化可能抗体。
【請求項９４】
がんの治療またはがんの進行の遅延を必要とする対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、前記対象に有効量の、請求項１～３７のいずれか一項に記載のライブラリーからの１つ以上のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、または請求項６６～９３のいずれか一項に記載の活性化可能抗体を投与することを含む、前記方法。
【請求項９５】
前記対象に有効量の少なくとも１つの追加の治療剤を投与することをさらに含む、請求項９４に記載の方法。
【請求項９６】
前記少なくとも１つの追加の治療剤が、ウイルス遺伝子治療、免疫チェックポイント阻害剤、標的療法、放射線療法、及び化学療法からなる群から選択される、請求項９５に記載の方法。
【請求項９７】
前記少なくとも１つの追加の治療剤が、ポマリスト、レブラミド、レナリドミド、ポマリドミド、サリドマイド、ＤＮＡアルキル化白金含有誘導体、シスプラチン、５－フルオロウラシル、シクロホスファミド、抗ＣＤ１３７抗体、抗ＣＴＬＡ４抗体、抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＣＤ２０抗体、抗ＣＤ４０抗体、抗ＤＲ５抗体、抗ＣＤ１ｄ抗体、抗ＴＩＭ３抗体、抗ＳＬＡＭＦ７抗体、抗ＫＩＲ受容体抗体、抗ＯＸ４０抗体、抗ＨＥＲ２抗体、抗ＥｒｂＢ－２抗体、抗ＥＧＦＲ抗体、セツキシマブ、リツキシマブ、トラスツズマブ、ペムブロリズマブ、放射線療法、単回放射線、分割放射線、焦点放射線、全臓器放射線、ＩＬ－１２、ＩＦＮα、ＧＭ－ＣＳＦ、キメラ抗原受容体、養子移入Ｔ細胞、抗がんワクチン、及び腫瘍溶解性ウイルスからなる群から選択される、請求項９５または請求項９６に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１８年２月２日に出願された国際特許出願第ＰＣＴ／ＣＮ２０１８／０７５０６５号の優先権の利益を主張するものであり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
ＡＳＣＩＩテキストファイルでの配列表の提出
ＡＳＣＩＩテキストファイルでの以下の提出内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：コンピュータ可読形態（ＣＲＦ）の配列表（ファイル名：６９５４０２０００６４１ＳＥＱＬＩＳＴ．ＴＸＴ、記録日：２０１９年１月３１日、サイズ：５４ＫＢ）。
【０００３】
本開示は、１つ以上の精度／状況依存性活性化可能結合ポリペプチド（例えば、活性化可能抗体）をスクリーニングするために、及び／または特定するために有用なポリヌクレオチド及びポリヌクレオチドライブラリー、ならびに精度／状況依存性活性化可能結合ポリペプチド（例えば、活性型であるとき、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７に結合することができる活性化可能抗体）をスクリーニングするために、及び／または特定するために有用なポリペプチド及びポリペプチドライブラリー、それに関連する細胞、方法、ならびにキットに関する。
【背景技術】
【０００４】
活性化可能結合ポリペプチドは、その中に含まれる抗原結合部分が、１つ以上の特異的

プロテアーゼの存在下での切断後よりも切断されていないときに、その標的へ結合しにくい。したがって、これらの活性化可能結合ポリペプチドは、ある特定の状況において（例えば、プロテアーゼリッチ腫瘍微小環境において）それらの標的に結合するだけが可能である抗原特異的結合タンパク質を提供する。数多くの興味深い活性化可能結合ポリペプチドが開発されているが、このようなタンパク質の開発過程は、ゆっくりであり、労働集約的であり、費用がかかる。したがって、活性化可能結合ポリペプチドに対する自己遮断ペプチドを特定するために有用な改善された方法及び生産物の必要性が存在する。

【０００５】

特許出願、特許公報、非特許文献、及びＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔ／ＧｅｎＢａｎｋ受託番号を含む、本明細書に引用されるすべての参考文献は、各個々の参考文献が参照により組み込まれるように具体的かつ個別に示されているかのように、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【０００６】

上記及び他の必要性を満たすために、例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）をスクリーニングするために、及び／または特定するために有用であるポリヌクレオチドのライブラリーが、本明細書で開示される。本開示は、本明細書に記載のポリペプチドが、優れた治療指数及び安全性プロファイルを有する活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）のより良好な設計、スクリーニング及び／または特定を可能にする、活性化の前に有意に改善されたマスキング効率を示すという発見に少なくとも部分的に基づいている。本開示は、本明細書に記載のポリヌクレオチドライブラリーが、活性化可能結合ポリペプチドを特定するために成功裏に構築及びスクリーニングされ得る（以下の実施例１及び２を参照されたい）という驚くべき発見に少なくとも部分的にさらに基づいている。活性型であるとき、ヒトＣＴＬＡ４に結合する（実施例３を参照）か、またはヒトＣＤ１３７に結合する（実施例５を参照）が、不活性型であるとき、結合せず、すなわち、これらは、切断可能部分（ＣＭ）の切断後にだけ、それらの標的に結合して（活性型であるとき）、第１のペプチド（ＦＰ）（すなわち、マスキング部分（ＭＭ）または自己遮断ペプチド）を除去する、精度／状況依存性活性化可能結合ポリペプチドが、本明細書に開示される。本明細書に開示の発見された第１のペプチド（ＦＰ）（例えば、マスキング部分）は、抗体活性を効率的にマスキングする、及び／または抗原結合を減少または完全に阻害することができる一方、いくつかの実施形態では、化学的に不安定な残基であるメチオニン及び／またはトリプトファンを欠いている。さらに、本明細書に記載のポリヌクレオチドライブラリーを使用する特定された活性化可能抗体は、それらの親抗体と同様に複数のがんの種類を治療するのに効率的であり、感受性動物（ＮＯＤマウス、実施例４を参照）における細胞傷害性を有意に低減する。

【０００７】

したがって、一態様では、ポリヌクレオチドを含むライブラリーが本明細書に提供され、ポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドをコードし、ＦＰは、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドは、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも１０個、少なくとも５０個、少なくとも１００個、少なくとも５００個、少なくとも１０００個の固有のポリペプチドをコードし、各固有のポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含み、ＦＰは、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含

み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのそれぞれは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドコードし、ＦＰは、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＦＰは、式（ＸＩＶ）：$(NNK)_mTGY(NNK)_nTGY(NNK)_o$（配列番号８７）に従う核酸配列を含むポリヌクレオチド配列によってコードされ、式中、各Ｎは独立して、Ａ、Ｇ、Ｔ、またはＣであり、各Ｋは独立して、ＴまたはＧであり、各Ｙは独立して、ＴまたはＣである。

【０００８】

先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、各Ｘは、Ｍ、Ｗ、またはＣではない。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（ＸＩＩＩ）のX_mにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（ＸＩＩＩ）のX_nにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（ＸＩＩＩ）のX_oにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ｍは６である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ｍは、２～５、例えば、２、３、４、または５である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ｎは、６～８である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ｎは６である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ｏは、１～２である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ｏは２である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＦＰは、そのＮ末端に、追加のアミノ酸配列をさらに含む。いくつかの実施形態では、追加のアミノ酸配列は、配列番号１６のアミノ酸配列を含む。

【０００９】

先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、第１の切断部位は、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ－１（ＭＭＰ－１）、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、第Ｘ因子、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥからなる群から選択されるプロテアーゼのプロテアーゼ切断部位である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＣＭは、第１の切断部位のＣ末端に第１のリンカー（Ｌ

$_1$）をさらに含む。いくつかの実施形態では、L_1は、配列番号１７～２４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＣＭは、第２の切断部位をさらに含む。いくつかの実施形態では、第２の切断部位は、L_1のＣ末端にある。いくつかの実施形態では、第２の切断部位は、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ－１（ＭＭＰ－１）、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、第Ｘ因子、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥからなる群から選択されるプロテアーゼのプロテアーゼ切断部位である。いくつかの実施形態では、第１及び第２の切断部位は異なる。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＣＭは、第２の切断部位のＣ末端に第２のリンカー（L_2）をさらに含む。いくつかの実施形態では、L_2は、配列番号１７～２４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＣＭは、第１の切断部位のＮ末端にリンカーをさらに含む。

【００１０】

先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ライブラリー中の１つ以上のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、第１のペプチド（ＦＰ）と、式（ＩＩＩ）：$EVGSYX_1X_2X_3X_4X_5X_6CX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}CX_{13}X_{14}$ＳＧＲＳＡＧＧＧＧＴＥＮＬＹＦＱＧＳＧＧＳ（配列番号３）に従うアミノ酸配列を含む切断可能部分（ＣＭ）と、を含み、式中、X_1は、Ａ、Ｄ、Ｉ、Ｎ、Ｐ、またはＹであり、X_2は、Ａ、Ｆ、Ｎ、Ｓ、またはＶであり、X_3は、Ａ、Ｈ、Ｌ、Ｐ、Ｓ、Ｖ、またはＹであり、X_4は、Ａ、Ｈ、Ｓ、またはＹであり、X_5は、Ａ、Ｄ、Ｐ、Ｓ、Ｖ、またはＹであり、X_6は、Ａ、Ｄ、Ｌ、Ｓ、またはＹであり、X_7は、Ｄ、Ｐ、またはＶであり、X_8は、Ａ、Ｄ、Ｈ、Ｐ、Ｓ、またはＴであり、X_9は、Ａ、Ｄ、Ｆ、Ｈ、Ｐ、またはＹであり、X_{10}は、Ｌ、Ｐ、またはＹであり、X_{11}は、Ｆ、Ｐ、またはＹであり、X_{12}は、Ａ、Ｐ、Ｓ、またはＹであり、X_{13}は、Ａ、Ｄ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、またはＹであり、X_{14}は、Ａ、Ｓ、またはＹである。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのそれぞれは、式（ＩＩＩ）に従うアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ポリペプチドは、配列番号２５～４６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００１１】

先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、ＴＢＭは、軽鎖可変領域のＣ末端に重鎖可変領域をさらに含む。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、１つ以上の抗体重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、マスキング部分（ＭＭ）の不在下で標的に結合することができる抗原結合部位を形成する。

【００１２】

先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＴＢＭは、抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、ＴＢＭは、重鎖可変領域のＣ末端に軽鎖可変領域をさらに含む。いくつかの実施形態では、ライブラリーは、１つ以上の抗体軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、マスキング部分（ＭＭ）の不在下で標的に結合することができる抗原結合部位を形成する。

【００１３】

先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つがベクター中にある。いくつかの実施形態では、ベクターは、発現ベクターまたは提示ベクターである。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つが細胞中にある。いくつかの実施形態では、細胞は、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞である。

【００１４】

本開示の他の態様は、本明細書に記載の細胞のいずれかを、活性化可能抗体の産生に好適な条件下で培養することを含む、活性化可能抗体の産生方法に関する。いくつかの実施形態では、方法は、細胞によって産生された活性化可能抗体を回収することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、活性化可能抗体を、可溶性でありながら活性化可能表現型を維持する能力について試験することをさらに含む。

【００１５】

本開示の他の態様は、ａ）ＣＭが切断される前に、ライブラリーの発現産物を標的と接触させる工程と、ｂ）ＣＭが切断された後、ライブラリーの発現産物を標的と接触させる工程と、ｃ）ＣＭが切断された後、標的に結合するが、ＣＭが切断される前には標的に結合しない１つ以上の発現産物を単離する工程とを含む、本明細書に記載されるライブラリーのいずれかを使用して、標的に結合する活性化可能抗体をスクリーニングする方法に関する。また、ａ）ＣＭが切断される前に、ライブラリーの発現産物を標的と接触させる工程と、ｂ）ＣＭが切断された後、ライブラリーの発現産物を標的と接触させる工程と、ｃ）ＣＭが切断された後、標的に結合するが、ＣＭが切断される前には、ＣＭが切断された後の結合親和性と比べて、低減した標的への結合親和性を有する１つ以上の発現産物を単離する工程とを含む、本明細書に記載されるライブラリーのいずれかを使用して、標的に結合する活性化可能抗体をスクリーニングする方法が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、発現産物は、ＣＭが切断される前の発現産物のK_Dが、ＣＭが切断された後の発現産物のK_Dの少なくとも２倍（例えば、少なくとも５倍、少なくとも１０倍、少なくとも１５倍、またはそれ以上）である場合に単離される。いくつかの実施形態では、ＣＭは、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ－１（ＭＭＰ－１）、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、第Ｘ因子、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥからなる群から選択されるプロテアーゼの少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位を含む。いくつかの実施形態では、標的はＣＴＬＡ４、ＣＤ１３７、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、Ｂ７－Ｈ３、ＯＸ４０、ＣＤ３、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ４０、ＣＤ９５、ＣＤ１２０ａ、ＢＴＬＡ、ＶＩＳＴＡ、ＩＣＯＳ、ＢＣＭＡ、Ｈｅｒ１、Ｈｅｒ２、Ｈｅｒ３、及び／またはＢ７－Ｈ４である。いくつかの実施形態では、標的は、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７である。

【００１６】

本開示の他の態様は、本明細書に記載のライブラリーのいずれかの１つ以上のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または本明細書に記載のライブラリーのいずれかの１つ以上のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのライブラリーに関する。

【００１７】

本開示の他の態様は、本明細書に記載のライブラリーのいずれかを含むキットに関する。

【００１８】

本開示の他の態様は、抗原結合ドメインを含むライブラリーに関し、抗原結合ドメインのうちの少なくとも１つは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドを含み、ＦＰは、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインのうちの少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも１０個、少なくとも５０個、少なくとも１００個、少なくとも１０００個は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含む固有のポリペプチドを含み、ＦＰは、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、抗原結合ドメインのそれぞれは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含む固有のポリペプチドコードし、ＦＰは、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域を含み、抗原結合ドメインが、抗体重鎖可変領域をさらに含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＴＢＭは、抗体重鎖可変領域を含み、抗原結合ドメインが、抗体軽鎖可変領域をさらに含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、各Ｘは、Ｍ、Ｗ、またはＣではない。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（ＸＩＩＩ）のX_mにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（ＸＩＩＩ）のX_nにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（ＸＩＩＩ）のX_oにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、ライブラリー中の抗原結合ドメインのそれぞれは、ファージまたは細胞（例えば、酵母細胞）上で表示される。

【００１９】

本開示の他の態様は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドを含む抗体軽鎖に関し、ＦＰは、式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域を含む。本開示の他の態様は、重鎖及び軽鎖を含む抗体に関し、この軽鎖は、本明細書に記載の抗体

軽鎖のいずれかである。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、各Ｘは、Ｍ、Ｗ、またはＣではない。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（ＸＩＩＩ）の$Ｘ_{m}$における各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。

【００２０】

本開示の他の態様は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドを含む抗体重鎖に関し、ＦＰは、式（Ｉ）：$Ｘ_{m}ＣＸ_{n}ＣＺ_{o}$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位を含み、ＴＢＭは、抗体重鎖可変領域を含む。本開示の他の態様は、重鎖及び軽鎖を含む抗体に関し、この重鎖は、本明細書に記載の抗体重鎖のいずれかである。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、各Ｘは、Ｍ、Ｗ、またはＣではない。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（ＸＩＩＩ）の$Ｘ_{m}$における各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。

【００２１】

本開示の他の態様は、表面上で提示された少なくとも１つのポリペプチドを含む細胞に関し、その少なくともポリペプチドが、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含み、ＦＰは、式（Ｉ）：$Ｘ_{m}ＣＸ_{n}ＣＺ_{o}$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、細胞は、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、各Ｘは、Ｍ、Ｗ、またはＣではない。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（Ｉ）の$Ｘ_{m}$中の各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（Ｉ）の$Ｘ_{n}$中の各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。

【００２２】

本開示の他の態様は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドを含む活性化可能抗体に関し、ＭＭは、式（Ｉ）：$Ｘ_{m}ＣＸ_{n}ＣＺ_{o}$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＭＭは、ＣＭが切断されていない場合、活性化可能抗体のヒトＣＴＬＡ４への結合を阻害し、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）及び／または抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、活性化可能抗体は、ＣＭが切断される場合に、ＶＨ及びＶＬを介してヒトＣＴＬＡ４に結合する。いくつかの実施形態で

は、ＴＢＭは、ＶＬを含み、活性化可能抗体は、ＶＨをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＴＢＭは、ＶＨを含み、活性化可能抗体は、ＶＬをさらに含む。いくつか実施形態では、ＴＢＭは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、ＶＨ及びＶＬ、またはＶＬ及びＶＨを含む。いくつかの実施形態では、ＣＭは少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位を含み、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ－１（ＭＭＰ－１）、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、第Ｘ因子、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥからなる群から選択される１つ以上のプロテアーゼで切断される。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、各Ｘは、Ｍ、Ｗ、またはＣではない。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（Ｉ）のX_m中の各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（Ｉ）のX_n中の各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＭＭは、配列番号７２～７８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＶＬは配列番号６２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号６４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＶＬは、配列番号４８のアミノ酸配列を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＶＨは配列番号５９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号６０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号６１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＶＨは、配列番号４７のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。

【００２３】

本開示の他の態様は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドを含む活性化可能抗体に関し、ＭＭは、式（Ｉ）：$X_m C X_n C Z_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＭＭは、ＣＭが切断されていない場合、活性化可能抗体のヒトＣＤ１３７への結合を阻害し、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）及び／または抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、活性化可能抗体は、ＣＭが切断される場合に、ＶＨ及びＶＬを介してヒトＣＤ１３７に結合する。いくつかの実施形態では、ＴＢＭは、ＶＬを含み、活性化可能抗体は、ＶＨをさらに含む。いくつかの実施形態では、ＴＢＭは、ＶＨを含み、活性化可能抗体は、ＶＬをさらに含む。いくつか実施形態では、ＴＢＭは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、ＶＨ及びＶＬ、またはＶＬ及びＶＨを含む。いくつかの実施形態では、ＣＭは少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位を含み、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ－１（ＭＭＰ－１）、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、第Ｘ因子、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡ

Ｍ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥからなる群から選択される１つ以上のプロテアーゼで切断される。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、各Ｘは、Ｍ、Ｗ、またはＣではない。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（Ｉ）のX_m中の各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、式（Ｉ）のX_n中の各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＭＭは、配列番号７９～８５及び８８～９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＶＬは配列番号６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＶＬは、配列番号５０のアミノ酸配列を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＶＨは配列番号６５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号６７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む。先行する実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、ＶＨは、配列番号４９のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。

【００２４】

本開示の他の態様は、本明細書に記載の活性化可能抗体のいずれかをコードするポリヌクレオチドに関する。他の態様では、本開示は、本明細書に記載のポリヌクレオチド（例えば、活性化可能抗体をコードするポリヌクレオチド）のいずれかを含むベクターに関する。いくつかの実施形態では、ベクターは、発現ベクター及び／または提示ベクターである。他の態様では、本開示は、本明細書に記載のポリヌクレオチド及び／またはベクター（例えば、活性化可能抗体をコードするポリヌクレオチド及び／またはベクター）のいずれかを含む宿主細胞に関する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、真核細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞である。他の態様では、本開示は、本明細書に記載の宿主細胞のいずれかを、抗体または活性化可能抗体の産生に好適な条件下で培養することを含む、活性化可能抗体の作製方法に関する。いくつかの実施形態では、方法は、細胞によって抗体または活性化可能抗体を回収することをさらに含む。

【００２５】

本開示の他の態様は、がんの治療またはその進行の遅延を、それを必要とする対象において行う方法に関し、本方法は、本明細書に記載のライブラリーのいずれか及び／または本明細書に記載の活性化可能抗体のいずれか（例えば、ヒトＣＴＬＡ４に対する活性化可能抗体またはヒトＣＤ１３７に対する活性化可能抗体）からの１つ以上のポリヌクレオチドによってコードされる、有効量のポリペプチドを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、対象に有効量の少なくとも１つの追加の治療剤を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの追加の治療剤は、ウイルス遺伝子治療、免疫チェックポイント阻害剤、標的療法、放射線療法、及び化学療法からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの追加の治療剤は、ポマリスト、レブラミド、レナリドミド、ポマリドミド、サリドマイド、ＤＮＡアルキル化白金含有誘導体、シスプラチン、５－フルオロウラシル、シクロホスファミド、抗ＣＤ１３７抗体、抗ＣＴＬＡ４抗体、抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＣＤ２０抗体、抗ＣＤ４０抗体、抗ＤＲ５抗体、抗ＣＤ１ｄ抗体、抗ＴＩＭ３抗体、抗ＳＬＡＭＦ７抗体、抗ＫＩＲ受容体抗体、抗ＯＸ４０抗体、抗ＨＥＲ２抗体、抗ＥｒｂＢ－２抗体、抗ＥＧＦＲ抗

体、セツキシマブ、リツキシマブ、トラスツズマブ、ペムブロリズマブ、放射線療法、単回放射線、分割放射線、焦点放射線、全臓器放射線、ＩＬ－１２、ＩＦＮα、ＧＭ－ＣＳＦ、キメラ抗原受容体、養子移入Ｔ細胞、抗がんワクチン、及び腫瘍溶解性ウイルスからなる群から選択される。

【００２６】

上記及び本明細書において説明される様々な実施形態の特性のうちの１つ、いくつか、またはすべては、組み合わされて本開示の他の実施形態を形成し得ることが理解されるべきである。本開示のこれらの及び他の態様は、当業者に明らかになるであろう。本開示のこれらの及び他の実施形態は、後続の発明を実施するための形態によってさらに説明される。

【図面の簡単な説明】

【００２７】

【図１】酵母表面上に提示された標的抗体のＦａｂ断片を使用する自己遮断ペプチドの例示的選択プロセスの概略図を示す。

【図２】酵母表面上に提示された標的抗体のｓｃＦｖ断片を使用する自己遮断ペプチドの例示的選択プロセスの概略図を示す。

【図３】フローサイトメトリーによって決定された、酵母上のＣＴＬＡ４を標的化するＦａｂ及びｓｃＦｖの機能的提示を示す。Ａは、酵母の表面上のＣＴＬＡ４を標的化するＦａｂの機能的提示を示す。Ｂは、酵母の表面上のＣＴＬＡ４を標的化するｓｃＦｖの機能的提示を示す。

【図４】ヒトＣＴＬＡ４を標的化する活性化可能抗体の例示的な選択プロセスを示す。融合タンパク質を提示する酵母ライブラリーを、数ラウンドのＦＡＣＳベースのスクリーニングに供した。

【図５】フローサイトメトリーによって決定された、例示的なＣＴＬＡ４活性化可能抗体クローンのＣＴＬＡ４結合親和性を示す。Ａは、マスキングペプチドを有しない標的抗体のｓｃＦｖ断片と比較した、無傷のマスキングペプチドを有するか、またはＴＥＶプロテアーゼによって切断されたマスキングペプチドを有するＣＴＬＡ４活性化可能抗体クローンＢ１３２８７を含むｓｃＦｖフォーマットにおける、ＣＴＬＡ４活性化可能抗体クローンの結合親和性を示す。Ｂは、マスキングペプチドを有しない標的抗体のＦａｂ断片と比較した、無傷のマスキングペプチドを有するか、またはＴＥＶプロテアーゼによって切断されたマスキングペプチドを有するＣＴＬＡ４活性化可能抗体クローンＢ１３１８９を含むＦａｂフォーマットにおける、ＣＴＬＡ４活性化可能抗体クローンのＣＴＬＡ４結合親和性を示す。

【図６】親抗体ＴＹ２１５８０と比較した、例示的なＣＴＬＡ４活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０３、ＴＹ２２４０２、及びＴＹ２２４０４のマスキング効率を示す。Ａは、ＦｏｒｔｅＢｉｏシステムによって決定された、親抗体ＴＹ２１５８０と比較した、示された活性化可能抗体の会合及び解離曲線を示す。Ｂは、親抗体ＴＹ２１５８０と比較した、結合された活性化可能抗体の相対比のグラフを示す。

【図７】ＥＬＩＳＡによって決定された、組換えヒトＣＴＬＡ４－Ｆｃに対する例示的なＣＴＬＡ４活性化可能抗体のマスキング効率を示す。Ａは、親抗体ＴＹ２１５８０と比較した、ＣＴＬＡ４活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、ＴＹ２２４０３、ＴＹ２２４０４の組換えヒトＣＴＬＡ４－Ｆｃへの結合を示すＥＬＩＳＡデータの第１のバッチを示す。Ｂは、親抗体ＴＹ２１５８０と比較した、ＣＴＬＡ４活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、ＴＹ２２４０３、ＴＹ２２４０４の組換えヒトＣＴＬＡ４－Ｆｃへの結合を示すＥＬＩＳＡデータの第２のバッチを示す。Ｃは、親抗体ＴＹ２１５８０と比較した、ＣＴＬＡ４活性化可能抗体ＴＹ２２５６３、ＴＹ２２５６４、ＴＹ２２５６５、ＴＹ２２５６６の組換えヒトＣＴＬＡ４－Ｆｃへの結合を示す。

【図８】マスキングペプチドを除去した際のＣＴＬＡ４活性化可能抗体ＴＹ２２４０４の活性を示す。Ａは、無処理、プロテアーゼｕＰＡで処理された、または５もしくは１０単位のプロテアーゼＭＭＰ－９で処理された活性化可能抗体ＴＹ２２４０４のＳＤＳ－ＰＡ

ＧＥ結果を示す。Ｂは、ＥＬＩＳＡによって決定された、親抗体ＴＹ２１５８０と比較した、無処理、プロテアーゼｕＰＡで処理された、またはプロテアーゼＭＭＰ－９で処理された活性化可能抗体ＴＹ２２４０４の結合を示す。

【図９Ａ】加速ストレス条件下での例示的な活性化可能抗体のサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）プロファイルを示す。対照条件と比較した、６サイクルの凍結融解後の活性化可能抗体ＴＹ２２４０２のＳＥＣプロファイルを示す。

【図９Ｂ】加速ストレス条件下での例示的な活性化可能抗体のサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）プロファイルを示す。対照条件と比較した、５０℃で７日後の活性化可能抗体ＴＹ２２４０２のＳＥＣプロファイルを示す。

【図９Ｃ】加速ストレス条件下での例示的な活性化可能抗体のサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）プロファイルを示す。対照条件と比較した、５０℃で７日後、４０℃で最長２８日間の保存後、または６サイクルの凍結融解後の例示的な活性化可能抗体のＳＥＣメインピーク面積のパーセンテージを示す。

【図１０】約８ｍｇ／ｍＬまたは１５０ｍｇ／ｍＬ超で保存した後の活性化可能抗体ＴＹ２２４０１及びＴＹ２２４０２のＳＥＣメインピーク面積のパーセンテージを示す。

【図１１】ＦｏｒｔｅＢｉｏシステムによって決定された、ｐＨ３．７で３０分間インキュベートされた、またはｐＨ３．７で１時間インキュベートされた、未処理の活性化可能抗体ＴＹ２１５８０、ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、及びＴＹ２２５６６のマスキング効率を示す。

【図１２Ａ】ＥＬＩＳＡによって測定された、アイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ２１５８０、または例示的なＣＴＬＡ４活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、もしくはＴＹ２２４０４によるヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）活性化を示す。アイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ２１５８０、及び例示的なＣＴＬＡ４活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、またはＴＹ２２４０４で刺激された、ＣＤ３で初回刺激を受けたヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２分泌に対する効果を示す。

【図１２Ｂ】ＥＬＩＳＡによって測定された、アイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ２１５８０、または例示的なＣＴＬＡ４活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、もしくはＴＹ２２４０４によるヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）活性化を示す。アイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ２１５８０、及び例示的なＣＴＬＡ４活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、またはＴＹ２２４０４で刺激された、ＣＤ３で初回刺激を受けたヒトＰＢＭＣからのＩＦＮγ分泌に対する効果を示す。

【図１３】ＡＤＣＣレポーター遺伝子アッセイによって決定された、アイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ２１５８０、または例示的な活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２１５８０、もしくはＴＹ２２４０４の、ヒトＣＴＬＡ４を一時的に過剰発現するＨＥＫ２９３Ｆ細胞に対する抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）活性を示す。

【図１４Ａ】ＭＣ３８同系マウス結腸直腸腫瘍モデルにおける親抗体ＴＹ２１５８０、アイソタイプ対照抗体、または例示的なＣＴＬＡ４活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、もしくはＴＹ２２５６６のインビボ抗腫瘍効果を示す。異なる治療群の雌のＭＣ３８型腫瘍担持Ｃ５７ＢＬ／６マウスの腫瘍増殖曲線を示す。データポイントは群平均値を表し、エラーバーはＳＥＭを表す。

【図１４Ｂ】ＭＣ３８同系マウス結腸直腸腫瘍モデルにおける親抗体ＴＹ２１５８０、アイソタイプ対照抗体、または例示的なＣＴＬＡ４活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、もしくはＴＹ２２５６６のインビボ抗腫瘍効果を示す。ＴＹ２１５８０、ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、及びＴＹ２２５６６で治療された群の個々の腫瘍増殖曲線を示す。

【図１５】ＣＴ２６同系マウス結腸直腸腫瘍モデルにおけるアイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ２１５８０、または３つの活性化可能抗体のうちの１つのインビボ抗腫瘍効果を示す。異なる治療群の雌のＣＴ２６型腫瘍担持Ｃ５７ＢＬ／６マウスの腫瘍増殖曲線を示す。データポイントは群平均値を表し、エラーバーはＳＥＭを表す。

【図１６】Ｈ２２同系マウス肝臓腫瘍モデルにおけるアイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ

２１５８０、または３つの活性化可能抗体のうちの１つのインビボ抗腫瘍効果を示す。異なる治療群の雌のＨ２２型腫瘍担持Ｃ５７ＢＬ／６マウスの腫瘍増殖曲線を示す。データポイントは群平均値を表し、エラーバーはＳＥＭを表す。

【図１７Ａ】３ＬＬ同系マウス肺腫瘍モデルにおける親抗体ＴＹ２１５８０、アイソタイプ対照抗体、及び例示的な活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、またはＴＹ２２５６６のインビボ抗腫瘍効果を示す。異なる治療群の雌の３ＬＬ型腫瘍担持Ｃ５７ＢＬ／６マウスの腫瘍増殖曲線を示す。データポイントは群平均値を表し、エラーバーはＳＥＭを表す。

【図１７Ｂ】３ＬＬ同系マウス肺腫瘍モデルにおける親抗体ＴＹ２１５８０、アイソタイプ対照抗体、及び例示的な活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、またはＴＹ２２５６６のインビボ抗腫瘍効果を示す。ＴＹ２１５８０、ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、及びＴＹ２２５６６で治療された群の個々の腫瘍増殖曲線を示す。

【図１８】雌のＢＡＬＢ／ｃマウスに１０ｍｇ／ｋｇの濃度で静脈内投与された試験品（ＴＡ）の、ＥＬＩＳＡによって決定された血中濃度のタイムコースを示す。Ａは、雌のＢＡＬＢ／ｃマウスに１０ｍｇ／ｋｇの濃度で静脈内投与された活性化可能抗体ＴＹ２２４０１の、親抗体ＴＹ２１５８０と比較した血中濃度のタイムコースを示す。Ｂは、雌のＢＡＬＢ／ｃマウスに１０ｍｇ／ｋｇの濃度で静脈内投与された活性化可能抗体ＴＹ２２４０２の、親抗体ＴＹ２１５８０と比較した血中濃度のタイムコースを示す。Ｃは、雌のＢＡＬＢ／ｃマウスに１０ｍｇ／ｋｇの濃度で静脈内投与された活性化可能抗体ＴＹ２２４０４の、親抗体ＴＹ２１５８０と比較した血中濃度のタイムコースを示す。

【図１９】ＮＯＤマウスモデルを使用した、アイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ２１５８０、ならびに例示的な活性化可能抗体ＴＹ２２５６６、ＴＹ２２４０１、及びＴＹ２２４０２の反復投与毒性を示す。２０日間の生存率のパーセントを、各治療群について示した。

【図２０】フローサイトメトリーによって決定された、酵母上のヒトＣＤ１３７を標的化するＦａｂ及びｓｃＦｖの機能的提示を示す。Ａは、酵母の表面上のＣＤ１３７を標的化するｓｃＦｖを示す。Ｂは、酵母の表面上のＣＤ１３７を標的化するＦａｂを示す。

【図２１】ヒトＣＤ１３７を標的化する活性化可能抗体の例示的な選択プロセスを示す。融合タンパク質を提示する酵母ライブラリーを、数ラウンドのＦＡＣＳベースのスクリーニングに供した。

【図２２Ａ】フローサイトメトリーによって決定された、例示的なＣＤ１３７活性化可能抗体クローンのＣＤ１３７結合親和性を示す。マスキングペプチドを有しない標的抗体のｓｃＦｖ断片と比較した、無傷のマスキングペプチドを有するか、またはＴＥＶプロテアーゼによって切断されたマスキングペプチドを有するＣＤ１３７活性化可能抗体クローンＢ１３４２８を含むｓｃＦｖフォーマットにおける、ＣＤ１３７活性化可能抗体クローンの結合親和性を示す。

【図２２Ｂ】フローサイトメトリーによって決定された、例示的なＣＤ１３７活性化可能抗体クローンのＣＤ１３７結合親和性を示す。マスキングペプチドを有しない標的抗体のｓｃＦｖ断片と比較した、無傷のマスキングペプチドを有するか、またはＴＥＶプロテアーゼによって切断されたマスキングペプチドを有するＣＤ１３７活性化可能抗体クローンＢ１３４３９を含むｓｃＦｖフォーマットにおける、ＣＤ１３７活性化可能抗体クローンのＣＤ１３７の結合親和性を示す。

【図２３】フローサイトメトリーによって決定された、親抗体ＴＹ２１２４２と比較した、ヒトＣＤ１３７に対する例示的活性化可能抗体のマスキング効率を示す。

【図２４】親抗体ＴＹ２１５８０と比較した場合の、可変長のマスキングペプチドを含有する例示的な活性化可能抗体のマスキング効率を示す。マスキング効率は、ＥＬＩＳＡベースの方法を使用して決定した。Ａ及びＢは、様々な活性化可能抗ＣＴＬＡ４抗体を試験するために同じ実験方法を使用して設定された２つの実験を表す。

【図２５】親抗体ＴＹ２１５８０と比較した場合の、異なる長さの切断ペプチドを含有する例示的な活性化可能抗体のマスキング効率を示す。マスキング効率は、ＥＬＩＳＡベー

スの方法を使用して決定した。
【発明を実施するための形態】
【００２８】
Ｉ．一般的技法
本明細書に記載または参照される技法及び手順は、一般的に、当業者によってよく理解され、従来の方法論、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ ３ｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（２００１）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ，ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，（２００３））、ｔｈｅ ｓｅｒｉｅｓ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）：ＰＣＲ ２：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ，Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｇ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ ｅｄｓ．（１９９５）），Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ｅｄｓ．（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ａｎｄ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ，ｅｄ．（１９８７））；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ，ｅｄ．，１９８４）、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｎｏｔｅｂｏｏｋ（Ｊ．Ｅ．Ｃｅｌｌｉｓ，ｅｄ．，１９９８）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ），ｅｄ．，１９８７）；Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｊ．Ｐ．Ｍａｔｈｅｒ ａｎｄ Ｐ．Ｅ．Ｒｏｂｅｒｔｓ，１９９８）Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ：Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ（Ａ．Ｄｏｙｌｅ，Ｊ．Ｂ．Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ，ａｎｄ Ｄ．Ｇ．Ｎｅｗｅｌｌ，ｅｄｓ．，１９９３－８）Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ；Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｄ．Ｍ．Ｗｅｉｒ ａｎｄ Ｃ．Ｃ．Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ，ｅｄｓ．）；Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ（Ｊ．Ｍ．Ｍｉｌｌｅｒ ａｎｄ Ｍ．Ｐ．Ｃａｌｏｓ，ｅｄｓ．，１９８７）；ＰＣＲ：Ｔｈｅ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ，（Ｍｕｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９９４）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｊ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９９１）；Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，１９９９）；Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ（Ｃ．Ａ．Ｊａｎｅｗａｙ ａｎｄ Ｐ．Ｔｒａｖｅｒｓ，１９９７）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（Ｐ．Ｆｉｎｃｈ，１９９７）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｄ．Ｃａｔｔｙ．，ｅｄ．，ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ，１９８８－１９８９）、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｐ．Ｓｈｅｐｈｅｒｄ ａｎｄ Ｃ．Ｄｅａｎ，ｅｄｓ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，２０００）、Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｅ．Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄ．Ｌａｎｅ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９９９）、Ｔｈｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（Ｍ．Ｚａｎｅｔｔｉ ａｎｄＪ．Ｄ．Ｃａｐｒａ，ｅｄｓ．，Ｈａｒｗｏｏｄ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，１９９５）、及びＣａｎｃｅｒ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（Ｖ．Ｔ．ＤｅＶｉｔａ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９３）に記載される広く利用される方法論を用いて一般に行われる。
【００２９】
ＩＩ．定義

本開示を詳細に説明する前に、本開示は、特定の組成物または生体系に限定されず、言うまでもなく多様であり得ることを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定するようには意図されていないことも理解されたい。

【００３０】

本明細書で使用される場合、文脈上明らかに示されない限り、「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、及び「その（ｔｈｅ）」という単数形は、複数の言及物を含む。したがって、例えば、「分子」への言及は、２つ以上のそのような分子の組み合わせなどを任意に含む。

【００３１】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、当業者であれば容易に理解するそれぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（かつ説明する）。

【００３２】

本明細書に記載される本開示の態様及び実施形態は、態様及び実施形態「を含む」、「からなる」、及び「から本質的になる」を含むことを理解されたい。

【００３３】

本明細書で使用される場合、「及び／または」という用語は、「Ａ及び／またはＢ」などの語句がＡ及びＢの両方、ＡまたはＢ、Ａ（単独）、及びＢ（単独）を含むことを意図している。同様に、本明細書で使用される場合、「及び／または」という用語は、「Ａ、Ｂ、及び／またはＣ」などの語句が以下の実施形態：Ａ、Ｂ、及びＣ；Ａ、Ｂ、またはＣ；ＡまたはＣ；ＡまたはＢ；ＢまたはＣ；Ａ及びＣ；Ａ及びＢ；Ｂ及びＣ；Ａ（単独）；Ｂ（単独）；及びＣ（単独）の各々を包含することを意図している。

【００３４】

「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸及び合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるもの、ならびにそれらのアミノ酸が後で修飾されたもの、例えば、ヒドロキシプロリン、ガンマーカルボキシグルタメート、及びＯ－ホスホセリンである。「アミノ酸類似体」という用語は、天然アミノ酸と同じ基本的な化学構造を有する化合物を指すが、Ｃ末端のカルボキシ基、Ｎ末端のアミノ基、または側鎖の官能基は、別の官能基に化学的に修飾されている。「アミノ酸模倣体」という用語は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と同様に機能する化学化合物を指す。

【００３５】

本明細書で使用される場合、２０個の従来のアミノ酸及びそれらの略称は、従来の使用法に従う。例えば、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ－Ａ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｅ．Ｓ．Ｇｏｌｕｂ ａｎｄ Ｄ．Ｒ．Ｇｒｅｎ，Ｅｄｓ．，Ｓｉｎａｕｅｒ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｓｕｎｄｅｒｌａｎｄ，Ｍａｓｓ．（１９９１））を参照されたい。

【００３６】

「ポリペプチド」、「タンパク質」、及び「ペプチド」という用語は、本明細書において互換的に使用され、２つ以上のアミノ酸のポリマーを指し得る。

【００３７】

本明細書で互換的に使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、ＤＮＡ及びＲＮＡを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、及び／またはそれらの類似体、あるいはＤＮＡもしくはＲＮＡポリメラーゼにより、または合成反応によりポリマーに組み込むことができる任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体などの修飾ヌクレオチドを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーの組み立て前または組み立て後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、標

識へのコンジュゲートなどの、合成後になされる修飾（複数可）を含み得る。他のタイプの修飾としては、例えば、天然に存在するヌクレオチドのうちの１つ以上を類似体と置換する「キャップ」、ヌクレオチド間修飾、例えば、非電荷性結合（例えば、メチルホスホン酸塩、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメートなど）によるもの、及び電荷性結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）によるもの、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ－Ｌ－リジンなど）の懸垂部分を含むもの、挿入剤（例えば、アクリジン、ソラーレンなど）によるもの、キレート剤（例えば、金属、放射活性金属、ホウ素、酸化金属など）を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾結合（例えば、アルファアノマー核酸など）によるもの、ならびにポリヌクレオチド（複数可）の未修飾形態が挙げられる。さらに、糖内に通常存在するヒドロキシル基のうちのいずれかは、例えば、ホスホン酸基、リン酸基によって置換されるか、標準保護基によって保護されるか、もしくは活性化されて追加のヌクレオチドへの追加の結合を調製してもよく、または固体もしくは半固体支持体にコンジュゲートされてもよい。５’及び３’末端ＯＨをリン酸化するか、またはアミンもしくは１～２０個の炭素原子の有機キャッピング基部分で置換することができる。他のヒドロキシルは、標準保護基に誘導体化され得る。ポリヌクレオチドは、例えば、２’－Ｏ－メチル－、２’－Ｏ－アリル、２’－フルオロ－、または２’－アジド－リボース、炭素環糖類似体、α－アノマー糖、アラビノース、キシロースまたはリキソースなどのエピマー糖、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、アクリル酸類似体、及びメチルリボシドなどの塩基性ヌクレオシド類似体を含む、当該技術分野において一般的に既知であるリボース糖またはデオキシリボース糖の類似形態も含有することができる。１つ以上のホスホジエステル結合は、代替連結基に置き換えられ得る。これらの代替連結基としては、限定されないが、リン酸塩がＰ（Ｏ）Ｓ（「チオエート」）、Ｐ（Ｓ）Ｓ（「ジチオエート」）、（Ｏ）ＮＲ２（「アミデート」）、Ｐ（Ｏ）Ｒ、Ｐ（Ｏ）ＯＲ’、ＣＯ、またはＣＨ２（「ホルムアセタール」）に置き換えられる実施形態を含み、式中、各ＲまたはＲ’は独立して、Ｈであるか、または置換もしくは非置換アルキル（１～２０Ｃ）（任意にエーテル（－Ｏ－）結合を含む）、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはアラルジルである。ポリヌクレオチドにおけるすべての結合が同一である必要はない。先行する説明は、ＲＮＡ及びＤＮＡを含む、本明細書において言及されるすべてのポリヌクレオチドに適用する。

【００３８】

「単離された核酸」という用語は、核酸の天然源に存在する他の核酸分子から分離された、ゲノム、ｃＤＮＡ、もしくは合成起源の核酸分子、またはそれらの組み合わせを指す。例えば、ゲノムＤＮＡに関して、「単離された」という用語は、ゲノムＤＮＡが天然に結合している染色体から分離されている核酸分子を含む。好ましくは、「単離された」核酸は、天然に核酸に隣接する配列（すなわち、目的の核酸の５’及び３’末端に位置する配列）を含まない。

【００３９】

本明細書で使用される場合、「ライブラリー」は、共有されたクラスを有する２つ以上の実体のセットを指す。例えば、ポリヌクレオチドを含有するライブラリーは、２つ以上のポリヌクレオチドのセットを指してもよい。「ライブラリー」という用語は、本明細書で最も広義に使用され、具体的には、組み合わせられても、または組み合わされなくてもよいサブライブラリーを網羅する。

【００４０】

本明細書で使用される場合、「固有の」とは、セットの他のメンバーとは異なるセットのメンバーを指す。例えば、ライブラリー中の固有の活性化可能抗体は、ライブラリー中の他の活性化可能抗体によって共有されない特定の配列を有する活性化可能抗体を指してもよい。実際には、ライブラリーの物理的実現の「固有の」メンバーが、２つ以上のコピー中に存在し得ることが理解されるべきである。例えば、ライブラリーは、「固有の」活性可能抗体分子のうちの１つ以上が２つ以上のコピーで発生する状態で、複数の「固有の

」活性化可能抗体を含有してもよい。
【００４１】
本明細書で使用される場合、「多様性」とは、多種性（ｖａｒｉｅｔｙ）及び／または異種性（ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｉｔｙ）を指す。例えば、ライブラリーにおける抗体の多様性は、ライブラリー中に存在する、固有の配列を有する多種多様な抗体を指す。
【００４２】
「抗体」という用語は、本明細書において最も広義に使用され、具体的には、それらが所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体、三重特異的抗体）、及び抗体断片（例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ及び／または一本鎖可変断片またはｓｃＦｖ）を網羅する。
【００４３】
いくつかの実施形態では、「抗体」という用語は、２つの同一の重（Ｈ）鎖及び２つの同一の軽（Ｌ）鎖からなる基本的な４ポリペプチド鎖構造を有する抗原結合タンパク質（すなわち、免疫グロブリン）を指す。各Ｌ鎖は、１つのジスルフィド共有結合によってＨ鎖に連結されているが、一方で２本のＨ鎖は、Ｈ鎖アイソタイプに応じて１つ以上のジスルフィド結合によって互いに連結されている。各重鎖は、Ｎ末端に可変領域（本明細書ではV_Hと略される）、続いて定常領域を有する。重鎖定常領域は、３つのドメインC_{H1}、C_{H2}及びC_{H3}からなる。各軽鎖は、Ｎ末端に可変領域（本明細書ではV_Iと略される）、続いてその反対側の端部に定常領域を有する。軽鎖定常領域は、１つのドメインC_Lからなる。V_LはV_Hと整列し、C_Lは重鎖の第１の定常ドメイン（ＣＨ１）と整列する。V_H及びV_Lの対合は、一緒になって単一抗原結合部位を形成する。ＩｇＭ抗体は、５つの基本的なヘテロ四量体の単位ならびにＪ鎖と呼ばれる追加のポリペプチドからなり、ひいては１０個の抗原結合部位を含有しているが、分泌されたＩｇＡ抗体は重合して、２～５つの基本的な４鎖単位ならびにＪ鎖を含む多価集合体を形成することができる。
【００４４】
V_H及びV_L領域は、構造及び配列分析に基づいて、超可変領域（ＨＶＲ）と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分化できる。ＨＶＲには、フレームワーク領域（ＦＷ）と呼ばれる、より保存された領域が散在している（例えば、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．（１９９９）２９３，８６５－８８１を参照）。各V_H及びV_Lは、３つのＨＶＲ及び４つのＦＷから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端にかけて、以下の順序：ＦＷ－１＿ＨＶＲ－１＿ＦＷ－２＿ＨＶＲ－２＿ＦＷ－３＿ＨＶＲ－３＿ＦＷ４で配列される。本開示全体を通して、重鎖の３つのＨＶＲは、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３と呼ばれる。同様に、軽鎖の３つのＨＶＲは、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３と呼ばれる。
【００４５】
重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的補体系の第１の成分（Ｃ１ｑ）を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。軽鎖及び重鎖の中で、可変領域及び定常領域は約１２個以上のアミノ酸の「Ｊ」領域によって結合され、重鎖は約１０個以上のアミノ酸の「Ｄ」領域も含む（例えば、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｃｈ．７（Ｐａｕｌ，Ｗ．，ｅｄ．，２ｎｄ ｅｄ．Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ）（１９８９）を参照）。
【００４６】
任意の脊椎動物種に由来するＬ鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる２つの明確に異なる種類のうちの１つに割り当てることができる。抗体は、それらの重鎖（ＣＨ）の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てることができる。５つのクラスの抗体：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭがあり、それぞれ、α（アルファ）、δ（デルタ）、ε（エプシロン）、γ（ガンマ）、及びμ（ミュー）と命名された重鎖を有する。抗体の

ＩｇＧクラスは、ガンマ重鎖Ｙ１～Ｙ４によって、それぞれ４つのサブクラス、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４にさらに分類することができる。

【００４７】

抗体の「抗原結合断片」または「抗原結合部分」という用語は、抗体が結合する抗原に結合する能力を保持する抗体の１つ以上の部分を指す。抗体の「抗原結合断片」の例としては、（ｉ）V_L、V_H、C_L、及びC_{H1}ドメインからなる一価の断片であるＦａｂ断片、（ｉｉ）ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂ断片を含む二価の断片であるＦ（ａｂ′）$_2$断片、（ｉｉｉ）V_H及びC_{H1}ドメインからなるＦｄ断片、（ｉｖ）抗体の単一アームのV_L及びV_HドメインからなるＦｖ断片、（ｖ）V_HドメインからなるｄＡｂ断片（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４－５４６（１９８９））、ならびに（ｖｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）が挙げられる。

【００４８】

「ＣＴＬＡ４」という用語は、本出願で使用され、ヒトＣＴＬＡ４（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ１６４１０）、ならびにそのバリアント、アイソフォーム、及び種相同体（例えば、マウスＣＴＬＡ４（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ０９７９３）、ラットＣＴＬＡ４（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｑ９Ｚ１Ａ７）、イヌＣＴＬＡ４（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｑ９ＸＳＩ１）、カニクイザルＣＴＬＡ４（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｇ７ＰＬ８８）など）を含む。したがって、結合分子（例えば、活性化可能抗体）はまた、ヒト以外の種からのＣＴＬＡ４にも結合し得る。他の場合では、結合分子はヒトＣＴＬＡ４に対して完全に特異的であり得、種または他の種類の交差反応性を示さない場合がある。

【００４９】

「ＣＤ１３７」という用語が本出願で使用され、ヒトＣＤ１３７（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受託番号ＮＭ００１５６１、ＮＰ００１５５２）、ならびにそのバリアント、アイソフォーム、及び種相同体（例えば、マウスＣＤ１３７（ＧｅｎＢａｎｋ Ｇｅｎｅ ＩＤ ２１９４２）、ラットＣＤ１３７（ＧｅｎＢａｎｋ Ｇｅｎｅ ＩＤ ５００５９０）、イヌＣＤ１３７（ＧｅｎＢａｎｋ Ｇｅｎｅ ＩＤ ６０８２７４）、カニクイザルＣＴＬＡ４（ＧｅｎＢａｎｋ Ｇｅｎｅ ＩＤ １０２１２７９６１）など）が挙げられる。したがって、結合分子（例えば、活性化可能抗体）はまた、ヒト以外の種からのＣＤ１３７にも結合し得る。他の場合では、結合分子はヒトＣＤ１３７に対して完全に特異的であり得、種または他の種類の交差反応性を示さない場合がある。

【００５０】

「キメラ抗体」という用語は、ヒト抗体に由来する可変領域及びマウス免疫グロブリン定常領域を有するものなど、異なる動物種に由来するアミノ酸配列を含む抗体を指す。

【００５１】

「結合に関して競合する」という用語は、結合標的への結合における２つの抗体の相互作用を指す。第２の抗体の非存在下での第１の抗体の結合と比較して、第２の抗体の存在下で第１の抗体のその同族エピトープとの結合が検出可能に減少する場合、第１の抗体は結合に関して第２の抗体と競合する。第２の抗体のそのエピトープへの結合も第１の抗体の存在下で検出可能に減少する代替案は、事実であり得るが、そうである必要はない。すなわち、第１の抗体は、第２の抗体が第１の抗体のそのそれぞれのエピトープへの結合を阻害することなく、第２の抗体のそのエピトープへの結合を阻害することができる。しかしながら、各抗体が他の抗体のその同族エピトープとの結合を検出可能に阻害する場合、それが同じ程度か、多いか少ないかにかかわらず、抗体はそれらのそれぞれのエピトープ（複数可）の結合に関して互いに「交差競合する」と言われる。

【００５２】

「エピトープ」という用語は、抗体（またはその抗原結合断片）が結合する抗原の一部を指す。エピトープは、隣接アミノ酸、またはタンパク質の三次折りたたみによって並列した非隣接アミノ酸の両方から形成することができる。隣接アミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒への曝露の際に保持されるが、三次折りたたみによって

形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒での治療の際に失われる。エピトープは、固有の空間的立体配座において様々な数のアミノ酸を含むことができる。エピトープの空間的立体配座を決定する方法としては、例えば、Ｘ線結晶学、２次元核磁気共鳴、質量分析法と組み合わせた重水素及び水素交換、または部位特異的変異誘発、または抗原ならびにその結合抗体及びそのバリアントとのその複合体構造の計算論的モデルと組み合わせて使用されるすべての方法が挙げられる（例えば、Ｅｐｉｔｏｐｅ Ｍａｐｐｉｎｇ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．６６，Ｇ．Ｅ．Ｍｏｒｒｉｓ，Ｅｄ．（１９９６）を参照）。抗原の所望のエピトープが決定されると、例えば、本明細書に記載される技術を使用して、そのエピトープに対する抗体を生成することができる。また、抗体の生成及び特性評価は、望ましいエピトープについての情報を解明し得る。この情報から、同じエピトープへの結合について抗体を競合的にスクリーニングすることが可能である。これを達成するためのアプローチは、交差競合研究を実施して、互いに競合的に結合する抗体を発見することであり、すなわち、抗体は抗原への結合に関して競合する。それらの交差競合に基づいて抗体を「ビニングする」ためのハイスループットプロセスは、ＰＣＴ公開第ＷＯ０３／４８７３１号に記載されている。

【００５３】

「生殖系列」という用語は、生殖細胞を介して親から子孫に受け継がれるような抗体遺伝子及び遺伝子セグメントのヌクレオチド配列を指す。生殖系列配列は、Ｂ細胞の成熟過程中に組換え及び高頻度変異事象によって変化された成熟Ｂ細胞の抗体をコードするヌクレオチド配列とは区別される。

【００５４】

「グリコシル化部位」という用語は、糖残基の付着のための位置として真核細胞によって認識されるアミノ酸残基を指す。オリゴ糖などの炭水化物が付着するアミノ酸は、典型的には、アスパラギン（Ｎ結合）、セリン（Ｏ結合）、及びスレオニン（Ｏ結合）残基である。特定の付着部位は、典型的には、本明細書で「グリコシル化部位配列」と呼ばれるアミノ酸の配列によってシグナル伝達される。Ｎ結合型グリコシル化のグリコシル化部位配列は、－Ａｓｎ－Ｘ－Ｓｅｒ－または－Ａｓｎ－Ｘ－Ｔｈｒ－であり、Ｘはプロリン以外の従来のアミノ酸のいずれかであり得る。「Ｎ結合型」及び「Ｏ結合型」という用語は、糖分子とアミノ酸残基との間の付着部位として機能する化学基を指す。Ｎ結合型糖はアミノ基を介して付着される。Ｏ結合型糖はヒドロキシル基を介して付着される。「グリカン占有率」という用語は、グリコシル化部位に連結された（すなわち、グリカン部位が占有されている）炭水化物部分の存在を指す。ポリペプチド上に少なくとも２つの潜在的なグリコシル化部位が存在する場合、ゼロ（０－グリカン部位の占有）、１つ（１－グリカン部位の占有）、または両方（２－グリカン部位の占有）の部位のいずれかが炭水化物部分によって占有され得る。

【００５５】

「宿主細胞」という用語は、目的のタンパク質、タンパク質断片、またはペプチドを生成するように操作することができる細胞系を指す。宿主細胞としては、培養細胞、例えば、ＣＨＯ、ＢＨＫ、ＮＳＯ、ＳＰ２／０、ＹＢ２／０などのげっ歯類（ラット、マウス、モルモット、またはハムスター）に由来する哺乳動物培養細胞；ヒト細胞（例えば、ＨＥＫ２９３Ｆ細胞、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞；またはヒト組織もしくはハイブリドーマ細胞、酵母細胞、昆虫細胞（例えば、Ｓ２細胞）、細菌細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ細胞）、ならびにトランスジェニック動物または培養組織内に含まれる細胞が挙げられるが、これらに限定されない。この用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫も包含する。ある特定の修飾は、変異または環境的影響のいずれかに起因して後続の世代において起こり得るため、そのような子孫は親細胞と同一でない場合があるが、「宿主細胞」という用語の範囲内に依然として含まれる。

【００５６】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生されたか、またはヒト抗体レパー

トリーを利用する非ヒト源に由来する抗体のアミノ酸配列、あるいは他のヒト抗体コード配列に対応するアミノ酸配列を保有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特異的に除外する。

【００５７】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト抗体配列に由来するアミノ酸残基を含有するキメラ抗体を指す。ヒト化抗体は、非ヒト動物または合成抗体からのＣＤＲまたはＨＶＲのいくつかまたはすべてを含有し得るが、抗体のフレームワーク及び定常領域は、ヒト抗体配列に由来するアミノ酸残基を含有する。

【００５８】

「例示的抗体」という用語は、本明細書に記載の抗体のいずれか１つを指す。これらの抗体は、任意のクラス（例えば、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭ）であってよい。したがって、上記で特定された各抗体は、V_L及びV_H領域について同じアミノ酸配列を有する５つのクラスすべての抗体を包含する。さらに、ＩｇＧクラスの抗体は、任意のサブクラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４）であり得る。したがって、ＩｇＧサブクラスの上記で特定された各抗体は、V_L及びV_H領域について同じアミノ酸配列を有する４つのサブクラスすべての抗体を包含する。５つのクラスならびに４つのＩｇＧサブクラスにおけるヒト抗体の重鎖定常領域のアミノ酸配列が当該技術分野で知られている。表１ｂに示される例示的な抗体のそれぞれのＩｇＧ４サブクラスについての完全長重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列が、本開示において提供される。

【００５９】

「単離された」抗体または結合分子は、その天然環境の構成成分から単離されているものである。いくつかの実施形態では、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、等電点電気泳動法（ＩＥＦ）、キャピラリー電気泳動法）、またはクロマトグラフィー（例えば、イオン交換または逆相ＨＰＬＣ）によって決定される、９５％または９９％を超える純度に精製される。抗体の純度を評価するための方法の概説については、例えば、Ｆｌａｔｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ｂ ８４８：７９－８７（２００７）を参照されたい。

【００６０】

「k_a」という用語は、特定の抗体と抗原の相互作用の会合速度定数を指し、一方、「k_d」という用語は、特定の抗体－抗原の相互作用の解離速度定数を指す。

【００６１】

「K_D」という用語は、特定の抗体－抗原相互作用の平行解離定数を指す。これは、k_d対k_aの比（すなわち、k_d／k_a）から得られ、モル濃度（Ｍ）として表される。K_Dは、抗体の結合パートナーへの結合の親和性の尺度として使用される。K_Dが小さいほど、抗体はより強く結合するか、または抗体と抗原との間の親和性がより高くなる。例えば、ナノモル（ｎＭ）の解離定数を有する抗体は、マイクロモル（μＭ）の解離定数を有する抗体よりも強く特定の抗原に結合する。抗体のK_D値は、当該技術分野で十分に確立されている方法を使用して決定することができる。抗体のK_Dを決定するための１つの方法は、ＥＬＩＳＡを使用することによる。例えば、ＥＬＩＳＡを使用するアッセイ手順は、本開示の少なくとも実施例３に記載されている。

【００６２】

「哺乳動物」という用語は、哺乳動物クラスのあらゆる動物種を指す。哺乳動物の例としては、ヒト；ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、非ヒト霊長類、及びモルモットなどの実験動物；ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、及びブタなどの家畜；ならびにライオン、トラ、ゾウなどの捕獲された野生動物などが挙げられる。

【００６３】

哺乳動物における特定の疾患状態に関する「予防する」または「予防」という用語は、疾患の発症を防止もしくは遅延させること、またはその臨床的もしくは無症候性症状の発現を防止することを指す。

【００６４】

本明細書で使用される場合、２つのポリペプチド配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるアミノ酸のパーセンテージを示す。ポリペプチドのアミノ酸配列同一性は、Ｂｅｓｔｆｉｔ、ＦＡＳＴＡ、またはＢＬＡＳＴなどの既知のコンピュータプログラムを使用して従来通りに決定することができる（例えば、Ｐｅａｒｓｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８３：６３－９８（１９９０）；Ｐｅａｒｓｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１３２：１８５－２１９（２０００）；Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０（１９９０）；Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２（１９９７）を参照されたい）。Ｂｅｓｔｆｉｔまたは任意の他の配列アラインメントプログラムを使用して、特定の配列が、例えば、参照アミノ酸配列と９５％同一であるかどうかを決定する場合、パラメータは、同一性の割合が参照アミノ酸配列の全長にわたって計算され、参照配列内のアミノ酸残基の総数の最大５％の相同性における差が許容されるように設定される。ポリペプチド間の同一性の割合の決定におけるこの前述の方法は、本明細書に開示されるすべてのタンパク質、断片、またはそれらのバリアントに適用可能である。

【００６５】

本明細書で使用される場合、「結合する」、「に結合する」、「に特異的に結合する」、または「に特異的な」という用語は、生物学的分子を含む異種分子集団の存在下で標的の存在を決定する標的と抗体との間の結合などの測定可能かつ再現可能な相互作用を指す。例えば、標的（エピトープであり得る）に結合するか、またはそれに特異的に結合する抗体は、この標的に、他の標的に結合するよりも高い親和性、結合力で、より容易に、かつ／またはより長期間結合する抗体である。一実施形態では、無関係の標的への抗体の結合の程度は、例えば、放射免疫測定法（ＲＩＡ）によって測定された、標的への抗体の結合の約１０％未満である。ある特定の実施形態では、標的に特異的に結合する抗体は、１μＭ以下、１００ｎＭ以下、１０ｎＭ以下、１ｎＭ以下、または０．１ｎＭ以下の解離定数（Ｋｄ）を有する。ある特定の実施形態では、抗体は、異なる種由来のタンパク質間で保存されるタンパク質上のエピトープに特異的に結合する。別の実施形態では、特異的結合は、排他的結合を含み得るが、それを必要としない。

【００６６】

「治療する」、「治療すること」、または「治療」という用語は、哺乳動物における特定の疾患状態に関して、疾患状態を有する哺乳動物において望ましいまたは有益な効果を引き起こすことを指す。望ましいまたは有益な効果には、疾患の１つ以上の症状（すなわち、腫瘍増殖及び／または転移、あるいは免疫細胞の数及び／または活性によって媒介される他の効果など）の頻度または重篤度の低下、あるいは疾患、状態、または障害のさらなる進行の阻止または阻害を含み得る。哺乳動物においてがんを治療する文脈において、望ましいまたは有益な効果には、がん細胞のさらなる増殖もしくは転移の阻害、がん細胞の死滅、がんの再発の阻害、がんに関連する疼痛の低減、または哺乳動物の生存能の改善が含まれ得る。効果は主観的または客観的のいずれかであり得る。例えば、動物がヒトである場合、ヒトは、改善または治療応答の自覚症状として、活力もしくは生存能の向上、または疼痛の低減を認め得る。あるいは、臨床医は、理学的検査、臨床検査値、腫瘍マーカー、またはＸ線所見に基づく、腫瘍サイズまたは負荷の減少を認め得る。治療応答に関して臨床医が観察し得るいくつかの臨床徴候には、白血球数、赤血球数、血小板数、赤血球沈降速度、及び種々の酵素レベルなどの検査値の正常化が含まれる。さらに、臨床医は、検出可能な腫瘍マーカーの減少を観察し得る。あるいは、他の検査、例えば、超音波画像法、核磁気共鳴検査、及び陽電子放出検査を使用して客観的改善を評価することができる。

【００６７】

「ベクター」という用語は、外来核酸分子を輸送することができる核酸分子を指す。外来核酸分子は、ライゲーションまたは組換えなどの組換え技術によってベクター核酸分子に連結される。これにより、外来核酸分子を増殖させ、選択し、さらに操作するか、または宿主細胞もしくは生物中で発現させることができる。ベクターは、プラスミド、ファー

ジ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、またはビリオンであり得る。ある種類のベクターは、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ得、それにより、宿主ゲノムとともに複製される（例えば、非エピソーム性哺乳動物ベクター）。別の種類のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自律増殖が可能である（例えば、細菌起源の複製を有する細菌ベクター及びエピソーム性哺乳動物ベクター）。それらが作動可能に連結されている発現可能な外来核酸の発現を指示することができる別の特定の種類のベクターは、通常「発現ベクター」と称される。発現ベクターは、一般的に、発現可能な外来核酸の発現を駆動する制御配列を有する。「転写ベクター」として既知のより単純なベクターは、転写のみ可能であるが翻訳は不可能であり、これらは、標的細胞内で複製できるが発現はできない。「ベクター」という用語は、すべての種類のベクターをそれらの機能に関係なく包含する。それらが動作可能に連結されている発現可能な核酸の発現を指示することができるベクターは、通常「発現ベクター」と称される。「ベクター」の他の例は、提示ベクター（例えば、ウイルスまたは細胞（細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、及び／または哺乳動物細胞など）の表面上でコードされたポリペプチドの発現及び提示を指示するベクター）を含み得る。

【００６８】

本明細書で使用される場合、「対象」、「患者」、または「個体」は、ヒトまたは非ヒト動物を指し得る。「非ヒト動物」は、ヒトとして分類されないあらゆる動物、例えば、飼育動物、家畜、または動物園の動物、競技用動物、ペットの動物（例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなど）、ならびに研究において使用される動物を指し得る。研究動物とは、線虫、節足動物、脊椎動物、哺乳動物、カエル、げっ歯類（例えば、マウスまたはラット）、魚類（例えば、ゼブラフィッシュまたはフグ）、鳥類（例えば、ニワトリ）、イヌ、ネコ、及び非ヒト霊長類（例えば、アカゲザル、カニクイザル、チンパンジーなど）を指し得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、対象、患者、または個体は、ヒトである。

【００６９】

「有効量」とは、治療結果または予防結果を含む、１つ以上の所望のまたは示された効果を達成するために必要な投薬量及び期間で少なくとも有効な量を指す。有効量は、１回以上の投与で提供され得る。本開示の目的のための、薬物、化合物、または医薬組成物の有効量は、予防的または治療的治療を直接的または間接的に達成するのに十分な量である。臨床的状況において理解されるように、薬物、化合物、または医薬組成物の有効量は、別の薬物、化合物、または医薬組成物と併せて達成されても、されなくてもよい（例えば、単剤療法または併用療法として投与される場合の有効量）。したがって、「有効量」は、１つ以上の治療剤の投与の状況において考慮され得、単一の薬剤は、１つ以上の他の薬剤と併せると望ましい結果が達成され得るか、または達成される場合、有効量で与えられるとみなされ得る。

【００７０】

ＩＩＩ．活性化可能結合ポリペプチド及びライブラリーの生成

本開示のある特定の態様は、ポリヌクレオチド（例えば、本明細書に記載のポリペプチドのいずれかをコードする）及び／または、例えば、活性化可能抗体、その活性化可能抗原結合断片、または活性化可能抗体の誘導体を含む、１つ以上の活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、１つ以上の活性化可能抗体）のスクリーニング及び／または特定に有用なポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのライブラリーに関する。

【００７１】

「活性化可能結合ポリペプチド」、「ＡＢＰ」、または「活性化可能抗体」という用語は、標的結合部分（ＴＢＭ）、切断可能部分（ＣＭ）、及びマスキング部分（ＭＭ）を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ＴＢＭは、標的に結合するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、ＴＢＭは、抗体またはその抗体断片の抗原結合ドメイン（ＡＢＤ）を含む。いくつかの実施形態では、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）及び抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＶＨ及びＶＬは、ＭＭの非存在下で標的に結合す

る結合ドメインを形成する。いくつかの実施形態では、ＶＨ及びＶＬは、例えば、ｓｃＦｖにおいて共有結合される。いくつかの実施形態では、ＶＨ及びＶＬは、Ｆａｂ断片を形成する。いくつかの実施形態では、ＶＨは抗体重鎖定常領域に連結され、ＶＬは抗体軽鎖定常領域に連結される。

【００７２】

いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）－切断可能部分（ＣＭ）－ＶＬの構造を含むポリペプチドを含み、活性化可能抗体は、ＶＨを含む第２のポリペプチドをさらに含む（例えば、Ｆａｂ断片）。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）－切断可能部分（ＣＭ）－ＶＬ－ＶＨの構造を含むポリペプチドを含む（例えば、ｓｃＦｖ）。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）－切断可能部分（ＣＭ）－ＶＨの構造を含むポリペプチドを含み、活性化可能抗体は、ＶＬを含む第２のポリペプチドをさらに含む（例えば、Ｆａｂ断片）。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）－切断可能部分（ＣＭ）－ＶＨ－ＶＬの構造を含むポリペプチドを含む（例えば、ｓｃＦｖ）。

【００７３】

いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）－$Ｌ_1$－切断可能部分（ＣＭ）－$Ｌ_2$－ＶＬの構造を含むポリペプチドを含み、活性化可能抗体は、ＶＨを含む第２のポリペプチドをさらに含む（例えば、Ｆａｂ断片）。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）－$Ｌ_1$－切断可能部分（ＣＭ）－$Ｌ_2$－ＶＬ－$Ｌ_3$－ＶＨの構造を含むポリペプチドを含む（例えば、ｓｃＦｖ）。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）－切断可能部分（ＣＭ）－$Ｌ_1$－ＶＨの構造を含むポリペプチドを含み、活性化可能抗体は、ＶＬを含む第２のポリペプチドをさらに含む（例えば、Ｆａｂ断片）。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）－$Ｌ_1$－切断可能部分（ＣＭ）－$Ｌ_2$－ＶＨ－$Ｌ_3$－ＶＬの構造を含むポリペプチドを含む（例えば、ｓｃＦｖ）。いくつかの実施形態では、$Ｌ_1$、$Ｌ_2$、及び／または$Ｌ_3$は、リンカーである。いくつかの実施形態では、$Ｌ_1$、$Ｌ_2$、及び$Ｌ_3$のそれぞれは、０個のアミノ酸、または１個以上、２個以上、３個以上、４個以上、５個以上、６個以上、７個以上、８個以上、９個以上、または１０個以上のアミノ酸のいずれかである独立して選択された長さを有することができるリンカーである。

【００７４】

ＣＭは、一般的に、切断可能な、例えば、酵素の基質として機能するアミノ酸配列、及び／または還元可能なジスルフィド結合を形成することができるシステイン－システイン対を含む。したがって、「切断」、「切断可能」、「切断された」などの用語がＣＭに関連して使用される場合、この用語は、例えば、プロテアーゼによる酵素的切断、ならびに還元剤への曝露から生じる得るジスルフィド結合の還元によるシステイン－システイン対間のジスルフィド結合の破壊を包含する。

【００７５】

ＭＭは、活性化可能抗体のＣＭが無傷である（例えば、対応する酵素によって切断されない、及び／または未還元システイン－システインジスルフィド結合を含有する）場合、アミノ酸配列を指し、ＭＭは、ＴＢＭのその標的への結合を妨害または阻害する。いくつかの実施形態では、ＭＭは、ＴＢＭのその標的への結合を非常に効率的に妨害または阻害するので、ＴＢＭのその標的への結合は極めて低い、及び／または検出限界より低い（例えば、結合は、ＥＬＩＳＡまたはフローサイトメトリーアッセイでは検出することができない）。ＣＭのアミノ酸配列は、ＭＭと重複しても、ＭＭ内に含まれてもよい。便宜上、「ＡＢＰ」または「活性化可能抗体」は、それらの非切断（または「天然」）状態、ならびにそれらの切断状態の両方におけるＡＢＰまたは活性化可能抗体を指すために本明細書

で使用されることが留意されるべきである。いくつかの実施形態では、切断されたＡＢＰは、（例えば、ＭＭが共有結合（例えば、システイン残基間のジスルフィド結合）によってＡＢＰに結合されていない場合、）例えば、プロテアーゼによるＣＭの切断に起因してＭＭを欠き、少なくともＭＭの放出をもたらす可能性があることが当業者には明らかであろう。例示的なＡＢＰは、以下にさらに詳細に記載される。

【００７６】

本開示のライブラリーは、本明細書に記載のポリペプチドのいずれか（例えば、本明細書に記載の活性化可能結合ポリペプチドのうちの１つ以上）をコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のライブラリーのポリヌクレオチドのうちの１つ以上（すなわち、１つ、いくつか、またはすべて）は、完全長抗体軽鎖及び／または完全長抗体重鎖（複数可）を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のライブラリーのポリヌクレオチドのうちの１つ以上（すなわち、１つ、いくつか、またはすべて）は、軽鎖及び／または重鎖Ｆａｂ断片（複数可）を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のライブラリーのポリヌクレオチドのうちの１つ以上（すなわち、１つ、いくつか、またはすべて）は、単鎖可変断片（複数可）（ｓｃＦｖ）を含むポリペプチドをコードする。

【００７７】

本開示の他の態様は、ポリヌクレオチド（例えば、本明細書に記載のポリペプチドのいずれか）及び／または、活性化可能抗体、その活性化可能抗原結合断片、もしくは活性化可能抗体の誘導体を含む、１つ以上の活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、１つ以上の活性化可能抗体）のスクリーニング及び／または特定に有用なポリペプチドのライブラリーに関する。本開示のライブラリーは、本明細書に記載のポリペプチドのうちの１つ以上（例えば、１つ以上の活性化可能結合ポリペプチド）を含有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のライブラリーのポリペプチドのうちの１つ以上（すなわち、１つ、いくつか、またはすべて）は、完全長抗体軽鎖及び／または重鎖（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のライブラリーのポリペプチドのうちの１つ以上（すなわち、１つ、いくつか、またはすべて）は、軽鎖及び／または重鎖Ｆａｂ断片（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のライブラリーのポリペプチドのうちの１つ以上（すなわち、１つ、いくつか、またはすべて）は、単鎖可変断片（複数可）（ｓｃＦｖ）を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、細胞表面（例えば、酵母または哺乳動物細胞提示）上で発現される。

【００７８】

いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、（ａ）第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）切断可能部分（ＣＭ）と、（ｃ）標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含む。いくつかの実施形態では、ＦＰは、本明細書に記載の第１のペプチドのいずれか（例えば、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ））である。いくつかの実施形態では、各Ｘは、Ｗ、Ｍ、及び／またはＣではない。いくつかの実施形態では、式（ＸＩＩＩ）のX_mにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、式（ＸＩＩＩ）のX_nにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、ならびに／または式（ＸＩＩＩ）のX_oにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、ＦＰは、本明細書に記載の第１のペプチドのいずれか（例えば、式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、

Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ））である。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、Ｘは、Ｗ、Ｍ、及び／またはＣではない。いくつかの実施形態では、式（Ｉ）の$Ｘ_{m}$における各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、式（Ｉ）の$Ｘ_{n}$における各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、ＦＰは、本明細書に記載の第１のペプチドのいずれか（例えば、式（ＸＩＩ）：$Ｚ_{m}ＣＺ_{n}ＣＺ_{o}$（配列番号７１）に従うアミノ酸配列を含む第１のペプチド（ＦＰ）であり、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である）。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、ＣＭは、本明細書に記載の切断可能部分のいずれか（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位を含む切断可能部分（ＣＭ））である。いくつかの実施形態では、ＣＭは、本明細書に記載の切断可能部分のいずれか（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位を含む切断可能部分（ＣＭ））である。いくつかの実施形態では、ＴＢＭは、本明細書に記載の標的結合部分のいずれか（例えば、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む、標的結合部分（ＴＢＭ））である。

【００７９】

いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、その標的（例えば、不活性な活性化可能抗体）への結合に関して、標的結合部分を妨害、閉塞、その能力を低下、防止、阻害、または競合する。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、ポリペプチドが活性化（例えば、ｐＨの変化（上昇または低下）によって活性化、温度変化（上昇または低下）によって活性化、第２の分子（小分子またはタンパク質リガンドなど）と接触した後に活性化など）されていない場合にのみ、その標的への結合に関して、標的結合部分を妨害、閉塞、低下、防止、阻害、または競合する。いくつかの実施形態では、活性化は、切断部分内のポリペプチドの切断を誘導する。いくつかの実施形態では、活性化がポリペプチドの立体配座変化（例えば、第１のペプチド（ＦＰ）の転置）を誘導することにより、第１のペプチドが活性化可能抗体のその標的への結合をそれ以上妨げないようにする。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、切断可能部分（ＣＭ）内で切断する１つ以上のプロテアーゼによって切断可能部分（ＣＭ）が切断されていない場合にのみ、その標的への結合に関して、標的結合部分を妨害、閉塞、その能力を低下、防止、阻害、または競合する。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、活性化前に少なくとも約２．０（例えば、少なくとも約２．０、少なくとも約３．０、少なくとも約４．０、少なくとも約５．０、少なくとも約６．０、少なくとも約７．０、少なくとも約８．０、少なくとも約９．０、少なくとも約１０、少なくとも約２５、少なくとも約５０、少なくとも約７５、少なくとも約１００、少なくとも約１５０、少なくとも約２００、少なくとも約３００、少なくとも約４００、少なくとも約５００など）のマスキング効率を有する。いくつかの実施形態では、マスキング効率は、第１のペプチド（ＦＰ）を欠くポリペプチドのその標的への結合に対する親和性と比較した、（活性化前の）マスキング部分を含む活性化可能抗体のその標的への結合に対する親和性における差異（例えば、第１のペプチド（ＦＰ）を欠く親抗体と比較した、（活性化前の）第１のペプチド（ＦＰ）を含む活性化可能抗体の標的抗原（ＣＴＬＡ４など）に対する親和性における差異、または活性化後の活性化可能抗体の標的抗原に対する親和性と比較した、（活性化前の）第１のペプチド（ＦＰ）を含む活性化可能抗体の標的抗原（ＣＴＬＡ４など）に対する親和性における差異）によって測定される。いくつかの実施形態では、マスキング効率は、（活性化前の）第１のペプチド（ＦＰ）を含む活性化可能抗体の結合の$ＥＣ_{50}$を、親抗体の$ＥＣ_{50}$で除算することによって測定される（例えば、ＥＬＩＳＡによって$ＥＣ_{50}$を測定することによって、例えば、実施例３の方法を参照）。いくつかの実施形態では、

マスキング効率は、活性化後の第１のペプチド（ＦＰ）を含む活性化可能抗体のその標的への結合に対する親和性と比較した、活性化前の第１のペプチド（ＦＰ）を含む活性化可能抗体のその標的への結合に対する親和性における差異（例えば、活性化後の活性化可能抗体と比較した、活性化前の活性化可能抗体の標的抗原（ＣＴＬＡ４など）に対する親和性における差異）によって測定される。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は標的結合部分（ＴＢＭ）に結合し、活性化可能抗体がその標的（例えば、「不活性な」活性化可能抗体）に結合するのを防ぐ。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、その標的に対する標的結合部分（ＴＢＭ）の解離定数よりも大きい、標的結合部分（ＴＢＭ）への結合についての解離定数を有する。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）はマスキング部分（ＭＭ）である。解離定数は、例えば、ＥＬＩＳＡ、表面プラズモン共鳴もしくはバイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）、またはフローサイトメトリーなどの手法によって測定することができる。

【００８０】

いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、ポリペプチドが活性化（例えば、切断可能部分（ＣＭ）内を切断する１つ以上のプロテアーゼでの処理によって活性化、ｐＨの変化（上昇または低下）によって活性化、温度変化（上昇または低下）によって活性化、第２の分子（酵素など）と接触した後に活性化など）された後、その標的への結合に関して、標的結合部分（ＴＢＭ）を妨害、閉塞、その能力を低下、防止、阻害、または競合しない。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、切断可能部分（ＣＭ）が、切断可能部分（ＣＭ）内を切断する１つ以上のプロテアーゼによって切断された後、その標的への結合に関して、標的結合部分（ＴＢＭ）を妨害、閉塞、その能力を低下、防止、阻害、または競合しない。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、活性化後、最大で約１．７５（例えば、最大で約１．７５、最大で約１．５、最大で約１．４、最大で約１．３、最大で約１．２、最大で約１．１、最大で約１．０、最大で約０．９、最大で約０．８、最大で約０．７、最大で約０．６、または最大で約０．５など）のマスキング効率を有する（例えば、親抗体の親和性と比較した、活性化後の活性化可能抗体の相対親和性）。

【００８１】

いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）－切断可能部分（ＣＭ）－標的結合部分（ＴＢＭ）の構造を含む。本開示のライブラリーは、活性型である場合、例えば、ＣＴＬＡ４、ＣＤ１３７、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、Ｂ７－Ｈ３、ＯＸ４０、ＣＤ３、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ４０、ＣＤ９５、ＣＤ１２０ａ、ＢＴＬＡ、ＶＩＳＴＡ、ＩＣＯＳ、ＢＣＭＡ、Ｈｅｒ１、Ｈｅｒ２、Ｈｅｒ３、及び／またはＢ７－Ｈ４を含む、目的のいずれかの標的に結合する１つ以上の活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）をスクリーニングするために使用され得る。

【００８２】

いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、本明細書に記載されるような、（ａ）第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）切断可能部分（ＣＭ）と、（ｃ）標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含む、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、少なくとも８つ、少なくとも９つ、少なくとも１０個、少なくとも２０個、少なくとも３０個、少なくとも４０個、少なくとも５０個、少なくとも１００個、少なくとも２５０個、少なくとも５００個、少なくとも10^{3}個、少なくとも10^{4}個、少なくとも10^{5}個、少なくとも10^{6}個、少なくとも10^{7}個、少なくとも10^{8}個、少なくとも10^{9}個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個の固有のポリペプチドをコードする複数のポリヌクレオチドを含有する。

【００８３】

いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、本明細書に記載されるような、（ａ）固有の第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）切断可能部分（ＣＭ）と、（ｃ）標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含む、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、少なくとも８つ、少なくとも９つ、少なくとも１０個、少なくとも２０個、少なくとも３０個、少なくとも４０個、少なくとも５０個、少なくとも１００個、少なくとも２５０個、少なくとも５００個、少なくとも10^{3}個、少なくとも10^{4}個、少なくとも10^{5}個、少なくとも10^{6}個、少なくとも10^{7}個、少なくとも10^{8}個、少なくとも10^{9}個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個のポリペプチドをコードする複数のポリヌクレオチドを含有する。

【００８４】

いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、１）典型的なランダムペプチドライブラリーに見られるよりも少ない数の固有のペプチド（例えば、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）もしくは式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含むＦＰ）をコード及び／もしくは含有し、２）提示ペプチドが制約付き立体配座を有したことを確実にするために、固定位置において１対のシステイン残基を含むペプチド（例えば、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）もしくは式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含むＦＰ）をコード及び／もしくは含有し、ならびに／または３）化学的に不安定な残基（メチオニンまたはトリプトファン）をほとんどもしくは全く保有しないペプチド（例えば、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）もしくは式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含むＦＰ）をコード及び／もしくは含有する。有利には、本開示のライブラリーは、ランダムペプチドライブラリーと比較してライブラリーサイズを劇的に減少させ、ペプチド（例えば、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）または式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含むＦＰ）の非常に良好な網羅する範囲を有するライブラリーの構築を可能にする。さらに、固定位置に一対のシステイン残基を含めることは、提示ペプチドが制約付き立体配座を有することを確実にし、結合親和性及び／または特異性の増加を示す傾向がある。さらに、本開示のライブラリーは、メチオニンまたはトリプトファンなどの製造プロセスに好ましくない残基をほとんどまたは全く含まないペプチド（例えば、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）または式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含むＦＰ）を有する。

【００８５】

いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、複数のポリヌクレオチドを含有し、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、（ａ）式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリーの１つ以上のポリヌクレオチドは、ベクター（例えば、発現ベクターまたは提示ベクター）内にある。いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、複数のポリヌクレオチドを含有し、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、（ａ）式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍ

は２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリーの１つ以上のポリヌクレオチドは、ベクター（例えば、発現ベクターまたは提示ベクター）内にある。

【００８６】

いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、式（ＩＩＩ）、ＥＶＧＳＹ$X_1$$X_2$$X_3$$X_4$$X_5$$X_6$Ｃ$X_7$$X_8$$X_9$$X_{10}$$X_{11}$$X_{12}$Ｃ$X_{13}$$X_{14}$ＳＧＲＳＡＧＧＧＧＴＥＮＬＹＦＱＧＳＧＧＳ（配列番号３）に従うアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、式中、X_1は、Ａ、Ｄ、Ｉ、Ｎ、Ｐ、またはＹであり、X_2は、Ａ、Ｆ、Ｎ、Ｓ、またはＶであり、X_3は、Ａ、Ｈ、Ｌ、Ｐ、Ｓ、Ｖ、またはＹであり、X_4は、Ａ、Ｈ、Ｓ、またはＹであり、X_5は、Ａ、Ｄ、Ｐ、Ｓ、Ｖ、またはＹであり、X_6は、Ａ、Ｄ、Ｌ、Ｓ、またはＹであり、X_7は、Ｄ、Ｐ、またはＶであり、X_8は、Ａ、Ｄ、Ｈ、Ｐ、Ｓ、またはＴであり、X_9は、Ａ、Ｄ、Ｆ、Ｈ、Ｐ、またはＹであり、X_{10}は、Ｌ、Ｐ、またはＹであり、X_{11}は、Ｆ、Ｐ、またはＹであり、X_{12}は、Ａ、Ｐ、Ｓ、またはＹであり、X_{13}は、Ａ、Ｄ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、またはＹであり、X_{14}は、Ａ、Ｓ、またはＹである。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリーの１つ以上のポリヌクレオチドは、ベクター（例えば、発現ベクターまたは提示ベクター）内にある。

【００８７】

いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、配列番号２５～４６から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリーの１つ以上のポリヌクレオチドは、ベクター（例えば、発現ベクターまたは提示ベクター）内にある。

【００８８】

いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、少なくとも８つ、少なくとも９つ、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、少なくとも５５個、少なくとも６０個、少なくとも６５個、少なくとも７０個、少なくとも７５個、少なくとも８０個、少なくとも８５個、少なくとも９０個、少なくとも９５個、少なくとも１００個、少なくとも２５０個、少なくとも５００個、少なくとも10^3個、少なくとも10^4個、少なくとも10^5個、少なくとも10^6個、少なくとも10^7個、少なくとも10^8個、少なくとも10^9個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個は、（ａ）式（ＸＩＩＩ）：X_mＣX_nＣX_o（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、

及びＹから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、少なくとも８つ、少なくとも９つ、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、少なくとも５５個、少なくとも６０個、少なくとも６５個、少なくとも７０個、少なくとも７５個、少なくとも８０個、少なくとも８５個、少なくとも９０個、少なくとも９５個、少なくとも１００個、少なくとも２５０個、少なくとも５００個、少なくとも10^{3}個、少なくとも10^{4}個、少なくとも10^{5}個、少なくとも10^{6}個、少なくとも10^{7}個、少なくとも10^{8}個、少なくとも10^{9}個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個は、（ａ）式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリーの１つ以上のポリヌクレオチドは、ベクター（例えば、発現ベクターまたは提示ベクター）内にある。

【００８９】

いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、少なくとも８つ、少なくとも９つ、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、少なくとも５５個、少なくとも６０個、少なくとも６５個、少なくとも７０個、少なくとも７５個、少なくとも８０個、少なくとも８５個、少なくとも９０個、少なくとも９５個、少なくとも１００個、少なくとも２５０個、少なくとも５００個、少なくとも10^{3}個、少なくとも10^{4}個、少なくとも10^{5}個、少なくとも10^{6}個、少なくとも10^{7}個、少なくとも10^{8}個、少なくとも10^{9}個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個は、式（ＩＩＩ）、$EVGSYX_1X_2X_3X_4X_5X_6CX_7X_8X_9X_{10}X_{11}X_{12}CX_{13}X_{14}SGRSAGGGGTENLYFQGSGGS$（配列番号３）に従うアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、式中、X_1は、Ａ、Ｄ、Ｉ、Ｎ、Ｐ、またはＹであり、X_2は、Ａ、Ｆ、Ｎ、Ｓ、またはＶであり、X_3は、Ａ、Ｈ、Ｌ、Ｐ、Ｓ、Ｖ、またはＹであり、X_4は、Ａ、Ｈ、Ｓ、またはＹであり、X_5は、Ａ、Ｄ、Ｐ、Ｓ、Ｖ、またはＹであり、X_6は、Ａ、Ｄ、Ｌ、Ｓ、またはＹであり、X_7は、Ｄ、Ｐ、またはＶであり、X_8は、Ａ、Ｄ、Ｈ、Ｐ、Ｓ、またはＴであり、X_9は、Ａ、Ｄ、Ｆ、Ｈ、Ｐ、またはＹであり、X_{10}は、Ｌ、Ｐ、またはＹであり、X_{11}は、Ｆ、Ｐ、またはＹであり、X_{12}は、Ａ、Ｐ、Ｓ、またはＹであり、X_{13}は、Ａ、Ｄ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、または

Ｙであり、X_{14}は、Ａ、Ｓ、またはＹである。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリーの１つ以上のポリヌクレオチドは、ベクター（例えば、発現ベクターまたは提示ベクター）内にある。

【００９０】

いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、少なくとも８つ、少なくとも９つ、少なくとも１０個、少なくとも１５個、少なくとも２０個、少なくとも２５個、少なくとも３０個、少なくとも３５個、少なくとも４０個、少なくとも４５個、少なくとも５０個、少なくとも５５個、少なくとも６０個、少なくとも６５個、少なくとも７０個、少なくとも７５個、少なくとも８０個、少なくとも８５個、少なくとも９０個、少なくとも９５個、少なくとも１００個、少なくとも２５０個、少なくとも５００個、少なくとも10^{3}個、少なくとも10^{4}個、少なくとも10^{5}個、少なくとも10^{6}個、少なくとも10^{7}個、少なくとも10^{8}個、少なくとも10^{9}個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個は、配列番号２５～４６から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリーの１つ以上のポリヌクレオチドは、ベクター（例えば、発現ベクターまたは提示ベクター）内にある。

【００９１】

いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのそれぞれは、（ａ）式（ＸＩＩＩ）：$X_{m}CX_{n}CX_{o}$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのそれぞれは、（ａ）式（Ｉ）：$X_{m}CX_{n}CZ_{o}$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリーの１つ以上のポリヌクレオチドは、ベクター（例えば、発現ベクターまたは提示ベクター）内にある。

【００９２】

いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのそれぞれは、式（ＩＩＩ）、$EVGSYX_{1}X_{2}X_{3}X_{4}X_{5}X_{6}CX_{7}X_{8}X_{9}X_{10}X_{11}X_{12}CX_{13}X_{14}SGRSAGGGGTENLYFQGSGGS$（配列番号３）に従うアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし、式中、X_{1}は、Ａ、Ｄ、Ｉ、Ｎ、Ｐ、またはＹであり、

X_2は、A、F、N、S、またはVであり、X_3は、A、H、L、P、S、V、またはYであり、X_4は、A、H、S、またはYであり、X_5は、A、D、P、S、V、またはYであり、X_6は、A、D、L、S、またはYであり、X_7は、D、P、またはVであり、X_8は、A、D、H、P、S、またはTであり、X_9は、A、D、F、H、P、またはYであり、X_{10}は、L、P、またはYであり、X_{11}は、F、P、またはYであり、X_{12}は、A、P、S、またはYであり、X_{13}は、A、D、N、S、T、またはYであり、X_{14}は、A、S、またはYである。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリーの１つ以上のポリヌクレオチドは、ベクター（例えば、発現ベクターまたは提示ベクター）内にある。

【００９３】

いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのそれぞれは、配列番号２５～４６から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリー中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）をコードする。いくつかの実施形態では、ライブラリーの１つ以上のポリヌクレオチドは、ベクター（例えば、発現ベクターまたは提示ベクター）内にある。

【００９４】

いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、（ａ）式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体軽鎖可変領域含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、ｄ）抗体重鎖可変領域と、を含むポリペプチドをコードする、少なくとも１つ（例えば、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも５つ、少なくとも１０個、少なくとも１００個、少なくとも10^3個、少なくとも10^4個、少なくとも10^5個、少なくとも10^6個、少なくとも10^7個、少なくとも10^8個、少なくとも10^9個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個）のポリヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、（ａ）式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体軽鎖可変領域含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、ｄ）抗体重鎖可変領域と、を含むポリペプチドをコードする、少なくとも１つ（例えば、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも５つ、少なくとも１０個、少なくとも１００個、少なくとも10^3個、少なくとも10^4個、少なくとも10^5個、少なくとも10^6個、少なくとも10^7個、少なくとも10^8個、少なくとも10^9個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個）のポリヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）－切断可能部分（ＣＭ）－ＶＬ－ＶＨの構造を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能

抗体）である。いくつかの実施形態ではリンカー配列は、ＶＬとＶＨとを分離する（すなわち、構造ＶＬ－リンカー－ＶＨ）。リンカーは、当該技術分野において既知の任意のリンカー配列、例えば、本明細書に記載のリンカー配列のいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、ＧＧＧＧＳ（配列番号１７）の任意のコピー数である（例えば、２回繰り返される、３回繰り返されるなど）。

【００９５】

いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、（ａ）式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体軽鎖可変領域含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドをコードする、少なくとも１つ（例えば、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも５つ、少なくとも１０個、少なくとも１００個、少なくとも10^3個、少なくとも10^4個、少なくとも10^5個、少なくとも10^6個、少なくとも10^7個、少なくとも10^8個、少なくとも10^9個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個）のポリヌクレオチドを含有し、ライブラリーは、抗体重鎖可変領域をコードする１つ以上のポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、（ａ）式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体軽鎖可変領域含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドをコードする、少なくとも１つ（例えば、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも５つ、少なくとも１０個、少なくとも１００個、少なくとも10^3個、少なくとも10^4個、少なくとも10^5個、少なくとも10^6個、少なくとも10^7個、少なくとも10^8個、少なくとも10^9個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個）のポリヌクレオチドを含有し、ライブラリーは、抗体重鎖可変領域をコードする１つ以上のポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、抗体軽鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び抗体重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、同じベクター上にある（例えば、それら自体のプロモーターから発現される）か、または異なるベクター上にある。いくつかの実施形態では、ポリペプチドのうちの少なくとも１つは、抗体重鎖可変領域と結合する場合に、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）を形成する。

【００９６】

いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、（ａ）式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体重鎖可変領域含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、ｄ）抗体軽鎖可変領域と、を含むポリペプチドをコードす

る、少なくとも１つ（例えば、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも５つ、少なくとも１０個、少なくとも１００個、少なくとも10^3個、少なくとも10^4個、少なくとも10^5個、少なくとも10^6個、少なくとも10^7個、少なくとも10^8個、少なくとも10^9個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個）のポリヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端にわたり、第１ペプチド（ＦＰ）切断可能部分（ＣＭ）－ＶＨ－ＶＬの構造を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、（ａ）式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体重鎖可変領域含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、ｄ）抗体軽鎖可変領域と、を含むポリペプチドをコードする、少なくとも１つ（例えば、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも５つ、少なくとも１０個、少なくとも１００個、少なくとも10^3個、少なくとも10^4個、少なくとも10^5個、少なくとも10^6個、少なくとも10^7個、少なくとも10^8個、少なくとも10^9個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個）のポリヌクレオチドを含有する。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、第１のペプチド（ＦＰ）－切断可能部分（ＣＭ）－ＶＨ－ＶＬの構造を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）である。いくつかの実施形態ではリンカー配列は、ＶＨとＶＬとを分離する（すなわち、構造ＶＨ－リンカー－ＶＬ）。リンカーは、当該技術分野において既知の任意のリンカー配列、例えば、本明細書に記載のリンカー配列のいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、リンカー配列は、ＧＧＧＧＳ（配列番号１７）の任意のコピー数である（例えば、２回繰り返される、３回繰り返されるなど）。

【００９７】

いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、（ａ）式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体重鎖可変領域含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドをコードする、少なくとも１つ（例えば、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも５つ、少なくとも１０個、少なくとも１００個、少なくとも10^3個、少なくとも10^4個、少なくとも10^5個、少なくとも10^6個、少なくとも10^7個、少なくとも10^8個、少なくとも10^9個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個）のポリヌクレオチドを含有し、ライブラリーは、抗体軽鎖可変領域をコードする１つ以上のポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、（ａ）式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸

配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰから選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含む切断可能部分（ＣＭ）と、ｃ）抗体重鎖可変領域含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドをコードする、少なくとも１つ（例えば、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも５つ、少なくとも１０個、少なくとも１００個、少なくとも10^3個、少なくとも10^4個、少なくとも10^5個、少なくとも10^6個、少なくとも10^7個、少なくとも10^8個、少なくとも10^9個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個）のポリヌクレオチドを含有し、ライブラリーは、抗体軽鎖可変領域をコードする１つ以上のポリヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び抗体軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、同じベクター上にある（例えば、それら自体のプロモーターから発現される）か、または異なるベクター上にある。いくつかの実施形態では、ポリペプチドのうちの少なくとも１つは、抗体軽鎖可変領域と結合する場合に、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）を形成する。

【００９８】

本明細書に記載のポリヌクレオチド及び／またはポリヌクレオチドライブラリーは、ＨＶＲ配列（例えば、重鎖可変領域ＨＶＲ配列のうちの１つ、２つ、または３つ、及び／もしくは軽鎖可変領域ＨＶＲ配列のうちの１つ、２つ、または３つ）、重鎖可変領域配列、及び／または本明細書に記載の抗体のいずれか（例えば、抗ＣＴＬＡ４抗体、抗ＣＤ１３７抗体）の軽鎖可変領域配列のいずれかを組み込んでもよい。本明細書に記載のポリヌクレオチド及び／またはポリヌクレオチドライブラリーはまた、ＨＶＲ配列（例えば、重鎖可変領域ＨＶＲ配列のうちの１つ、２つ、または３つ、及び／もしくは軽鎖可変領域ＨＶＲ配列のうちの１つ、２つ、または３つ）、重鎖可変領域配列、軽鎖可変領域配列、ならびに／またはＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＣＮ２０１７／０９８３３３号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、及び／もしくはＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＣＮ２０１７／０９８２９９号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される重鎖、及び／または軽鎖を組み込んでもよい。

【００９９】

いくつかの実施形態では、本開示のライブラリーは、本開示の１つ以上のポリヌクレオチド（例えば、合成ポリヌクレオチド）をコードする１つ以上のベクター（例えば、発現ベクター及び／または提示ベクター）を含む。

【０１００】

例えば、本開示のライブラリーのポリヌクレオチド配列（例えば、合成ポリヌクレオチド（複数可））を提供及び組み立てることによって、ライブラリーを調製する方法が、本明細書にさらに提供される。例えば、複数の（例えば、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも５つ、少なくとも１０個、少なくとも１００個、少なくとも10^3個、少なくとも10^4個、少なくとも10^5個、少なくとも10^6個、少なくとも10^7個、少なくとも10^8個、少なくとも10^9個、少なくとも10^{10}個、少なくとも10^{11}個、少なくとも10^{12}個、少なくとも10^{13}個、少なくとも10^{14}個、少なくとも10^{15}個、少なくとも10^{16}個、少なくとも10^{17}個、少なくとも10^{18}個、または少なくとも10^{19}個）の第１のペプチド（ＦＰ）配列切断可能部分（ＣＭ）配列、及び／または標的結合部分（ＴＢＭ）配列（例えば、本明細書に記載のＦＰ、ＣＭ、及びＴＢＭ配列のうちのいずれか１つ以上）を選択し、これらの配列をコードするポリヌクレオチド配列を組み立てて、複数のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、合成

ポリヌクレオチド）のライブラリーを作成することにより、ライブラリーを作製する方法も、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、組み立てられたライブラリーによってコードされるポリペプチドのうちの少なくとも１つは、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）である。

【０１０１】

本明細書に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ポリペプチド配列の一部または全体の発現に好適な任意のベクターにクローニングすることができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、タンパク質（例えば、ウイルスコートタンパク質、細菌表面タンパク質、酵母表面タンパク質、昆虫細胞表面タンパク質、哺乳動物細胞表面タンパク質）のすべてまたは一部に融合したポリペプチドの一部または全体の産生（すなわち、融合タンパク質の作成）を可能にするベクターにクリーニングされ、粒子または細胞の表面に提示される。いくつかのタイプのベクターが利用可能であり、例えばファージミドベクターを、本開示を実施するために使用してもよい。ファージミドベクターは、当業者に既知であるように、一般的に、プロモーター、シグナル配列、表現型選択遺伝子、複製開始点、及び他の必要な構成要素を含む様々な構成要素を含有する。いくつかの実施形態では、ポリペプチド領域をコードするポリヌクレオチドは、細菌提示のために細菌細胞で、または酵母提示のために酵母細胞で発現させるためにベクターにクローニングすることができる。例示的なベクターは、米国ＰＧ公開第ＵＳ２０１６０１４５６０４号に記載されている。いくつかの実施形態では、ベクターは、５’から３’にわたり、表面（例えば、ファージ、細菌、酵母、昆虫、または哺乳動物細胞の表面）上に提示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、制限部位、表面上に提示することができる表面ペプチドをコードする第２のポリヌクレオチド、及び第２の制限部位を含む提示ベクターである。いくつかの実施形態では、第２のポリヌクレオチドは、ファージコートタンパク質、酵母外壁タンパク質（Ａｇａ２など）、細菌外膜タンパク質、細胞表面テザードメイン、またはアダプター、またはその短縮型もしくは誘導体をコードする。いくつかの実施形態では、表面ペプチドは、ファージ提示、酵母提示、細菌提示、昆虫提示、または哺乳動物提示、またはそれらの間のシャトル提示のためのものである。いくつかの実施形態では、発現される場合、アミノ酸配列及び表面ペプチドは、表面上の融合タンパク質として提示される。いくつかの実施形態では、ベクターは、第１の制限部位の５’側または第２の制限部位の３’側に融合タグをさらに含む。

【０１０２】

本開示のある特定の態様は、本明細書に記載のベクター（複数可）を含有する細胞の集団に関する。本明細書に記載の手法のいずれか、または他の好適な手法によって生成されたポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、発現及びスクリーニングされて、所望の構造及び／または活性を有する活性化可能結合ポリペプチドを特定することができる。ポリペプチドの発現は、例えば、無細胞抽出物（例えば、リボソーム提示）、ファージ提示、原核細胞（例えば、細菌提示）、または真核細胞（例えば、酵母提示）を使用して実行することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞（チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞など）である。細菌細胞、酵母細胞、または哺乳動物細胞をトランスフェクトするための方法は、当技術分野において既知であり、本明細書で引用される参考文献に記載されている。これらの細胞型におけるポリペプチド（例えば、１つ以上の活性化可能結合ポリペプチド）の（例えば、本開示のライブラリーからの）発現、ならびに目的の活性化可能結合ポリペプチドのスクリーニングは、以下により詳細に記載されている。

【０１０３】

あるいは、ポリヌクレオチドは、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ ａｎｄ Ｓｋｅｒｒａ．（Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１９８９，１７８：４７６；Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１９９１，９：（２７３）に記載されているものなどの、Ｅ．ｃｏｌｉ発現系で発現され得る。変異体タンパク質は、Ｂｅｔｔｅｒ ａｎｄ Ｈｏｒｗｉｔｚ，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１９８９，１７８：４７６によって記載されているように、培地及び／または

細菌の細胞質における分泌のために発現させることができる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ｏｍｐＡ、ｐｈｏＡまたはｐｅｌＢシグナル配列などの、シグナル配列をコードする配列の３’末端に結合している（Ｌｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１９８７，１６９：４３７９）。これらの遺伝子融合は、それらが単一のベクターから発現され、Ｅ．ｃｏｌｉのペリプラズム領域に分泌され、ここでそれらが再折りたたみされ、活性型で回収され得るように、ジシストロニック構築物に組み立てられる。（Ｓｋｅｒｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１９９１，９：２７３）。例えば、第１のペプチド（ＦＰ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び抗体軽鎖を含む標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドをコードする遺伝子を、抗体重鎖遺伝子と同時に発現させて、目的のポリペプチドを産生することができる。

【０１０４】

他の実施形態では、本開示のポリペプチド配列は、例えば、ＵＳ２００４００７２７４０、ＵＳ２００３０１０００２３、及びＵＳ２００３００３６０９２に記載の分泌シグナル及び脂質化部分を使用して、原核生物、例えば、Ｅ．ｃｏｌｉの膜表面上で発現される。

【０１０５】

あるいは、本開示のポリペプチド配列は、例えば、Ｊｅｏｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，２００７，１０４：８２４７に記載のような、固定したペリプラズム発現（ＡＰＥｘ２－ハイブリッド表面提示）によって、または、例えば、Ｍａｚｏｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２００７，２５：５６３によって記載されているように、他の固定方法によって、発現及びスクリーニングされ得る。

【０１０６】

哺乳動物細胞、例えば、骨髄腫細胞（例えば、ＮＳ／０細胞）、ハイブリドーマ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、及びヒト胎児腎（ＨＥＫ）細胞などの高等真核細胞も、本開示のポリペプチドの発現のために使用され得る。哺乳動物細胞において発現されるポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）は、培養培地中に分泌されるように、または細胞の表面上で発現されるように設計され得る。

【０１０７】

他の実施形態では、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）は、哺乳動物細胞提示を使用して選択することができる（Ｈｏ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，２００６，１０３：９６３７）。いくつかの実施形態では、上述されかつ以下に例示されるように、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）は、ウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部に融合された（すなわち、融合タンパク質を作成する）一部またはすべてのポリペプチド配列の産生後に選択され、例えば、ファージ提示を使用して、粒子または細胞の表面に提示することができる。

【０１０８】

本開示のある特定の態様は、本開示のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドライブラリーを含む非ヒト動物に関する。例えば、本開示の非ヒト動物は、そのゲノムが本開示のポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）をコードするポリヌクレオチドを含むように改変され得る。いくつかの実施形態では、トランスジェニック動物（例えば、マウス）は、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを発現する。非ヒト動物のゲノムを改変するための手法は、当該分野において既知である（例えば、Ｘｅｎｏｍｏｕｓｅ（商標）を生成するために使用される方法）。

【０１０９】

本開示のライブラリーに由来する活性化可能結合ポリペプチドのスクリーニングは、任意の適切な手段（例えば、活性化の前後の標的結合の決定（切断可能部分（ＣＭ）内の配列を切断する１つ以上のプロテアーゼによるポリペプチドの処理など））によって実行することができる。例えば、結合活性は、標準的なイムノアッセイ及び／または親和性クロマトグラフィーによって評価することができる。触媒機能、例えば、タンパク質分解機能についての本開示のポリペプチドのスクリーニングは、標準的なアッセイ、例えば、ヘモ

グロビンプラークアッセイを使用して達成することができる。標的に対するポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）の結合親和性を決定することは、以下のＦｏｒｔｅＢｉｏＯｃｔｅｔ（登録商標）ＲＥＤ９６プラットフォーム（Ｐａｌｌ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して例示されるように、表面プラズモン共鳴またはバイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）に基づいて、タンパク質の特定の標的への結合率を測定する、ＥＬＩＳＡ、ＢＩＡＣＯＲＥ（商標）機器などの様々な既知の手法を使用して、インビトロでアッセイすることができる。インビボアッセイは、多数の動物モデルを使用して実施し、次いで、必要に応じて、その後ヒトで試験することができる。細胞ベースの生物学的アッセイも企図される。ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）は、機能的活性、例えば、アンタゴニストまたはアゴニスト活性についてさらに選択することができる。例えば、いくつかの実施形態では、ｆａｂ断片（複数可）を含むポリペプチドと１つ以上の標的（複数可）との間の結合の親和性は、抗原をヒトＩｇＧ１－Ｆｃタグでタグ付けし、抗ｈＩｇＧ－Ｆｃ捕捉（ＡＨＣ）バイオセンサーで捕捉することにより、ＢＬＩを使用して測定する（例えば、活性化の前後に）。ポリペプチドは、ＣＨ１ドメインのＣ末端にＨｉｓ６タグでタグ付けし、Ｅ．ｃｏｌｉなどの宿主細胞で過剰発現させ、Ｎｉ－ＮＴＡ樹脂などを使用して精製することができる。親和性は、ＡＨＣセンサー（抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃ捕捉浸漬及び読み取りバイオセンサー）を使用して、例えば、速度論的緩衝液で５～１０μｇ／ｍＬに、希釈されたＦａｂを含む精製されたポリペプチドを含有するウェルに浸漬して測定することができる（例えば、活性化の前後）。

【０１１０】

結合剤が特定された後（例えば、ポリペプチドが、「活性」の場合（例えば、プロテアーゼ処理後）に標的または抗原に結合することができるが、「非活性」の場合（例えば、プロテアーゼ処理前）には結合することができないことを決定することによって）、核酸が抽出され得る。次いで、抽出したＤＮＡを使用して、Ｅ．ｃｏｌｉ宿主細胞を直接形質転換するか、あるいはコード化配列を、例えば、好適なプライマーを用いたＰＣＲを使用して増幅し、任意の典型的な配列決定法によって配列決定することができる。結合剤のＤＮＡ配列は、制限酵素消化され、タンパク質発現のためにベクターに挿入され得る。

【０１１１】

第１のペプチド（ＦＰ）

いくつかの実施形態では、本開示は、第１のペプチド（ＦＰ）を含む１つ以上のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド及び／またはポリヌクレオチドライブラリーに関する。いくつかの実施形態では、本開示は、第１のペプチド（ＦＰ）を含む少なくとも１つのポリペプチドを含むポリペプチド及び／またはポリペプチドライブラリーに関する。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、各Ｘは、Ｗ、Ｍ、及び／またはＣではない。いくつかの実施形態では、式（ＸＩＩＩ）のX_mにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、式（ＸＩＩＩ）のX_nにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、ならびに／または式（ＸＩＩＩ）のX_oにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、ＦＰは、式（ＸＩＶ）：$(ＮＮＫ)_mＴＧＹ(ＮＮＫ)_nＴＧＹ(ＮＮＫ)_o$（配列番号８７）に従うポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドを含み、式中、各Ｎは独立して、Ａ、Ｇ、Ｔ、またはＣであり、各Ｋは独立して、ＴまたはＧであり、各Ｙは独立して、ＴまたはＣであり、各Ｈは独立して、Ａ、Ｔ、またはＣである。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、Ｘは、Ｗ、Ｍ、及び／またはＣではない。いくつかの実施形態では、式（Ｉ）のX_mにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、式（Ｉ）のX_nにおける各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、ＦＰは、式（ＩＩ）：$(NNK)_mTGY(NNK)_nTGY(NHC)_o$（配列番号２）に従うポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドを含み、式中、各Ｎは独立して、Ａ、Ｇ、Ｔ、またはＣであり、各Ｋは独立して、ＴまたはＧであり、各Ｙは独立して、ＴまたはＣであり、各Ｈは独立して、Ａ、Ｔ、またはＣである。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、式（ＸＩＩ）：$Z_mCZ_nCZ_o$（配列番号７１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、ｍは、２～５、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～１０、４～９、４～８、４～７、４～６、４～５、５～１０、５～９、５～８、５～７、５～６、６～１０、６～９、６～８、６～７、７～１０、７～９、７～８、８～１０、８～９、または９～１０である。いくつかの実施形態では、ｍは６～８である。いくつかの実施形態では、ｍは２、３、４、５、６、７、８、９、または１０である。いくつかの実施形態では、ｍは６である。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、ｎは、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～１０、４～９、４～８、４～７、４～６、４～５、５～１０、５～９、５～８、５～７、５～６、６～１０、６～９、６～８、６～７、７～１０、７～９、７～８、８～１０、８～９、または９～１０である。いくつかの実施形態では、ｎは６～８である。いくつかの実施形態では、ｎは３、４、５、６、７、８、９、または１０である。いくつかの実施形態では、ｎは６である。いくつかの実施形態では、ｎは８である。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、ｏは、１～１０、１～９、１～８、１～７、１～６、１～５、１～４、１～３、１～２、２～１０、２～９、２～８、２～７、２～６、２～５、２～４、２～３、３～１０、３～９、３～８、３～７、３～６、３～５、３～４、４～１０、４～９、４～８、４～７、４～６、４～５、５～１０、５～９、５～８、５～７、５～６、６～１０、６～９、６～８、６～７、７～１０、７～９、７～８、８～１０、８～９、または９～１０である。いくつかの実施形態では、ｏは１～２である。いくつかの実施形態では、ｏは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０である。いくつかの実施形態では、ｏは２である。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、式（ＩＶ）：$Z_6CX_6CZ_2$（配列番号５５）に従うアミノ酸配列を含み、式中、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。

【０１１８】
いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、式（Ｖ）：$Z_6CX_8CZ_2$（配列番号５６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。
【０１１９】
いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、式（ＶＩ）：$(Z_6)C(Z_6)C(Z_2)$（配列番号５７）に従うアミノ酸配列を含み、式中、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。
【０１２０】
いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、式（ＶＩＩ）：$(Z_6)C(Z_8)C(Z_2)$（配列番号５８）に従うアミノ酸配列を含み、式中、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。
【０１２１】
いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、$X_mCADAPNHCXX$（配列番号８８）、$X_mCHHSPANCXX$（配列番号８９）、$X_mCPILRHRCXX$（配列番号９０）、$X_mCKWRPSRCXX$（配列番号９１）、$X_mCRVLPRRCXX$、（配列番号９２）、$X_mCLWRHRSCXX$（配列番号９３）、及び$X_mCPRLRRKCXX$（配列番号９４）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、各Ｘは、Ｍ、Ｗ、またはＣではない。いくつかの実施形態では、各Ｘは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、ｍは２である。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、アミノ酸配列ＥＶＧＳＹＰＴＤＬＤＡＣＡＤＡＰＮＨＣＨＦ（配列番号９５）、ＥＶＧＳＹＳＳＴＨＡＨＣＨＨＳＰＡＮＣＩＳ（配列番号９６）、ＥＶＧＳＹＤＴＤＹＤＦＣＰＩＬＲＨＲＣＤＳ（配列番号９７）、ＥＶＧＳＹＮＤＹＮＹＨＣＫＷＲＰＳＲＣＨＮ（配列番号９８）、ＥＶＧＳＹＹＨＤＹＤＤＣＲＶＬＰＲＲＣＦＮ（配列番号９９）、ＥＶＧＳＹＳＮＮＦＡＳＣＬＷＲＨＲＳＣＡＤ（配列番号１００）、またはＥＶＧＳＹＴＤＮＹＤＹＣＰＲＬＲＲＫＣＹＨ（配列番号１０１）を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、ＨＶＲ、可変領域（ＶＬ、ＶＨ）、及び／または軽鎖及び重鎖（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ４）の特定のアミノ酸配列に関して記載される抗体を含む、本明細書に記載される抗ＣＤ１３７抗体のうちの１つ以上の配列を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、本明細書に記載の抗ＣＤ１３７抗体のうちの１つ以上の完全長抗体軽鎖を含む。
【０１２２】
いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、$X_mCPDHPYPCXX$（配列番号１０２）、$X_nCDAFYPYCXX$（配列番号１０３）、$X_mCDSHYPYCXX$（配列番号１０４）、及び$X_mCVPYYYACXX$（配列番号１０５）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸である。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、アミノ酸配列　ＥＶＧＳＹＮＦＶＡＤＳＣＰＤＨＰＹＰＣＳＡ（配列番号１１０）、ＥＶＧＳＹＩＶＨＨＳＤＣＤＡＦＹＰＹＣＤＳ（配列番号１１１）、ＥＶＧＳＹＹＳＡＹＰＡＣＤＳＨＹＰＹＣＮＳ（配列番号１１２）、ＥＶＧＳＹＰＮＰＳＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹ（配列番号１１３）、ＥＶＧＳＹＹＳＡＹＰＡＣＤＳＨＹＰＹＣＱＳ（配列番号１１４）、ＥＶＧＳＹＹＳＡＹＰＡＣＤＳＨＹＰＹＣＮＳ（配列番号１１５）、ＥＶＧ

ＳＹＰＱＰＳＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹ（配列番号１１６）、またはＥＶＧＳＹＰＮＰＡＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹ（配列番号１１７）を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、ＨＶＲ、可変領域（ＶＬ、ＶＨ）、及び／または軽鎖及び重鎖（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ４）の特定のアミノ酸配列に関して記載される抗体を含む、本明細書に記載される抗ＣＴＬＡ４抗体のうちの１つ以上の配列を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、本明細書に記載の抗ＣＴＬＡ４抗体のうちの１つ以上の完全長抗体軽鎖を含む。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、配列番号７２～８５から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される第１のペプチド（ＦＰ）のいずれかは、１つ以上の追加のアミノ酸配列（例えば、１つ以上のポリペプチドタグ）をさらに含み得る。好適な追加のアミノ酸配列の例としては、精製タグ（例えば、ｈｉｓタグ、ｆｌａｇタグ、マルトース結合タンパク質、及びグルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼタグ）、検出タグ（例えば、測光的に検出され得るタグ（例えば、赤色または緑色蛍光タンパク質など））、検出可能な酵素活性を有するタグ（例えば、アルカリホスファターゼなど）、分泌配列、リーダー配列、及び／また安定化配列を含有するタグ、プロテアーゼ切断部位（例えば、フリン切断部位、ＴＥＶ切断部位、トロンビン切断部位）などが含まれ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、１つ以上の追加のアミノ酸配列は、第１のペプチド（ＦＰ）のＮ末端にある。いくつかの実施形態では、追加のアミノ酸配列は、配列ＥＶＧＳＹ（配列番号１６）を含むかまたはそれからなる。

【０１２５】

いくつかの実施形態では、第１のペプチドは、活性化前に（例えば、切断可能部分（ＣＭ）内で切断する１つ以上のプロテアーゼで処理する前に、ｐＨの（局所的な）変化（上昇または低下）を受ける前に、温度変化（上昇または低下）の前に、第２の分子（小分子またはタンパク質リガンドなど）と接触する前になど）標的結合部分（ＴＢＭ）に結合し、ポリペプチドがその標的に結合するのを阻害するが、活性化後に（例えば、切断可能部分（ＣＭ）内で切断する１つ以上のプロテアーゼで処理した後に、ｐＨの（局所的な）変化（上昇または低下）を受けた後に、温度変化（上昇または低下）の後に、第２の分子（小分子またはタンパク質リガンドなど）と接触した後になど）ＴＢＭに結合しない、及び／またはポリペプチドがその標的に結合するのを阻害しない。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）（例えば、マスキング部分）は、ＣＭが切断されていない場合、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）のその標的への結合を阻害するが、ＣＭが切断されている場合、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体））のその標的への結合を阻害しない。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）（例えば、マスキング部分）は、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体））のその標的に対する解離定数より大きい（例えば、少なくとも約１．５倍大きい、少なくとも約２倍大きい、少なくとも約２．５倍大きい、少なくとも約３倍大きい、少なくとも約３．５倍大きい、少なくとも約４倍大きい、少なくとも約４．５倍大きい、少なくとも約５倍大きい、少なくとも約１０倍大きい、少なくとも約１００倍大きい、少なくとも約５００倍大きいなど）ＴＢＭへの結合に対する解離定数を有する。

【０１２６】

切断可能部分（ＣＭ）

いくつかの実施形態では、本開示は、切断可能部分（ＣＭ）を含む１つ以上のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド及び／またはポリヌクレオチドライブラリーに関する。いくつかの実施形態では、本開示は、切断可能部分（ＣＭ）を含む少なくとも１つのポリペプチドを含むポリペプチド及び／またはポリペプチドライブラリーに関する。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、切断可能部分（ＣＭ）は、少なくとも第１の切断部位（ＣＳ$_1$）（例えば、第１のプロテアーゼ切断部位）を含む。いくつかの実施形態では、第１の切断部位は、第１のプロテアーゼ切断部位である。当該技術分野で既知の任意のプロテアーゼ（例えば、ＣＭを含む活性化可能抗体の標的と共存していることが知られているプロテアーゼ）によって認識及び／または切断される任意の好適なプロテアーゼ切断部位が使用され得、それには、例えば、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ（例えば、ＭＭＰ－１、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－７、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１０、ＭＭＰ－１１、ＭＭＰ－１２、ＭＭＰ－１３、ＭＭＰ－１４、ＭＭＰ－１５、ＭＭＰ－１６、ＭＭＰ－１７、ＭＭＰ－１９、ＭＭＰ－２０、ＭＭＰ－２３、ＭＭＰ－２４、ＭＭＰ－２６、及び／またはＭＭＰ－２７）、タバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、ＡＤＡＭＳ／ＡＤＡＭＴＳ（例えば、ＡＤＡＭ８、ＡＤＡＭ９、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭ１５、ＡＤＡＭ１７／ＴＡＣＥ、ＡＤＡＭＤＥＣ１、ＡＤＡＭＴＳ１、ＡＤＡＭＴＳ４、及び／またはＡＤＡＭＴＳ５）、カスパーゼ（例えば、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、及び／またはカスパーゼ－１４）、アスパラギン酸プロテアーゼ（例えば、ＲＡＣＥ及び／またはレニン）、アスパラギン酸カテプシン（例えば、カテプシンＤ及び／またはカテプシンＥ）、システインカテプシン（例えば、カテプシンＢ、カテプシンＣ、カテプシンＫ、カテプシンＬ、カテプシンＳ、カテプシンＶ／Ｌ２、及び／またはカテプシンＸ／Ｚ／Ｐ）、システインプロテイナーゼ（例えば、クルジパイン、レグマイン、及び／またはＯｔｕｂａｉｎ－２）、ＫＬＫ（例えば、ＫＬＫ４、ＫＬＫ５、ＫＬＫ６、ＫＬＫ７、ＫＬＫ８、ＫＬＫ１０、ＫＬＫ１１、ＫＬＫ１３、及び／またはＫＬＫ１４）、メタロプロテイナーゼ（例えば、メプリン、ネプリライシン、ＰＳＭＡ、及び／またはＢＭＰ－１）、セリンプロテアーゼ（例えば、活性化されたタンパク質Ｃ、カテプシンＡ、カテプシンＧ、キマーゼ、及び／または凝固因子プロテアーゼ（例えば、ＦＶＩＩａ、ＦＩＸａ、ＦＸａ、ＦＸＩａ、ＦＸＩＩａ））、エラスターゼ、グランザイムＢ、グアニジノベンゾアターゼ、ＨｔｒＡ１、ヒト好中球エラスターゼ、ラクトフェリン、マラプシン、ＮＳ３／４Ａ、ＰＡＣＥ４、ｔＰＡ、トリプターゼ、ＩＩ型膜貫通型セリンプロテアーゼ（ＴＴＳＰ）（例えば、ＤＥＳＣ１、ＤＰＰ－４、ＦＡＰ、ヘプシン、マトリプターゼ－２、ＭＴ－ＳＰ１／マトリプターゼ、ＴＭＰＲＳＳ２、ＴＭＰＲＳＳ３、及び／またはＴＭＰＲＳＳ４）などによって認識及び／または切断されたプロテアーゼ切断部位が含まれる。いくつかの実施形態では、第１のプロテアーゼ切断部位は、ｕＰＡ、ＭＭＰ－１、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－３、ＭＭＰ－８、ＭＭＰ－９、ＭＭＰ－１４、ＴＥＶプロテアーゼ、プラスミン、トロンビン、第Ｘ因子、ＰＳＡ、ＰＳＭＡ、カテプシンＤ、カテプシンＫ、カテプシンＳ、ＡＤＡＭ１０、ＡＤＡＭ１２、ＡＤＡＭＴＳ、カスパーゼ－１、カスパーゼ－２、カスパーゼ－３、カスパーゼ－４、カスパーゼ－５、カスパーゼ－６、カスパーゼ－７、カスパーゼ－８、カスパーゼ－９、カスパーゼ－１０、カスパーゼ－１１、カスパーゼ－１２、カスパーゼ－１３、カスパーゼ－１４、及びＴＡＣＥから選択されるプロテアーゼの切断部位である。いくつかの実施形態では、第１のプロテアーゼ切断部位は、ｕＰＡ、ＭＭＰ－２、ＭＭＰ－９、及び／またはＴＥＶプロテアーゼから選択されるプロテアーゼの切断部位である。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ切断は、ＳＧＲＳＡ（配列番号１３）、ＰＬＧＬＡＧ（配列番号１４）、及びＥＮＬＹＦＱＧ（配列番号１５）から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）と切断可能部分（ＣＭ）とを含むポリペプチドは、式（ＶＩＩＩ）：ＥＶＧＳＹ（Ｚ６）Ｃ（Ｚ６）Ｃ（Ｚ２）ＳＧＲＳＡ（配列番号４）に従うアミノ酸配列を含み、式中、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰから選択されるアミノ酸である。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）と切断可能部分（ＣＭ）とを含むポリペプチドは、式（ＩＸ）：ＥＶＧＳＹ（Ｚ６）Ｃ（Ｘ６）Ｃ（Ｚ２）ＳＧＲＳＡ（配列番号５）に従うアミノ酸配列を含み、式中、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）と切断可能部分（ＣＭ）とを含むポリペプチドは、式（Ｘ）：ＥＶＧＳＹ（Ｚ６）Ｃ（Ｚ８）Ｃ（Ｚ２）ＳＧＲＳＡ（配列番号６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰから選択されるアミノ酸である。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）と切断可能部分（ＣＭ）とを含むポリペプチドは、式（ＸＩ）：ＥＶＧＳＹ（Ｚ６）Ｃ（Ｘ８）Ｃ（Ｚ２）ＳＧＲＳＡ（配列番号７）に従うアミノ酸配列を含み、式中、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、切断可能部分（ＣＭ）は、第１のリンカー（$Ｌ_1$）をさらに含む。いくつかの実施形態では、第１のリンカー（$Ｌ_1$）は、第１の切断部位（$ＣＳ_1$）（例えば、第１のプロテアーゼ切断部位）のＣ末端にある。いくつかの実施形態では、切断可能部分（ＣＭ）は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、（$ＣＳ_1$）－$Ｌ_1$の構造を含む。

【０１３３】

例えば、グリシンポリマー（Ｇ）ｎ（式中、ｎは少なくとも１（例えば、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０など）の整数である）；ＧＧＧＧＳ（配列番号１７）、ＳＧＧＳ（配列番号１８）、ＧＧＳＧ（配列番号１９）、ＧＧＳＧＧ（配列番号２０）、ＧＳＧＳＧ（配列番号２１）、ＧＳＧＧＧ（配列番号２２）、ＧＧＧＳＧ（配列番号２３）、及び／またはＧＳＳＳＧ（配列番号２４）などのグリシン－セリンポリマー（ＧＳ）ｎ（式中、ｎは少なくとも１（例えば、少なくとも１、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０など）の整数である）；グリシンアラニンポリマー；アラニン－セリンポリマーなどを含む、当該技術分野で既知の任意の好適なリンカー（例えば、可撓性リンカー）を使用し得る。リンカー配列は、例えば、約１アミノ酸（例えば、グリシンまたはセリン）～約２０アミノ酸（例えば、２０アミノ酸のグリシンポリマーまたはグリシン－セリンポリマー）、約１アミノ酸～約１５アミノ酸、約３アミノ酸～約１２アミノ酸、約４アミノ酸～約１０アミノ酸、約５アミノ酸～約９アミノ酸、約６アミノ酸～約８アミノ酸などの任意の長さであり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、約１、２、３、４、５，６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０アミノ酸のいずれかの長さである。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号１７～２４から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列番号１７または１８のアミノ酸配列を含む。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、切断可能部分（ＣＭ）は、少なくとも第２の切断部位（例えば、少なくとも第２、少なくとも第３、少なくとも第４、少なくとも第５など）をさらに含む。いくつかの実施形態では、切断可能部分（ＣＭ）は、第２の切断部位（$ＣＳ_2$）をさらに含む。いくつかの実施形態では、第２の切断部位は、第２のプロテアーゼ切断部位である。第２のプロテアーゼ切断部位は、上記のプロテアーゼのいずれかによって認識及び／または切断される任意の好適なプロテアーゼ切断部位であり得る。いくつかの実施形

態では、第１（ＣＳ$_1$）及び第２（ＣＳ$_2$）の切断部位は、同じプロテアーゼによって認識及び／または切断されるプロテアーゼ切断部位である。いくつかの実施形態では、第１（ＣＳ$_1$）及び第２（ＣＳ$_2$）の切断部位は、異なるプロテアーゼによって認識及び／または切断されるプロテアーゼ切断部位である（例えば、第１のプロテアーゼ切断部位はｕＰＡによって認識及び／または切断され、第２のプロテアーゼ切断部位はＭＭＰ－２によって認識及び／または切断される；第１のプロテアーゼ切断部位はｕＰＡによって認識及び／または切断され、第２のプロテアーゼ切断部位はＭＭＰ－９によって認識及び／または切断される；第１のプロテアーゼ切断部位はｕＰＡによって認識及び／または切断され、第２のプロテアーゼ切断部位はＴＥＶプロテアーゼによって認識及び／または切断されるなど）。いくつかの実施形態では、少なくとも第２の切断部位（ＣＳ$_2$）は、第１のリンカー（Ｌ$_1$）のＣ末端にある。いくつかの実施形態では、切断可能部分（ＣＭ）は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、（ＣＳ$_1$）－Ｌ$_1$－（ＣＳ$_2$）の構造を含む。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、切断可能部分（ＣＭ）は、少なくとも第２のリンカー（例えば、少なくとも第２、少なくとも第３、少なくとも第４、少なくとも第５など）をさらに含む。いくつかの実施形態では、切断可能部分（ＣＭ）は、第２のリンカー（Ｌ$_2$）をさらに含む。第２のリンカー（Ｌ$_2$）は、上記の任意の好適なリンカーであり得る。いくつかの実施形態では、第２のリンカーは、配列番号１７～２４から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第１（Ｌ$_1$）及び第２（Ｌ$_2$）のリンカーは同じである（例えば、両方のリンカーが配列番号１７または１８の配列を含む）。いくつかの実施形態では、第１（Ｌ$_1$）及び第２（Ｌ$_2$）のリンカーは異なる（例えば、第１のリンカー（Ｌ$_1$）は配列番号１７のアミノ酸配列を含み、第２のリンカー（Ｌ$_2$）は配列番号１８のアミノ酸配列を含むなど）。いくつかの実施形態では、少なくとも第２のリンカー（Ｌ$_2$）は、第２の切断部位（ＣＳ$_2$）のＣ末端にある。いくつかの実施形態では、切断可能部分（ＣＭ）は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、（ＣＳ$_1$）－Ｌ$_1$－（ＣＳ$_2$）－Ｌ$_2$の構造を含む。

【０１３６】

例示的なＦＰ－ＣＭ配列

いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、（ＦＰ）－（ＰＣＳ$_1$）－Ｌ$_1$－（ＰＣＳ$_2$）－Ｌ$_2$の構造を含む。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、ＥＶＧＳＹＤＡＬＨＹＡＣＰＰＤＹＹＡＣＹＹＳＧＲＳＡＧＧＧＧＴＥＮＬＹＦＱＧＳＧＧＳ（配列番号２５）、ＥＶＧＳＹＮＳＹＨＡＹＣＰＨＰＬＹＰＣＴＡＳＧＲＳＡＧＧＧＧＴＥＮＬＹＦＱＧＳＧＧＳ（配列番号２６）、ＥＶＧＳＹＡＳＳＡＶＬＣＶＴＡＹＦＳＣＮＳＳＧＲＳＡＧＧＧＧＴＥＮＬＹＦＱＧＳＧＧＳ（配列番号２７）、ＥＶＧＳＹＮＦＶＡＤＳＣＰＤＨＰＹＰＣＳＡＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号２８）、ＥＶＧＳＹＮＦＶＡＤＳＣＰＤＨＰＹＰＣＳＡＳＧＲＳＡＧＧＧＧＴＥＮＬＹＦＱＧＳＧＧＳ（配列番号２９）、ＥＶＧＳＹＩＶＨＨＳＤＣＤＡＦＹＰＹＣＤＳＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３０）、ＥＶＧＳＹＩＶＨＨＳＤＣＤＡＦＹＰＹＣＤＳＳＧＲＳＡＧＧＧＧＴＥＮＬＹＦＱＧＳＧＧＳ（配列番号３１）、ＥＶＧＳＹＹＳＡＹＰＡＣＤＳＨＹＰＹＣＮＳＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３２）、ＥＶＧＳＹＹＳＡＹＰＡＣＤＳＨＹＰＹＣＮＳＳＧＲＳＡＧＧＧＧＴＥＮＬＹＦＱＧＳＧＧＳ（配列番号３３）、ＥＶＧＳＹＰＮＰＳＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３４）、ＥＶＧＳＹＰＮＰＳＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹＳＧＲＳＡＧＧＧＧＴＥＮＬＹＦＱＧＳＧＧＳ（配列番号３５）、ＥＶＧＳＹＹＳＡＹＰＡＣＤＳＨＹＰＹＣＱＳＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３６）、ＥＶＧＳＹＹＳＡＹＰＡＣＤＳＨＹＰＹＣＮＳＡＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３７）、ＥＶＧＳＹＰＱＰＳＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３８）、ＥＶＧＳＹＰＮＰＡＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３９）、ＥＶＧＳＹＰＴＤＬＤＡＣＡＤＡＰＮＨＣＨＦＳＧＲＳＡＧＧＧＧ

ＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号４０）、ＥＶＧＳＹＳＳＴＨＡＨＣＨＨＳＰＡＮＣＩＳＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号４１）、ＥＶＧＳＹＤＴＤＹＤＦＣＰＩＬＲＨＲＣＤＳＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号４２）、ＥＶＧＳＹＮＤＹＮＹＨＣＫＷＲＰＳＲＣＨＮＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号４３）、ＥＶＧＳＹＹＨＤＹＤＤＣＲＶＬＰＲＲＣＦＮＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号４４）、ＥＶＧＳＹＳＮＮＦＡＳＣＬＷＲＨＲＳＣＡＤＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号４５）、及び／またはＥＶＧＳＹＴＤＮＹＤＹＣＰＲＬＲＲＫＣＹＨＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号４６）のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、Ｎ末端からＣ末端にかけて、（ＦＰ）－（ＰＣＳ$_1$）－Ｌ$_1$－（ＰＣＳ$_2$）－Ｌ$_2$－（ＴＢＭ）の構造を含む。

【０１３７】

標的結合部分（ＴＢＭ）

いくつかの実施形態では、本開示は、標的結合部分（ＴＢＭ）を含む１つ以上のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド及び／またはポリヌクレオチドライブラリーに関する。いくつかの実施形態では、本開示は、標的結合部分（ＴＢＭ）を含む少なくとも１つのポリペプチドを含むポリペプチド及び／またはポリペプチドライブラリーに関する。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、抗体軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、抗体軽鎖可変領域及び抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体重鎖可変領域は、抗体軽鎖可変領域のＣ末端にある。いくつかの実施形態では、抗体軽鎖可変領域は、抗体重鎖可変領域のＣ末端にある。いくつかの実施形態では、本開示の標的結合部分（ＴＢＭ）は、例えば、ＣＴＬＡ４、ＣＤ１３７、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、Ｂ７－Ｈ３、ＯＸ４０、ＣＤ３、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ４０、ＣＤ９５、ＣＤ１２０ａ、ＢＴＬＡ、ＶＩＳＴＡ、ＩＣＯＳ、ＢＣＭＡ、Ｈｅｒ１、Ｈｅｒ２、Ｈｅｒ３、Ｂ７－Ｈ４を含む、任意の目的の標的に対する特異性を有する抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、完全長抗体軽鎖及び完全長抗体重鎖を含む。抗体軽鎖は、カッパまたはラムダ軽鎖であり得る。抗体重鎖は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、またはＩｇＤなどの任意のクラスであり得る。いくつかの実施形態では、抗体重鎖は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４サブクラスなどのＩｇＧクラスである。本明細書に記載の抗体重鎖は、当該技術分野で既知の方法を使用して、あるクラスまたはサブクラスから別のクラスまたはサブクラスに変換し得る。

【０１３９】

本明細書に記載の標的結合部分（ＴＢＭ）のうちのいずれか１つ以上は、ＨＶＲ配列（例えば、１つ、２つ、または３つの重鎖可変領域ＨＶＲ配列、及び／または１つ、２つ、または３つの軽鎖可変領域ＨＶＲ配列）、ＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＣＮ２０１７／０９８３３３号（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、ＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＣＮ２０１７／０９８２９９号（その全体を参照により本明細書に組み込まれる）、ＰＣＴ出願第ＰＣＴ／ＣＮ２０１７／０９８３３２号（その全体を参照により本明細書に組み込まれる）、及び／または同時に、代理人整理番号６９５４０－２０００５４０（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）として出願された、「Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ Ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ Ｃｒｏｓｓ－ｒｅａｃｔｉｖｅ Ａｎｔｉ－ＣＴＬＡ４ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｍａｋｉｎｇ ａｎｄ Ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ Ｓａｍｅ」と題するＰＣＴ出願に記載の抗体のいずれかの重鎖可変領域配列、及び／または軽鎖可変領域配列のいずれかを組み込んでもよい。

【０１４０】

本明細書に記載の標的結合部分（ＴＢＭ）のうちのいずれか１つ以上は、ＨＶＲ配列（例えば、重鎖可変領域ＨＶＲ配列のうちの１つ、２つ、または３つ、及び／もしくは軽鎖可変領域ＨＶＲ配列のうちの１つ、２つ、または３つ）、重鎖可変領域配列、及び／または本明細書に記載の抗体のいずれか（例えば、抗ＣＴＬＡ４抗体、抗ＣＤ１３７抗体）の軽鎖可変領域配列のいずれかを組み込んでもよい。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、ＨＶＲ、可変領域（ＶＬ、ＶＨ）、及び／または軽鎖及び重鎖（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ４）の特定のアミノ酸配列に関して記載される抗体を含む、本明細書に記載される抗ＣＴＬＡ４抗体のうちの１つ以上の配列を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、アミノ酸配列ＲＡＳＱＳＶＲＧＲＦＬＡ（配列番号６２）を含むＨＶＲ－Ｌ１、アミノ酸配列ＤＡＳＮＲＡＴＧＩ（配列番号６３）を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び／またはアミノ酸配列ＹＣＱＱＳＳＳＷＰＰＴ（配列番号６４）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、抗体軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、配列番号４８のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、アミノ酸配列ＹＳＩＳＳＧＹＨＷＳＷＩ（配列番号５９）を含むＨＶＲ－Ｈ１、アミノ酸配列ＬＡＲＩＤＷＤＤＤＫＹＹＳＴＳＬＫＳＲＬ（配列番号６０）を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び／またはアミノ酸配列ＡＲＳＹＶＹＦＤＹ（配列番号６１）を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、配列番号４７のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、ａ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＳＶＲＧＲＦＬＡ（配列番号６２）を含むＨＶＲ－Ｌ１、アミノ酸配列ＤＡＳＮＲＡＴＧＩ（配列番号６３）を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び／またはアミノ酸配列ＹＣＱＱＳＳＳＷＰＰＴ（配列番号６４）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、抗体軽鎖可変領域、ならびにｂ）アミノ酸配列ＹＳＩＳＳＧＹＨＷＳＷＩ（配列番号５９）を含むＨＶＲ－Ｈ１、アミノ酸配列ＬＡＲＩＤＷＤＤＤＫＹＹＳＴＳＬＫＳＲＬ（配列番号６０）を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び／またはアミノ酸配列ＡＲＳＹＶＹＦＤＹ（配列番号６１）を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、配列番号４８のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域、及び配列番号４７のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域を含む。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、ＨＶＲ、可変領域（ＶＬ、ＶＨ）、及び／または軽鎖及び重鎖（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ４）の特定のアミノ酸配列に関して記載される抗体を含む、本明細書に記載される抗ＣＤ１３７抗体のうちの１つ以上の配列を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、アミノ酸配列ＲＡＳＱＳＩＧＳＹＬＡ（配列番号６８）を含むＨＶＲ－Ｌ１、アミノ酸配列ＤＡＳＮＬＥＴＧＶ（配列番号６９）を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び／またはアミノ酸配列ＹＣＱＱＧＹＹＬＷＴ（配列番号７０）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、抗体軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、配列番号５０のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、アミノ酸配列ＦＳＬＳＴＧＧＶＧＶＧＷＩ（配列番号６５）を含むＨＶＲ－Ｈ１、アミノ酸配列ＬＡＬＩＤＷＡＤＤＫＹＹＳＰＳＬＫＳＲＬ（配列番号６６）を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び／またはアミノ酸配列ＡＲＧＧＳＤＴＶＩＧＤＷＦＡＹ（配列番号６７）を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、配列番号４９のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、ａ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＳＩＧＳＹＬＡ（配列番号６８）を含むＨＶＲ－Ｌ１、アミノ酸配列ＤＡＳＮＬＥＴＧＶ（配列番号６９）を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び／またはアミノ酸配列ＹＣＱＱＧＹＹＬＷＴ（配列番号７０）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、抗体軽鎖可変領域、ならびにｂ）アミノ酸配列ＦＳＬＳＴＧＧＶＧＶＧＷＩ（配列番号６５）を含むＨＶＲ－Ｈ１、アミノ酸配列ＬＡＬＩＤＷＡＤＤＫＹＹＳＰＳＬＫＳＲＬ（配列番号６６）を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び／またはアミノ酸配列ＡＲ

ＧＧＳＤＴＶＩＧＤＷＦＡＹ（配列番号６７）を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、抗体重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、標的結合部分（ＴＢＭ）は、配列番号５０のアミノ酸配列を含む抗体軽鎖可変領域、及び配列番号４９のアミノ酸配列を含む抗体重鎖可変領域を含む。

【０１４３】

Ｖ．ポリペプチド及びポリペプチドライブラリー

本開示の他の態様は、ポリヌクレオチド（例えば、本明細書に記載のポリペプチドのいずれか）及び／または、活性化可能抗体、その活性化可能抗原結合断片、または活性化可能抗体の誘導体を含む、１つ以上の活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、１つ以上の活性化可能抗体）のスクリーニング、特定、及び／または選択に有用なポリペプチドのライブラリーに関する。本開示のライブラリーは、本明細書に記載のポリペプチドのうちの１つ以上（例えば、１つ以上の活性化可能結合ポリペプチド）を含有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のライブラリーのポリペプチドのうちの１つ以上（すなわち、１つ、いくつか、またはすべて）は、抗原結合ドメイン（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のライブラリーのポリペプチドのうちの１つ以上（すなわち、１つ、いくつか、またはすべて）は、完全長抗体軽鎖及び／または重鎖（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のライブラリーのポリペプチドのうちの１つ以上（すなわち、１つ、いくつか、またはすべて）は、軽鎖及び／または重鎖Ｆａｂ断片（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のライブラリーのポリペプチドのうちの１つ以上（すなわち、１つ、いくつか、またはすべて）は、単鎖可変断片（複数可）（ｓｃＦｖ）を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、細胞表面（例えば、酵母または哺乳動物細胞提示）上で発現される。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチド（例えば、ライブラリー中の）は、（ａ）第１のペプチド（ＦＰ）と、（ｂ）切断可能部分（ＣＭ）と、（ｃ）標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含む。いくつかの実施形態では、ＦＰは、本明細書に記載の第１のペプチドのいずれか（例えば、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ））である。いくつかの実施形態では、ＦＰは、本明細書に記載の第１のペプチドのいずれか（例えば、式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹから選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ））である。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、ＣＭは、本明細書に記載の切断可能部分のいずれか（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位を含む切断可能部分（ＣＭ））である。いくつかの実施形態では、ＴＢＭは、本明細書に記載の標的結合部分のいずれか（例えば、抗体軽鎖可変領域及び／または抗体重鎖可変領域を含む、標的結合部分（ＴＢＭ））である。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメイン及び／または抗原結合ドメインを含むライブラリーが本明細書に提供され、抗原結合ドメインのうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、いくつか、またはすべて）は、本開示のポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインのうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、いくつか、またはすべて）は、Ｎ末端からＣ末端にわたり、（ａ）第１のペプチド（ＦＰ）（例えば、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群か

ら選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ））と、（ｂ）切断可能部分（例えば、少なくとも第１の切断部位を含む切断可能部分（ＣＭ））と、（ｃ）抗体軽鎖変領域を含む標的結合部分と、を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインのうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、いくつか、またはすべて）は、Ｎ末端からＣ末端にわたり、（ａ）第１のペプチド（ＦＰ）（例えば、式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ））と、（ｂ）切断可能部分（例えば、少なくとも第１の切断部位を含む切断可能部分（ＣＭ））と、（ｃ）抗体軽鎖可変領域を含む標的結合部分と、を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体重鎖可変領域をさらに含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインのうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、いくつか、またはすべて）は、Ｎ末端からＣ末端にわたり、（ａ）第１のペプチド（ＦＰ）（例えば、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ））と、（ｂ）切断可能部分（例えば、少なくとも第１の切断部位を含む切断可能部分（ＣＭ））と、（ｃ）抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分と、を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインのうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、いくつか、またはすべて）は、Ｎ末端からＣ末端にわたり、（ａ）第１のペプチド（ＦＰ）（例えば、式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ））と、（ｂ）切断可能部分（例えば、少なくとも第１の切断部位を含む切断可能部分（ＣＭ））と、（ｃ）抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分と、を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域をさらに含む。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドのいずれかを含む抗体断片またはｓｃＦｖが、本明細書にさらに提供される。いくつかの実施形態では、抗体断片またはｓｃＦｖは、抗体軽鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗体断片またはｓｃＦｖは、抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗体断片またはｓｃＦｖのライブラリーが本明細書に提供され、抗体断片またはｓｃＦｖのうちの少なくとも１つは、本明細書に記載のポリペプチドのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、抗体断片またはｓｃＦｖのうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、いくつか、またはすべて）は、抗体軽鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、抗体断片またはｓｃＦｖのうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、いくつか、またはすべて）は、抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドを含む。本明細書に記載の抗体断片及び／またはｃＦｖのうちの１つ以上をそれらの表面上で発現する細胞及び／または細胞のライブラリーが、本明細書にさらに提供される。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示のポリペプチドを含む抗体軽鎖に関する。

いくつかの実施形態では、抗体軽鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、（ａ）第１のペプチド（ＦＰ）（例えば、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０（例えば、３～１０）であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ））と、（ｂ）切断可能部分（例えば、少なくとも第１の切断部位を含む切断可能部分（ＣＭ））と、抗体軽鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、抗体軽鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、（ａ）第１のペプチド（ＦＰ）（例えば、式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ））と、（ｂ）切断可能部分（例えば、少なくとも第１の切断部位を含む切断可能部分（ＣＭ））と、抗体軽鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、本開示は、抗体軽鎖を含むライブラリーに関し、ライブラリー中の抗体軽鎖のうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、いくつか、またはすべて）は、上記のような抗体軽鎖である。いくつかの実施形態では、本開示は、抗体軽鎖及び抗体重鎖を含むライブラリーに関し、抗体軽鎖は、上記のような抗体軽鎖である。いくつかの実施形態では、抗体重鎖は、当該技術分野において既知の任意の抗体重鎖（本明細書に記載の抗体重鎖のいずれかを含む）である。いくつかの実施形態では、本開示は、抗体を含むライブラリーに関し、抗体のうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、いくつか、またはすべて）は、上記のような抗体である。

【０１４８】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示のポリペプチドを含む抗体重鎖に関する。いくつかの実施形態では、抗体重鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、（ａ）第１のペプチド（ＦＰ）（例えば、式（ＸＩＩＩ）：$X_mCX_nCX_o$（配列番号８６）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ））と、（ｂ）切断可能部分（例えば、少なくとも第１の切断部位を含む切断可能部分（ＣＭ））と、抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、抗体重鎖は、Ｎ末端からＣ末端にかけて、（ａ）第１のペプチド（ＦＰ）（例えば、式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である、第１のペプチド（ＦＰ））と、（ｂ）切断可能部分（例えば、少なくとも第１の切断部位を含む切断可能部分（ＣＭ））と、抗体重鎖可変領域を含む標的結合部分（ＴＢＭ）と、を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、本開示は、抗体重鎖を含むライブラリーに関し、ライブラリー中の抗体重鎖のうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、いくつか、またはすべて）は、上記のような抗体重鎖である。いくつかの実施形態では、本開示は、抗体重鎖及び抗体軽鎖を含むライブラリーに関し、抗体重鎖は、上記のような抗体重鎖である。いくつかの実施形態では、抗体軽鎖は、当該技術分野において既知の任意の抗体軽鎖（本明細書に記載の抗体軽鎖のいずれかを含む）である。いくつかの実施形態では、本開示は、抗体を含むライブラリーに関し、抗体のうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、いくつか、またはすべて）は、上記のような抗体である。

【０１４９】
本開示のポリペプチド（例えば、上記の抗体のいずれか）は、例えば、米国特許第４，８１６，５６７号に記載されるような組換え方法及び組成物を使用して産生され得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドのいずれか（例えば、上記の抗体のいずれか）をコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体（例えば、抗体の軽鎖及び／または重鎖）のV_Lを含むアミノ酸配列及び／またはV_Hを含むアミノ酸配列をコードすることができる。いくつかの実施形態では、このような核酸を含む１つ以上のベクター（例えば、発現ベクター）が、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。１つのこのような実施形態では、宿主細胞は、（１）V_Lを含む本開示のポリペプチドを含むアミノ酸配列及び／またはV_Hを含むアミノ酸配列（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体））をコードする核酸を含むベクター、（２）V_Hを含む本開示のポリペプチドを含むアミノ酸配列及び／またはV_Lを含むアミノ酸配列（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体））をコードする核酸を含むベクター、（３）V_Lを含む本開示のポリペプチドを含むアミノ酸をコードする核酸を含む第１のベクター及びV_Hを含む本開示のポリペプチドを含むアミノ酸（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体））をコードする核酸を含む第２のベクター、または（４）V_Hを含む本開示のポリペプチドを含むアミノ酸をコードする核酸を含む第１のベクター及びV_Lを含む本開示のポリペプチドを含むアミノ酸（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体））をコードする核酸を含む第２のベクターを含む（例えば、これらで形質転換されている）。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、酵母細胞、昆虫細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞またはリンパ系細胞（例えば、Ｙ０、ＮＳ０、Ｓｐ２０細胞）である。いくつかの実施形態では、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体））を作製する方法が提供され、本方法は、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体））をコードする核酸を含む葯主細胞を、ポリペプチドの発現に好適な条件下で培養することと、任意に、宿主細胞（または宿主細胞培養培地）からポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体））を回収することと、を含む。

【０１５０】
本開示のポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体））の組換え産生については、例えば上記のようなポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体））をコードする核酸が単離され、さらなるクローニング及び／または宿主細胞における発現のために、１つ以上のベクターに挿入される。このような核酸は、従来の手順を使用して（例えば、ポリペプチド（複数可）をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）、容易に単離及び配列決定することができる。

【０１５１】
ポリペプチドコード化（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）コード化）ベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞には、原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体））は、特にグリコシル化及びＦｃエフェクター機能が必要とされない場合、細菌中で産生され得る（例えば、（例えば、米国特許第５，６４８，２３７号、同第５，７８９，１９９号、及び同第５，８４０，５２３号を参照されたい：またＥ．ｃｏｌｉ中の抗体断片の発現を記載する、Ｃｈａｒｌｔｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２４８（Ｂ．Ｋ．Ｃ．Ｌｏ，ｅｄ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ，２００３），ｐｐ．２４５－２５４も参照されたい）。発現後に、ポリペプチドは、可溶性分画中の細菌細胞ペーストから単離されてもよく、さらに精製されてもよい。

【０１５２】

原核微生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核微生物は、ポリペプチドコード化（例えば、活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）コード化）ベクターのための好適なクローニングまたは発現宿主であり、これらには、そのグリコシル化経路が、「ヒト化され」ており、部分的または完全な人グリコシル化パターンを有するポリペプチドの産生をもたらす、真菌または酵母株が含まれる。Ｇｅｒｎｇｒｏｓｓ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２２：１４０９－１４１４（２００４）、及びＬｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２４：２１０－２１５（２００６）を参照されたい。

【０１５３】

グリコシル化ポリペプチドの発現に好適な宿主細胞は、多細胞性生物（無脊椎動物及び脊椎動物）にも由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。特にＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ　ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞とともに使用することができる多数のバキュロウイルス株が特定されている。

【０１５４】

植物細胞培養物もまた、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第５，９５９，１７７号、同第６，０４０，４９８号、同第６，４２０，５４８号、同第７，１２５，９７８号、及び同第６，４１７，４２９号（トランスジェニック植物において抗体を産生するためのＰＬＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ（商標）技術を記載する）を参照されたい。

【０１５５】

脊椎動物細胞も、宿主として使用されてもよい。例えば、懸濁液中で増殖するように適合されている哺乳動物細胞株は、有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－７）、ヒト胎児由来腎臓細胞株（例えば、Ｇｒａｈａｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ　Ｖｉｒｏｌ．３６：５９（１９７７）に記載される２９３または２９３細胞）、ベビーハムスター腎細胞（ＢＨＫ）、マウスセルトリ細胞（例えば、Ｍａｔｈｅｒ，Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．２３：２４３－２５１（１９８０）に記載されるＴＭ４細胞）、サル腎細胞（ＣＶ１）、アフリカミドリザル腎細胞（ＶＥＲＯ－７６）、ヒト子宮頚部癌細胞（ＨＥＬＡ）、イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ）、バッファローラット肝細胞（ＢＲＬ　３Ａ）、ヒト肺細胞（Ｗ１３８）、ヒト肝細胞（Ｈｅｐ　Ｇ２）、マウス乳腺腫瘍（ＭＭＴ　０６０５６２）、例えば、Ｍａｔｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎａｌｓ　Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３８３：４４－６８（１９８２）に記載されるＴＲＩ細胞、ＭＲＣ５細胞、及びＦＳ４細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞としては、ＤＨＦＲ－ＣＨＯ細胞を含む、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞（Ｕｒｌａｕｂ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７７：４２１６（１９８０））、及びＹ０、ＮＳ０ならびにＳｐ２／０などの骨髄腫細胞が挙げられる。抗体産生に好適なある特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Ｙａｚａｋｉ　ａｎｄ　Ｗｕ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２４８（Ｂ．Ｋ．Ｃ．Ｌｏ，ｅｄ．，Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ），ｐｐ．２５５－２６８（２００３）を参照されたい。

【０１５６】

ＶＩ．活性化可能結合ペプチド及びそれらの産生

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリヌクレオチド及び／またはポリペプチドライブラリーのいずれかからスクリーニングされ、特定され、及び／または選択された活性化可能結合ポリペプチド（例えば、活性化可能抗体）が、本明細書に提供される。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、本開示の活性化可能抗体は、状況依存性である（例えば、特定の状況（プロテアーゼに富む腫瘍微小環境など）において活性化される（それらの標的にのみ結合することができる））。いくつかの実施形態では、本開示の活性化可能抗体は、より伝統的な非活性化可能抗体よりも改善された安全性を提供する（例えば、毒性の低下を示し、多くの臓器の重量に有意な変化を誘導せず、肝臓病理組織学、血液学、及び／または血液生化学を変化させないなど）。いくつかの実施形態では、本開示の活性化可能

抗体は、より伝統的な非活性化可能抗体と比較して、改善された薬物動態特性（例えば、より長いインビボ半減期）を有する。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、本開示の活性化可能結合ポリペプチドは、（ａ）第１のペプチド（ＦＰ）（例えば、マスキング部分）と、（ｂ）切断可能部分と、（ｃ）標的結合部分と、を含む。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は活性化可能結合ドメインの標的結合部分（ＴＢＭ）に結合し、マスキング部分を欠く対応する結合ポリペプチドの結合と比較して、及び／または親抗体の結合と比較して、活性化可能結合部分のその標的（例えば、ヒトＣＴＬＡ４またはヒトＣＤ１３７）への結合を低減または阻害する。いくつかの実施形態では、マスキング部分（ＭＭ）は、活性化前に少なくとも約２．０（例えば、少なくとも約２．０、少なくとも約３．０、少なくとも約４．０、少なくとも約５．０、少なくとも約６．０、少なくとも約７．０、少なくとも約８．０、少なくとも約９．０、少なくとも約１０、少なくとも約２５、少なくとも約５０、少なくとも約７５、少なくとも約１００、少なくとも約１５０、少なくとも約２００、少なくとも約３００、少なくとも約４００、少なくとも約５００など）のマスキング効率を有する。いくつかの実施形態では、マスキング効率は、マスキング部分（ＭＭ）を欠くポリペプチドのその標的への結合に対する親和性と比較した、（活性化前の）マスキング部分を含む活性化可能抗体のその標的への結合に対する親和性における差異（例えば、マスキング部分（ＭＭ）を欠く親抗体と比較した、（活性化前の）マスキング部分（ＭＭ）を含む活性化可能抗体の標的抗原（ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７など）に対する親和性における差異、または活性化後の活性化可能抗体の標的抗原に対する親和性と比較した、（活性化前の）マスキング部分（ＭＭ）を含む活性化可能抗体の標的抗原（ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７など）に対する親和性における差異）によって測定される。いくつかの実施形態では、マスキング効率は、（活性化前の）マスキング部分（ＭＭ）を含む活性化可能抗体の結合のEC_{50}を、親抗体のEC_{50}で除算することによって測定される（例えば、ＥＬＩＳＡによってEC_{50}を測定することによって、例えば、実施例３の方法を参照）。いくつかの実施形態では、マスキング効率は、活性化後のマスキング部分（ＭＭ）を含む活性化可能抗体のその標的への結合に対する親和性と比較した、活性化前のマスキング部分（ＭＭ）を含む活性化可能抗体のその標的への結合に対する親和性における差異（例えば、活性化後の活性化可能抗体と比較した、活性化前の活性化可能抗体の標的抗原に対する親和性における差異）によって測定される。いくつかの実施形態では、マスキング部分（ＭＭ）は標的結合部分（ＴＢＭ）に結合し、活性化可能抗体がその標的（例えば、「不活性な」活性化可能抗体）に結合するのを防ぐ。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、「活性化可能な」結合ポリペプチドは、阻害され、マスキングされ、及び／または切断されていない状態である場合、標的への第１のレベルの結合を示し、阻害されていない、マスキングされていない、及び／または切断されている状態である場合、標的への第２のレベルの結合を示す、結合ポリペプチドを指し、第２のレベルの標的結合は、第１のレベルの標的結合より大きい。いくつかの実施形態では、活性化可能な結合ポリペプチドによる標的へのアクセスは、（例えば、１つ以上のプロテアーゼによる）切断可能部分内での切断後により増大する。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、一般的に、ポリペプチドの活性化前と比較して、ポリペプチドの活性化後（例えば、切断可能部分（ＣＭ）内を切断する１つ以上のプロテアーゼでの処理による活性化後、ｐＨの変化（上昇または低下）による活性化後、温度変化（上昇または低下）による活性化後、第２の分子（小分子など）との接触による活性化後など）に、ポリペプチドのその標的（例えば、ヒトＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７）への結合親和性が少なくとも約２倍（例えば、少なくとも約２倍、少なくとも約２．５倍、少なくとも約３倍、少なくとも約３．５倍、少なくとも約４倍、少なくとも約４．５倍、少なくとも約５倍、少なくとも約５．５倍、少なくとも約６倍、少なくとも

約６．５倍、少なくとも約７倍、少なくとも約７．５倍、少なくとも約８倍、少なくとも約８．５倍、少なくとも約９倍、少なくとも約９．５倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約５０倍、少なくとも約７５倍、少なくとも約１００倍、少なくとも約２５０倍、少なくとも約５００倍、少なくとも約７５０倍、または少なくとも約１０００倍以上）増加する場合、「活性化可能な」結合ポリペプチドであるとみなされる。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、一般的に、ポリペプチドのEC_{50}が、「活性化」後に少なくとも約２倍（例えば、少なくとも約２倍、少なくとも約２．５倍、少なくとも約３倍、少なくとも約３．５倍、少なくとも約４倍、少なくとも約４．５倍、少なくとも約５倍、少なくとも約５．５倍、少なくとも約６倍、少なくとも約６．５倍、少なくとも約７倍、少なくとも約７．５倍、少なくとも約８倍、少なくとも約８．５倍、少なくとも約９倍、少なくとも約９．５倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約５０倍、少なくとも約７５倍、少なくとも約１００倍、少なくとも約２５０倍、少なくとも約５００倍、少なくとも約７５０倍、または少なくとも約１０００倍以上）減少する場合（例えば、ＥＬＩＳＡまたはＦＡＣＳアッセイによって測定される場合；以下の実施例を参照）、「活性化可能」であるとみなされる。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、一般的に、ポリペプチドのEC_{50}が、切断可能部分内で切断するプロテアーゼでの処理後に少なくとも約２倍減少した場合（例えば、ＥＬＩＳＡまたはＦＡＣＳアッセイによって測定される場合；以下の実施例を参照）、「活性化可能」とみなされる。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、マスキング部分が活性化可能結合ポリペプチドの標的結合部分に結合している場合、活性化可能結合ポリペプチドのその標的に対するK_Dは、（例えば、活性化可能結合ポリペプチドの「活性化」後（例えば、切断可能部分内で切断するプロテアーゼ処理後）に）マスキング部分が標的結合部分に結合されていない場合よりも、及び／または親抗体の標的に対するK_Dよりも、約２倍以上（例えば、約２、約２．５、約３、約３．５、約４、約４．５、約５、約５．５、約６、約６．５、約７、約７．５、約８、約８．５、約９、約９．５、約１０、約２５、約５０、約７５、約１００、約２５０、約５００、約７５０、または約１０００以上）大きい。親和性を測定する方法は当該技術分野で既知であり、例えば、以下の実施例３に記載される方法を含む。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、マスキング部分が活性化可能結合ポリペプチドの標的結合部分に結合している場合、活性化可能結合ポリペプチドのその標的に対するK_Dは、（例えば、活性化可能結合ポリペプチドの「活性化」後（例えば、切断可能部分内で切断するプロテアーゼ処理後）に）マスキング部分が標的結合部分に結合していない場合と比較して、及び／または親抗体の標的に対するK_Dと比較して、少なくとも約２５％（例えば、少なくとも約２５％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％）減少する。親和性を測定する方法は当該技術分野で既知であり、例えば、以下の実施例３に記載される方法を含む。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、マスキング部分は、活性化可能結合ポリペプチドのその標的への結合を立体的に遮蔽する、及び／または活性化可能結合ポリペプチドのその標的への結合をアロステリックに遮蔽する。いくつかの実施形態では、マスキング部分は、活性化可能結合ポリペプチドの天然結合パートナーのアミノ酸配列を含まない。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、マスキング部分の標的結合部分に対する解離定数は、（活性な活性化型の場合）活性化可能結合ポリペプチドの標的に対する解離定数よりも大きい。いくつかの実施形態では、マスキング部分の標的結合部分に対する解離定数は、（活性化型の場合）活性化可能結合ポリペプチドの標的に対する解離定数よりも約２倍以上（例えば、約２、約２．５、約３、約３．５、約４、約４．５、約５、約５．５、約６、約６．

５、約７、約７．５、約８、約８．５、約９、約９．５、約１０、約２５、約５０、約７５、約１００、約２５０、約５００、約７５０、または約１０００倍以上）大きい。いくつかの実施形態では、マスキング部分の標的結合部分に対する解離定数は、（活性化された場合）活性化可能結合ポリペプチドの標的に対する解離定数にほぼ等しい。いくつかの実施形態では、第１のペプチド（ＦＰ）は、標的結合部分（ＴＢＭ）に結合し、ポリペプチドが活性化（例えば、切断可能部分（ＣＭ）内を切断する１つ以上のプロテアーゼでの処理によって活性化、ｐＨの変化（上昇または低下）によって活性化、温度変化（上昇または低下）によって活性化、第２の分子（小分子またはタンパク質リガンドなど）と接触した後に活性化など）された場合のみ、ポリペプチドがその標的に結合することを妨害する。いくつかの実施形態では、活性化は、切断部分内のポリペプチドの切断を誘導する。いくつかの実施形態では、活性化がポリペプチドの立体配座変化（例えば、第１のペプチド（ＦＰ）の転置）を誘導することにより、第１のペプチドがポリペプチドのその標的への結合をそれ以上妨げないようにする。

【０１６５】

本明細書に記載の活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）は、さらに修飾されてもよい。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、追加の分子実体に連結される。追加の分子実体の例には、医薬品、ペプチドまたはタンパク質、検出剤または標識、及び抗体が含まれる。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、本開示の活性化可能結合ポリペプチドは、医薬品に連結される。医薬品の例には、細胞傷害剤または他のがん治療剤、及び放射性同位元素が含まれる。細胞傷害剤の具体例としては、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭素エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルチシン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピュロマイシン、及びそれらの類似体または相同体が挙げられる。また、治療剤としては、例えば、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン、５－フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＳＮＵ）及びロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロトスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ、及びシス－ジクロロジアミンプラチナ（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン）、アントラシクリン（例えば、ダウノルビシン（以前のダウノマイシン）及びドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン（ＡＭＣ））、ならびに抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチン及びビンブラスチン）も挙げられる。診断的または治療的に使用するために抗体にコンジュゲートすることができる放射性同位元素の例としては、ヨウ素^{131}、インジウム^{111}、イットリウム^{90}、及びルテチウム^{177}が挙げられるが、これらに限定されない。ポリペプチドを医薬品に連結する方法は、様々なリンカー技術を使用するなどの方法が当該技術分野で知られている。リンカーの種類の例としては、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィド、及びペプチド含有リンカーが挙げられる。治療剤を抗体に連結するためのリンカー及び方法のさらなる考察については、例えば、Ｓａｉｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．５５：１９９－２１５（２００３）、Ｔｒａｉｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．５２：３２８－３３７（２００３）、Ｐａｙｎｅ，Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ３：２０７－２１２（２００３）、Ａｌｌｅｎ，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ ２：７５０－７６３（２００２）、Ｐａｓｔａｎ ａｎｄ Ｋｒｅｉｔｍａｎ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔｉｇ．Ｄｒｕｇｓ ３：１０８９－１０９１（２００２）、Ｓｅｎｔｅｒ ａｎｄ Ｓｐｒｉｎｇｅｒ（２００１）Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．５３：２４７－２６４を参照されたい。

【０１６７】
ＣＴＬＡ４を標的化する活性化可能結合ポリペプチド
いくつかの実施形態では、本開示は、活性化可能抗ＣＴＬＡ４抗体、活性化可能抗ＣＴＬＡ４抗体の抗原結合断片、及び／または活性化可能抗ＣＴＬＡ４抗体の誘導体を含むヒトＣＴＬＡ４に結合する活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）に関する。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、（ａ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドであって、ＭＭは、式（Ｉ）：$X_mCX_nCZ_o$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、ポリペプチドと、（ｂ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）と、を含む。いくつかの実施形態では、ｍは３～１０である。いくつかの実施形態では、ＭＭは、ＣＭが切断されていない場合、活性化可能抗体のヒトＣＴＬＡ４への結合を阻害する。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、ＣＭが切断されている場合、ヒトＣＴＬＡ４に結合することができる。いくつかの実施形態では、表Ａに列挙されているように、ＭＭは、配列番号７２～７８から選択されるアミノ酸配列を含む。

表Ａ．活性化可能抗体のマスキングペプチド配列

マスキングペプチド配列	配列番号
ＮＦＶＡＤＳＣＰＤＨＰＹＰＣＳＡ	配列番号７２
ＩＶＨＨＳＤＣＤＡＦＹＰＹＣＤＳ	配列番号７３
ＹＳＡＹＰＡＣＤＳＨＹＰＹＣＮＳ	配列番号７４
ＰＮＰＳＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹ	配列番号７５
ＹＳＡＹＰＡＣＤＳＨＹＰＹＣＱＳ	配列番号７６
ＰＱＰＳＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹ	配列番号７７
ＰＮＰＡＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹ	配列番号７８

【０１６８】
いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ＨＶＲ、可変領域（ＶＬ、ＶＨ）、ならびに／または軽鎖及び重鎖（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ４）の特定のアミノ酸配列に関して記載される抗体を含む、本明細書に記載の抗ＣＴＬＡ４抗体のいずれかを含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ４抗体は、ヒト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＴＬＡ４抗体は、ヒト化抗体、及び／またはキメラ抗体である。

【０１６９】
いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ａ）アミノ酸配列ＹＳＩＳＳＧＹＨＷＳＷＩ（配列番号５９）を含むＨＶＲ－Ｈ１、アミノ酸配列ＬＡＲＩＤＷＤＤＤＫＹＹＳＴＳＬＫＳＲＬ（配列番号６０）を含むＨＶＲ－Ｈ２、ならびにアミノ酸配列ＡＲＳＹＶＹＦＤＹ（配列番号６１）を含むＨＶＲ－Ｈ３、及び／またはｂ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＳＶＲＧＲＦＬＡ（配列番号６２）を含むＨＶＲ－Ｌ１、アミノ酸配列ＤＡＳＮＲＡＴＧＩ（配列番号６３）を含むＨＶＲ－Ｌ２、ならびにアミノ酸配列ＹＣＱＱＳＳＳＷＰＰＴ（配列番号６４）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ａ）配列番号４７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び／またはｂ）配列番号４８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、本開示は、活性型である場合に人ＣＴＬＡ４に結合し（例えば、活性化可能結合ポリペプチドは、切断可能部分における切断（例えば、１つ以上のプロテアーゼによる）後に活性であるが、切断可能部分における切断（例えば、１つ以上のプロテアーゼによる）前に不活性である）、以下の機能的特性：（ａ）ヒト、カニクイザル、マウス、ラット、及び／またはイヌＣＴＬＡ４に５００ｎＭ以下のK_Dで結合する、（ｂ）ヒトＣＴＬＡ４に対してアンタゴニスト活性を有する、（ｃ）１００ｎＭまでの濃度でヒトＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、Ｂ７－Ｈ３、ＣＤ９５、ＣＤ１２０ａ、ＯＸ４０、ＣＤ４０、ＢＴＬＡ、ＶＩＳＴＡ、ＩＣＯＳ、及び／またはＢ７－Ｈ４に結合しない、（ｄ）サル、マウス、ラット、及び／またはイヌＣＴＬＡ４と交差反応性である、（ｅ）（例えば、Ｔｒｅｇに対する）ＡＤＣＣ効果を誘導する、（ｆ）ヒトＰＢＭＣを活性化する（例えば、ＩＬ－２及び／またはＩＦＮγの分泌を刺激する）、（ｇ）腫瘍細胞の増殖を阻害することができる、（ｈ）がんに対する治療効果を有する、ならびに（ｉ）ヒトＣＴＬＡ４のヒトＣＤ８０及び／またヒトＣＤ８６への結合を阻害する、のうちの少なくとも１つ（例えば、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、少なくとも８つ、またはすべて９つ）を有する、活性化可能結合ポリペプチドに関する。また、ヒトＣＴＬＡ４への結合に関して、本明細書に記載のＣＴＬＡ４標的活性化可能結合ポリペプチド及び／または抗ＣＴＬＡ４抗体のうちの１つ以上と交差競合する１つ以上の活性化可能結合ポリペプチドも本明細書に提供される。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、不活性型である場合、ヒト、カニクイザル、マウス、ラット、及び／またはイヌＣＴＬＡ４に約５００ｎＭ以上のK_Dで結合する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、ヒト、カニクイザル、マウス、ラット、及び／またはイヌＣＴＬＡ４に約５００ｎＭ以下（例えば、約５００ｎＭ以下、約４５０ｎＭ以下、約４００ｎＭ以下、約３５０ｎＭ以下、約３００ｎＭ以下、約２５０ｎＭ以下、約２００ｎＭ以下、約１５０ｎＭ以下、約１００ｎＭ以下、約９０ｎＭ以下、約８０ｎＭ以下、約７０ｎＭ以下、約６０ｎＭ以下、約５０ｎＭ以下、約４０ｎＭ以下、約３０ｎＭ以下、約２５ｎＭ以下、約２０ｎＭ以下、約１０ｎＭ以下、約１ｎＭ以下、約０．１ｎＭ以下など）のK_Dで結合する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、ヒト、カニクイザル、マウス、ラット、及び／またはイヌＣＴＬＡ４に約３５０ｎＭ以下のK_Dで結合する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、ヒトＣＴＬＡ４に約１００ｎＭ以下のK_Dで結合する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、ヒトＣＴＬＡ４に約５０ｎＭ以下のK_Dで結合する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、ヒトＣＴＬＡ４に約１０ｎＭ以下のK_Dで結合する。活性化可能結合ポリペプチドのK_Dを測定する方法は、例えば、表面プラズモン共鳴、ＥＬＩＳＡ、等温滴定熱量測定、フィルター結合アッセイ、ＥＭＳＡなどによるものを含む、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、K_Dは、ＥＬＩＳＡによって測定される（例えば、以下の実施例３を参照されたい）。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、不活性型である場合、ヒトＣＴＬＡ４に対してアンタゴニスト活性を有しない。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、ヒトＣＴＬＡ４に対してアンタゴニスト活性を有する（例えば、ＡＤＣＣ効果を（例えば、Ｔｒｅｇｓに対して）誘導し、ＰＢＭＣを（例えば、ＩＬ－２及び／またはＩＦＮγ分泌を活性化、誘導、及び／または刺激することによって）活性化し、ヒトＣＴＬＡ４のヒトＣＤ８０及び／またはヒトＣＤ８６への結合を遮断するなど）。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、ヒトＣＴＬＡ４の１つ以上の活性を抑制する（例えば、ヒトＣＴＬＡ４を発現する細胞（例えば、ヒト細胞）が活性化された活性化可能結合ポリペプチドによって接

触されると、ヒトＣＴＬＡ４の１つ以上の活性を抑制する）。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、不活性型である場合、サル（例えば、カニクイザル）、マウス、ラット、及び／またはイヌＣＴＬＡ４と交差反応性ではない。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、サル（例えば、カニクイザル）、マウス、ラット、及び／またはイヌＣＴＬＡ４と交差反応性である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、サルＣＴＬＡ４と交差反応性である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、マウスＣＴＬＡ４と交差反応性である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、ラットＣＴＬＡ４と交差反応性である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、イヌＣＴＬＡ４と交差反応性である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、サル及びマウスＣＴＬＡ４；サル及びラットＣＴＬＡ４；サル及びイヌＣＴＬＡ４；マウス及びラットＣＴＬＡ４；マウス及びイヌＣＴＬＡ４；ラット及びイヌＣＴＬＡ４；サル、マウス、及びラットＣＴＬＡ４；サル、マウス、及びイヌＣＴＬＡ４；サル、ラット、及びイヌＣＴＬＡ４；マウス、ラット、及びイヌＣＴＬＡ４；またはサル、マウス、ラット、及びイヌＣＴＬＡ４と交差反応性である。いくつかの実施形態では、活性化可能な結合ポリペプチドは、活性型である場合、約３５０ｎＭ（例えば、約１ｎＭ、約１０ｎＭ、約２５ｎＭ、約５０ｎＭ、約７５ｎＭ、約１００ｎＭ、約１５０ｎＭ、約２００ｎＭ、約２５０ｎＭ、約３００ｎＭ、約３５０ｎＭ）で交差反応性である。交差反応性を測定する方法は当該技術分野で既知であり、表面プラズモン共鳴、ＥＬＩＳＡ、等温滴定熱量測定、フィルター結合アッセイ、ＥＭＳＡなどを含むが、これらに限定されない。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、不活性型である場合、（例えば、Ｔｒｅｇなどのヒト細胞に対して）ＡＤＣＣ効果を誘導しない。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、不活性型である場合、対照結合ポリペプチド（例えば、第１のペプチド（ＦＰ）及び切断可能部分（ＣＭ）を欠いている親抗体）と比較して（例えば、Ｔｒｅｇなどのヒト細胞に対して）ＡＤＣＣ効果を減少させる。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、活性型である場合、（例えば、Ｔｒｅｇなどの人細胞に対して）ＡＤＣＣ効果を誘導する。ＡＤＣＣ効果を測定する方法（例えば、インビトロ法）は当該技術分野で既知であり、以下の実施例４に記載される方法によるものを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、不活性型である場合、対照（例えば、第１のペプチド（ＦＰ）及び切断可能部分（ＣＭ）を欠いている親抗体）と比較して約１０％未満でＡＤＣＣ効果を誘導する（例えば、約１０％未満、約５％未満、約１％未満などでＡＤＣＣ効果を誘導する）。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、活性型である場合、対照（例えば、アイソタイプ対照）と比較して約１０％超でＡＤＣＣ効果を誘導する（例えば、約１０％超、約１５％超、約２０％超、約２５％超、約３０％超、約３５％超、約４０％超などでＡＤＣＣ効果を誘導する）。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、腫瘍細胞増殖（ｇｒｏｗｔｈ）及び／または増殖（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）を阻害することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞増殖（ｇｒｏｗｔｈ）及び／または増殖（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）は、活性化可能結合ポリペプチドと接触していない対応する腫瘍細胞と比較して（あるいはアイソタイプ対照抗体と接触している対応する腫瘍細胞と比較して）、活性化可能結合ポリペプチドと接触している場合、少なくとも約５％（例えば、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９９％）で阻害される。いくつかの実

施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、対象に活性化可能結合ポリペプチドが投与されると、対象の腫瘍体積を減少させることができる。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、対象における初期腫瘍体積と比較して（例えば、活性化可能結合ポリペプチドの投与前に、アイソタイプ対照抗体を投与された対象における対応する腫瘍と比較して）、少なくとも約５％（例えば、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９９％）で対象における腫瘍体積を減少させることができる。腫瘍細胞増殖（ｇｒｏｗｔｈ）／増殖（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）、腫瘍体積、及び／または腫瘍阻害をモニターする方法は当該技術分野で既知であり、例えば、以下の実施例４に記載される方法によるものを含む。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、がんに対して治療効果を有する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、がんの１つ以上の徴候または症状を軽減する。いくつかの実施形態では、がんに罹患している対象は、活性化可能結合ポリペプチドを投与されると、部分寛解または完全寛解する。

【０１７７】

いくつかの実施形態では、本開示は、活性型である場合、ヒトＣＴＬＡ４への結合に関して、ａ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号６０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号６１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、及び／またはｂ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号５４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む抗体と競合または交差競合する、単離された活性化可能結合ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、活性型である場合、ヒトＣＴＬＡ４への結合に関して、ａ）配列番号４７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び／またはｂ）配列番号４８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体と競合または交差競合する、単離された活性化可能結合ポリペプチドを提供する。抗体との結合に関して競合または交差競合する活性化可能結合ポリペプチドの能力は、ＢＩＡｃｏｒｅ分析、ＥＬＩＳＡアッセイ、またはフローサイトメトリーなどの当該技術分野で既知の標準的な結合アッセイを使用して決定することができる。例えば、（例えば、上記の）抗体が飽和条件下でヒトＣＴＬＡ４に結合することを可能にし、次いで、（活性型である場合の）試験活性化可能結合ポリペプチドのＣＴＬＡ４に結合する能力を測定することができる。試験活性化可能結合ポリペプチドが抗体と同時にＣＴＬＡ４に結合することができる場合、試験活性化可能結合ポリペプチドは抗体とは異なるエピトープに結合する。しかしながら、試験活性化可能結合ポリペプチドが同時にＣＴＬＡ４に結合することができない場合、試験活性化可能結合ポリペプチドは、同じエピトープ、重複するエピトープ、または抗体によって結合されたエピトープに非常に近接するエピトープに結合する。この実験は、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、ＦＡＣＳ、または表面プラズモン共鳴などの様々な方法を使用して実施することができる。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、（不活性型である場合、）ＣＴＬＡ４と１つ以上のその結合パートナー（例えば、ヒトＣＴＬＡ４及びヒトＣＤ８０、ヒトＣＴＬＡ４及びヒトＣＤ８６）との間の結合を阻害しない。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、（活性型である場合、）ＣＴＬＡ４と１つ以上のその結合パートナー（例えば、ヒトＣＴＬＡ４及びヒトＣＤ８０、ヒトＣＴＬＡ４及びヒトＣＤ８６）との間の結合を阻害する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ＣＴＬＡ４とそのリガンドとの間の結合をインビトロで阻害する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ＣＴＬＡ４のＣＤ８０及び／またはＣＤ８６への結合を阻害するための、約５００ｎＭ以下（例えば、約５００ｎＭ以下、約４００ｎＭ以下、約３００ｎＭ以下、約２００ｎＭ以下、約１００ｎＭ以下、約５０ｎＭ以下、約２５ｎＭ以下、約１０ｎＭ以下、約１ｎＭ以下など）の半数阻害濃度（IC_{50}）を有

する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ＣＴＬＡ４のＣＤ８０及び／またはＣＤ８６への結合を阻害するための、約１００ｎＭ以下の半数阻害濃度（$ＩＣ_{５０}$）を有する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、約１００ｎＭ以上（例えば、約１００ｎＭ以上、約５００ｎＭ以上、約１μＭ以上、約１０μＭ以上など）の濃度で提供された場合、ヒトＣＴＬＡ４のＣＤ８０及び／またはＣＤ８６への結合を完全に阻害する。本明細書で使用される場合、「完全な阻害」または「完全に阻害する」という用語は、第１のタンパク質と第２のタンパク質との間の結合を少なくとも約８０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９９％など）低減する活性化可能結合ポリペプチドの能力を指す。第１のタンパク質（例えば、ヒトＣＴＬＡ４）及び第２のタンパク質（例えば、ヒトＣＤ８０またはヒトＣＤ８６）の結合を阻害するポリペプチドの能力を測定する方法は、当該技術分野で既知であり、ＢＩＡｃｏｒｅ分析、ＥＬＩＳＡアッセイ、及びフローサイトメトリーによるものが含まれるが、これらに限定されない。

【０１７９】

ＣＤ１３７を標的化する活性化可能結合ポリペプチド

いくつかの実施形態では、本開示は、活性化可能抗ＣＤ１３７抗体、活性化可能抗ＣＤ１３７抗体の抗原結合断片、及び／または活性化可能抗ＣＤ１３７抗体の誘導体を含むヒトＣＤ１３７に結合する活性化可能結合ポリペプチド（すなわち、活性化可能抗体）に関する。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、（ａ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドであって、ＭＭは、式（Ｉ）：$Ｘ_{ｍ}ＣＸ_{ｎ}ＣＺ_{ｏ}$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、ポリペプチドと、（ｂ）抗体重鎖可変領域（ＶＨ）と、を含む。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、（ａ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドであって、ＭＭは、式（Ｉ）：$Ｘ_{ｍ}ＣＸ_{ｎ}ＣＺ_{ｏ}$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域（ＶＨ）を含む、ポリペプチドと、（ｂ）抗体重鎖可変領域（ＶＬ）と、を含む。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、（ａ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、マスキング部分（ＭＭ）、切断可能部分（ＣＭ）、及び標的結合部分（ＴＢＭ）を含むポリペプチドであって、ＭＭは、式（Ｉ）：$Ｘ_{ｍ}ＣＸ_{ｎ}ＣＺ_{ｏ}$（配列番号１）に従うアミノ酸配列を含み、式中、ｍは２～１０であり、ｎは３～１０であり、ｏは１～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸であり、ＣＭは、少なくとも第１の切断部位（例えば、少なくとも第１のプロテアーゼ切断部位）を含み、ＴＢＭは、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、ポリペプチドと、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）と、を含む。いくつかの実施形態では、ｍは２、３、４、５、６、７、８、９、または１０である。いくつかの実施形態では、ｎは３、４、５、６、７、８、９、または１０である。いくつかの実施形態では、ｏは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０である。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、ＭＭは、ＣＭが切断されていない場合、活性化可能抗体のヒトＣＤ１３７への結合を阻害する。いくつかの実施形態では、活性化可能抗体は、ＣＭが切断されている場合、ヒトＣＤ１３７に結合することができる。いくつかの実施形態では、表Ｂに列挙されているように、ＭＭは、配列番号７９～８５及び８８～９４から選択されるアミノ酸配列を含む。

表Ｂ．活性化可能抗体のマスキングペプチド配列

マスキングペプチド配列	配列番号
ＰＴＤＬＤＡＣＡＤＡＰＮＨＣＨＦ	配列番号７９
ＳＳＴＨＡＨＣＨＨＳＰＡＮＣＩＳ	配列番号８０
ＤＴＤＹＤＦＣＰＩＬＲＨＲＣＤＳ	配列番号８１
ＮＤＹＮＹＨＣＫＷＲＰＳＲＣＨＮ	配列番号８２
ＹＨＤＹＤＤＣＲＶＬＰＲＲＣＦＮ	配列番号８３
ＮＮＦＡＳＣＬＷＲＨＲＳＣＡＤ	配列番号８４
ＴＤＮＹＤＹＣＰＲＬＲＲＫＣＹＨ	配列番号８５
X_mＣＡＤＡＰＮＨＣＸＸ	配列番号８８
X_mＣＨＨＳＰＡＮＣＸＸ	配列番号８９
X_mＣＰＩＬＲＨＲＣＸＸ	配列番号９０
X_mＣＫＷＲＰＳＲＣＸＸ	配列番号９１
X_mＣＲＶＬＰＲＲＣＸＸ	配列番号９２
X_mＣＬＷＲＨＲＳＣＸＸ	配列番号９３
X_mＣＰＲＬＲＲＫＣＸＸ	配列番号９４

ｍは２～１０であり、各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸である。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ＨＶＲ、可変領域（ＶＬ、ＶＨ）、ならびに／または軽鎖及び重鎖（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ４）の特定のアミノ酸配列に関して記載される抗体を含む、本明細書に記載の抗ＣＤ１３７抗体のいずれかを含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ１３７抗体は、ヒト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ１３７抗体は、ヒト化抗体、及び／またはキメラ抗体である。

【０１８２】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ａ）アミノ酸配列ＦＳＬＳＴＧＧＶＧＶＧＷＩ（配列番号６５）を含むＨＶＲ－Ｈ１、アミノ酸配列　ＬＡＬＩＤＷＡＤＤＫＹＹＳＰＳＬＫＳＲＬ（配列番号６６）を含むＨＶＲ－Ｈ２、ならびにアミノ酸配列ＡＲＧＧＳＤＴＶＩＧＤＷＦＡＹ（配列番号６７）を含むＨＶＲ－Ｈ３、及び／またはｂ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＳＩＧＳＹＬＡ（配列番号６８）を含むＨＶＲ－Ｌ１、アミノ酸配列ＤＡＳＮＬＥＴＧＶ（配列番号６９）を含むＨＶＲ－Ｌ２、ならびにアミノ酸配列ＹＣＱＱＧＹＹＬＷＴ（配列番号７０）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ａ）配列番号４９のアミノ酸配列もしくは配列番号４９の配列に対して少なくとも９０％（例えば、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％）の配列同一性を有する配列を含む重鎖可変領域、及び／または配列番号５０のアミノ酸配列もしくは配列番号５０の配列対して少なくとも９０％（例えば、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％）の配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【０１８３】
いくつかの実施形態では、本開示は、活性型である場合に人ＣＤ１３７に結合し（例えば、活性化可能結合ポリペプチドは、切断可能部分における切断（例えば、１つ以上のプロテアーゼによる）後に活性であるが、切断可能部分における切断（例えば、１つ以上のプロテアーゼによる）前に不活性である）、以下の機能的特性：（ａ）ヒトＣＤ１３７に５００ｎＭ以下のK_Dで結合する、（ｂ）ヒトＣＤ１３７に対してアンタゴニスト活性を有する、（ｃ）１０００ｎＭまでの濃度でヒトＯＸ４０、ＣＤ４０、ＧＩＴＲ、及び／またはＣＤ２７受容体に結合しない、（ｄ）サル、マウス、ラット、及び／またはイヌＣＤ１３７と交差反応性である、（ｅ）ＡＤＣＣ効果を誘導しない、（ｆ）腫瘍細胞族色を阻害することができる、（ｇ）がんに対する治療効果を有する、ならびに（ｈ）ＣＤ１３７とＣＤ１３７Ｌとの間の結合を阻害する、のうちの少なくとも１つ（例えば、少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、少なくとも６つ、少なくとも７つ、またはすべて８つ）を有する、活性化可能結合ポリペプチドに関する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される活性化可能結合ポリペプチドはまた、ＣＤ１３７とそのリガンドのＣＤ１３７Ｌとの間の結合を阻害する、例えば、完全に阻害することができる。また、ヒトＣＤ１３７への結合に関して、本明細書に記載のＣＤ１３７標的活性化可能結合ポリペプチド及び／または抗ＣＤ１３７抗体のうちの１つ以上と交差競合する１つ以上の活性化可能結合ポリペプチド抗ＣＤ１３７抗体または抗原結合断片も本明細書に提供される。

【０１８４】
いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチド（不活性型である場合）は、ヒトＣＤ１３７に約５００ｎＭ以上のK_Dで結合する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチド（活性型である場合）は、ヒトＣＤ１３７に約５００ｎＭ以下（例えば、約５００ｎＭ以下、約４００ｎＭ以下、約３００ｎＭ以下、約２００ｎＭ以下、約１５０ｎＭ以下、約１００ｎＭ以下、約９０ｎＭ以下、約８０ｎＭ以下、約７５ｎＭ以下、約７０ｎＭ以下、約６０ｎＭ以下、約５０ｎＭ以下、約４０ｎＭ以下、約３０ｎＭ以下、約２５ｎＭ以下、約２０ｎＭ以下、約１０ｎＭ以下、約１ｎＭ以下、約０．１ｎＭ以下など）のK_Dで結合する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ヒトＣＤ１３７に約１００ｎＭ以下のK_Dで結合する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ヒトＣＤ１３７に約５０ｎＭ以下のK_Dで結合する。活性化可能結合ポリペプチドのK_Dを測定する方法は、例えば、表面プラズモン共鳴、ＥＬＩＳＡ、等温滴定熱量測定、フィルター結合アッセイ、ＥＭＳＡなどによるものを含む、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して実施することができる。いくつかの実施形態では、K_Dは、ＥＬＩＳＡによって測定される（例えば、以下の実施例５を参照されたい）。

【０１８５】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の活性化可能結合ポリペプチド（活性型である場合）は、ヒトＣＤ１３７に対してアゴニスト活性を有する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ヒトＣＤ１３７を発現する細胞（例えば、ヒト細胞）が、（活性な）活性化可能結合ポリペプチドによって接触されると、ヒトＣＤ１３７の１つ以上の（例えば、１つ以上、２つ以上、３つ以上など）活性を誘導する。様々なＣＤ１３７活性が当該技術分野において既知であり、これらには、ＮＦ－κＢ依存性転写の誘導、Ｔ細胞増殖の誘導、Ｔ細胞生存能の延長、活性化Ｔ細胞の共刺激、サイトカイン分泌（ＩＬ－２など）の誘導、及び単球活性化の誘導を挙げることができるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、１つ以上のＣＤ１３７の活性は、ＣＤ１３７のそのリガンドへの結合ではない。ＣＤ１３７活性（例えば、ＮＦ－κＢ依存性転写及び／またはＴ細胞増殖の誘導など）を測定する方法は、当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ヒトＣＤ１３７を発現する細胞（例えば、ヒト細胞）中でＮＦ－κＢ依存性転写を増加させる。いくつかの実施形態では、ＮＦ－κＢ依存性転写は、（活性な）活性化可能結合ポリペプチドと接触されたヒトＣＤ１３７を発現する細胞（例えば、ヒト細胞）中で、活性化可能結合ポリペプチドと接触されて

いない対応する細胞（例えば、アイソタイプコントロール抗体と接触された対応する細胞）、または不活性型である場合の活性化可能結合ポリペプチドと接触された対応する細胞と比べて、約１０％以上、約２０％以上、約３０％以上、約４０％以上、約５０％以上、約６０％以上、約７０％以上、約８０％以上、約９０％以上、または約９９％以上増加する。いくつかの実施形態では、ＮＦ－κＢ依存性転写は、活性化可能結合ポリペプチドと接触されたヒトＣＤ１３７を発現する細胞（例えば、ヒト細胞）中で、活性化可能結合ポリペプチドと接触されていない対応する細胞（例えば、アイソタイプコントロール抗体と接触された対応する細胞）、または不活性型である場合の活性化可能結合ポリペプチドと接触された対応する細胞と比べて、約２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１００倍、１０００倍以上増加する。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチド（不活性型である場合）は、サル（例えば、カニクイザル）、マウス、ラット、及び／またはイヌＣＤ１３７と交差反応性ではない。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチド（活性型である場合）は、サル（例えば、カニクイザル）、マウス、ラット、及び／またはイヌＣＤ１３７と交差反応性である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、サルＣＤ１３７と交差反応性である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、マウスＣＤ１３７と交差反応性である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ラットＣＤ１３７と交差反応性である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、イヌＣＤ１３７と交差反応性である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、サル及びマウスＣＤ１３７；サル及びラットＣＤ１３７；サル及びイヌＣＤ１３７；マウス及びラットＣＤ１３７；マウス及びイヌＣＤ１３７；ラット及びイヌＣＤ１３７；サル、マウス、及びラットＣＤ１３７；サル、マウス、及びイヌＣＤ１３７；サル、ラット、及びイヌＣＤ１３７；マウス、ラット、及びイヌＣＤ１３７；またはサル、マウス、ラット、及びイヌＣＤ１３７と交差反応性である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、約１００ｎＭ（例えば、約１ｎＭ、約１０ｎＭ、約２５ｎＭ、約５０ｎＭ、約７５ｎＭ、約１００ｎＭ）で交差反応性である。交差反応性を測定する方法は当該技術分野で既知であり、表面プラズモン共鳴、ＥＬＩＳＡ、等温滴定熱量測定、フィルター結合アッセイ、ＥＭＳＡなどを含むが、これらに限定されない。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ＡＤＣＣ効果を誘導しない。ＡＤＣＣ効果を測定する方法は、当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチド（活性型である場合）は、対照と比較してＡＤＣＣを約１０％を超えてもたらさない（ＡＤＣＣを約１０％超、約５％超、約１％超、約０．１％超、約０．０１％超誘導しない）。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、腫瘍細胞増殖（ｇｒｏｗｔｈ）及び／または増殖（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）を阻害することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞増殖（ｇｒｏｗｔｈ）及び／または増殖（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）は、活性化可能結合ポリペプチドと接触していない対応する腫瘍細胞と比較して（あるいはアイソタイプ対照抗体と接触している対応する腫瘍細胞と比較して）、活性化可能結合ポリペプチドと接触している場合、少なくとも約５％（例えば、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９９％）で阻害される。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、対象に活性化可能結合ポリペプチドが投与されると、対象の腫瘍体積を減少させることができる。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、対象における初期腫瘍体積と比較して（例えば、活性化可能結合ポリペプチドの投与前に、アイソタイプ対照抗体を投与された対象における対応する腫

瘍と比較して）、少なくとも約５％（例えば、少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、または少なくとも約９９％）で対象における腫瘍体積を減少させることができる。腫瘍細胞増殖（ｇｒｏｗｔｈ）／増殖（ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ）、腫瘍体積、及び／または腫瘍阻害をモニタリングする方法は、当該技術分野において既知である。

【０１８９】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、がんに対して治療効果を有する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、がんの１つ以上の徴候または症状を軽減する。いくつかの実施形態では、がんに罹患している対象は、活性化可能結合ポリペプチドを投与されると、部分寛解または完全寛解する。

【０１９０】

いくつかの実施形態では、本開示は、活性型である場合、ヒトＣＤ１３７への結合に関して、ａ）配列番号６５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号６６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、配列番号６７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３、及び／またはｂ）配列番号６８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号６９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号７０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む抗体と競合または交差競合する、単離された活性化可能結合ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、活性型である場合、ヒトＣＤ１３７への結合に関して、ａ）配列番号４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び／またはｂ）配列番号５０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体と競合または交差競合する、単離された活性化可能結合ポリペプチドを提供する。抗体との結合に関して競合または交差競合する活性化可能結合ポリペプチドの能力は、ＢＩＡｃｏｒｅ分析、ＥＬＩＳＡアッセイ、またはフローサイトメトリーなどの当該技術分野で既知の標準的な結合アッセイを使用して決定することができる。例えば、（例えば、上記の）抗体が飽和条件下でヒトＣＤ１３７に結合することを可能にし、次いで、（活性型である場合の）試験活性化可能結合ポリペプチドのＣＤ１３７に結合する能力を測定することができる。試験活性化可能結合ポリペプチドが抗体と同時にＣＤ１３７に結合することができる場合、試験活性化可能結合ポリペプチドは抗体とは異なるエピトープに結合する。しかしながら、試験活性化可能結合ポリペプチドが同時にＣＤ１３７に結合することができない場合、試験活性化可能結合ポリペプチドは、同じエピトープ、重複するエピトープ、または抗体によって結合されたエピトープに非常に近接するエピトープに結合する。この実験は、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、ＦＡＣＳ、または表面プラズモン共鳴などの様々な方法を使用して実施することができる。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチド（不活性型である場合）は、ＣＤ１３７とそのリガンド（例えば、ヒトＣＤ１３７及びヒトＣＤ１３７Ｌ）との間の結合を阻害しない。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチド（活性型である場合）は、ＣＤ１３７とそのリガンド（例えば、ヒトＣＤ１３７及びヒトＣＤ１３７Ｌ）との間の結合を阻害する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ＣＤ１３７とそのリガンドとの間の結合をインビトロで阻害する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチド（活性型である場合）は、ＣＤ１３７のそのリガンドへの結合を阻害するための、約５００ｎＭ以下（例えば、約５００ｎＭ以下、約４００ｎＭ以下、約３００ｎＭ以下、約２００ｎＭ以下、約１００ｎＭ以下、約５０ｎＭ以下、約２５ｎＭ以下、約１０ｎＭ以下、約１ｎＭ以下など）の半数阻害濃度（IC_{50}）を有する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、ＣＤ１３７のそのリガンドへの結合を阻害するための、約１００ｎＭ以下の半数阻害濃度（IC_{50}）を有する。いくつかの実施形態では、活性化可能結合ポリペプチドは、約１００ｎＭ以上（例えば、約１００ｎＭ以上、約５００ｎＭ以上、約１μＭ以上、約１０μＭ以上など）の濃度で提供された場合、ヒトＣＤ１３７のそのリガンドへの結合を完全に阻害する。第１のタンパク質（例えば、ＣＤ１３７）及び第２のタンパク質（例えば、ＣＤ１３７Ｌ）の結合を阻害する

ポリペプチドの能力を測定する方法は、当該技術分野で既知であり、ＢＩＡｃｏｒｅ分析、ＥＬＩＳＡアッセイ、及びフローサイトメトリーによるものが含まれるが、これらに限定されない。

【０１９２】

抗体

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の抗体（例えば、上記のＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）を含む活性化可能結合ポリペプチドに関する。本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＡ、またはＩｇＤなどの任意のクラスであり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４サブクラスなどのＩｇＧクラスである。本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）は、当該技術分野において既知の方法を使用して、あるクラスまたはサブクラスから別のクラスまたはサブクラスに変換することができる。所望のクラスまたはサブクラスの抗体を産生するための例示的な方法は、本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の重鎖をコードする核酸及び本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の軽鎖をコードする核酸を単離し、V_H領域をコードする配列を単離し、V_H配列を所望のクラスまたはサブクラスの重鎖定常領域をコードする配列に連結し、細胞内で軽鎖遺伝子及び重鎖構築物を発現させ、抗体を回収する工程を含む。

【０１９３】

抗原結合断片

いくつかの実施形態では、本開示は、抗原結合断片（例えば、本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の抗原結合断片）を含む活性化可能結合ポリペプチドに関する。

【０１９４】

抗原結合断片は、本明細書に記載される抗体のいずれかの任意の配列を含み得る。いくつかの実施形態では、抗原結合断片は、（１）本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の軽鎖、（２）本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の重鎖、（３）本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の軽鎖からの可変領域、（４）本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の重鎖からの可変領域、（５）本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の１つ以上のＨＶＲ（例えば、１、２、３、４、５、もしくは６つのＨＶＲ）、または（６）本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の軽鎖からの３つのＨＶＲ及び重鎖からの３つのＨＶＲのアミノ酸配列を含む。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸配列ＹＳＩＳＳＧＹＨＷＳＷＩ（配列番号５９）を含むＨＶＲ－Ｈ１、アミノ酸配列ＬＡＲＩＤＷＤＤＤＫＹＹＳＴＳＬＫＳＲＬ（配列番号６０）を含むＨＶＲ－Ｈ２、及びアミノ酸配列ＡＲＳＹＶＹＦＤＹ（配列番号６１）を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、重鎖可変領域、ならびに／またはアミノ酸配列ＲＡＳＱＳＶＲＧＲＦＬＡ（配列番号６２）を含むＨＶＲ－Ｌ１、アミノ酸配列ＤＡＳＮＲＡＴＧＩ（配列番号６３）を含むＨＶＲ－Ｌ２、及びアミノ酸配列ＹＣＱＱＳＳＳＷＰＰＴ（配列番号６４）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、軽鎖可変領域を含む、（ヒトＣＴＬＡ４に結合する）抗体の抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、ａ）配列番号４７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び／またはｂ）配列番号４８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、抗体の抗原結合断片を提供する。

【０１９６】

いくつかの実施形態では、本開示は、アミノ酸配列ＦＳＬＳＴＧＧＶＧＶＧＷＩ（配列番号６５）を含むＨＶＲ－Ｈ１、アミノ酸配列ＬＡＬＩＤＷＡＤＤＫＹＹＳＰＳＬＫＳＲＬ（配列番号６６）を含むＨＶＲ－Ｈ２、及びアミノ酸配列ＡＲＧＧＳＤＴＶＩＧＤＷＦ

ＡＹ（配列番号６７）を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、重鎖可変領域、ならびに／またはアミノ酸配列ＲＡＳＱＳＩＧＳＹＬＡ（配列番号６８）を含むＨＶＲ－Ｌ１、アミノ酸配列ＤＡＳＮＬＥＴＧＶ（配列番号６９）を含むＨＶＲ－Ｌ２、及びアミノ酸配列ＹＣＱＱＧＹＹＬＷＴ（配列番号７０）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、軽鎖可変領域を含む、（ヒトＣＤ１３７に結合する）抗体の抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、ａ）配列番号４９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び／またはｂ）配列番号５０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、抗体の抗原結合断片を提供する。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の抗原結合断片は、（ｉ）V_L、V_H、C_L、及びC_H1ドメインからなる一価の断片であるＦａｂ断片、（ｉｉ）ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂ断片を含む二価の断片であるＦ（ａｂ′）$_2$断片、（ｉｉｉ）V_H及びC_H1ドメインからなるＦｄ断片、（ｉｖ）抗体の単一アームのV_L及びV_HドメインからなるＦｖ断片、（ｖ）V_HドメインからなるｄＡｂ断片（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ ３４１：５４４－５４６）、（ｖｉ）単離されたＣＤＲ、ならびに（ｖｉｉ）抗体のV_H領域と連結した抗体のV_L領域を含むポリペプチドである一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）（例えば、Ｂｉｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３－４２６、Ｈｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５：５８７９－５８８３を参照）を含む。

【０１９８】

抗体誘導体

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の誘導体を含む活性化可能結合ポリペプチドを提供する。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、親抗体のアミノ酸配列の修飾に由来し、親抗体のアミノ酸配列の全体的な分子構造を保存する。親抗体鎖の任意の領域、例えばフレームワーク領域、ＨＶＲ領域、または定常領域のアミノ酸配列を修飾することができる。修飾の種類には、親抗体の１つ以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【０２００】

いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号４７～５０のいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも６５％、少なくとも７５％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるV_LまたはV_H領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号５９または６５のいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも６５％、少なくとも７５％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるＨＶＲ－Ｈ１アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号６０または６６のいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも６５％、少なくとも７５％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるＨＶＲ－Ｈ２アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号６１または６７のいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも６５％、少なくとも７５％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるＨＶＲ－Ｈ３アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号６２または６８のいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも６５％

、少なくとも７５％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるＨＶＲ－Ｌ１アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号６３または６９のいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも６５％、少なくとも７５％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるＨＶＲ－Ｌ２アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号６４または７０のいずれかに記載のアミノ酸配列と少なくとも６５％、少なくとも７５％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるＨＶＲ－Ｌ３アミノ酸配列領域を含む。

【０２０１】

いくつかの特定の実施形態では、誘導体は、本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）のアミノ酸配列に対する１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５個の保存的または非保存的置換、及び／または１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または１５個の付加及び／または欠失を含む。

【０２０２】

アミノ酸置換は、保存的置換及び非保存的置換の両方を包含する。「保存的アミノ酸置換」という用語は、２つのアミノ酸が極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、及び／または関連する残基の両親媒性などの特定の物理化学的特性において類似性を有する場合に、１つのアミノ酸を別のアミノ酸で置き換えることを意味する。例えば、典型的には、以下の群：（ａ）アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、及びメチオニンなどの非極性（疎水性）アミノ酸、（ｂ）グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンなどの極性中性アミノ酸、（ｃ）アルギニン、リジン、ヒスチジンなどの正に帯電した（塩基性）アミノ酸、（ｄ）アスパラギン酸及びグルタミン酸などの負に帯電した（酸性）アミノ酸のそれぞれの中で置換を行うことができる。

【０２０３】

修飾は、ＨＶＲ、フレームワーク領域、または定常領域を含む、抗体のアミノ酸配列の任意の位置でなされ得る。一実施形態では、本開示は、本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）のV_H及びV_LのＨＶＲ配列を含有するが、例示的な抗体のものとは異なるフレームワーク配列を含有する抗体誘導体を提供する。このようなフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公開ＤＮＡデータベースまたは公開された参考文献から取得することができる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の生殖系列ＤＮＡ配列は、Ｇｅｎｂａｎｋデータベースまたは「ＶＢａｓｅ」ヒト生殖系列配列データベースで見出すことができる（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１－３２４２（１９９１）、Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：７７６－７９８（１９９２）、及びＣｏｘ ｅｔ ａｌ．，ＥｕｒＪ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：８２７－８３６（１９９４））。抗体誘導体の構築において使用され得るフレームワーク配列には、本開示の例示的な抗体によって使用されるフレームワーク配列と構造的に類似しているものが含まれる。例えば、例示的な抗体のＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３配列、ならびにＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３配列は、フレームワーク配列が由来する生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子において見出されるものと同一の配列を有するフレームワーク領域に移植することができるか、あるい

はＨＶＲ配列は、生殖系列配列と比較して１つ以上の変異を含有するフレームワーク領域に移植することができる。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、本明細書に記載の例示的な抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）のアミノ酸配列を含むキメラ抗体である。一例では、１つ以上の例示的な抗体からの１つ以上のＨＶＲを、マウスまたはラットなどの非ヒト動物からの抗体からのＨＶＲと組み合わせる。別の例では、キメラ抗体のすべてのＨＶＲは、１つ以上の例示的な抗体に由来する。いくつかの特定の実施形態では、キメラ抗体は、例示的な抗体の重鎖可変領域からの１つ、２つ、もしくは３つのＨＶＲ、及び／または軽鎖可変領域からの１つ、２つ、もしくは３つのＨＶＲを含む。キメラ抗体は、当該技術分野で既知の従来的な方法を使用して生成することができる。

【０２０５】

別の種類の修飾は、V_H及び／またはV_L鎖のＨＶＲ領域内のアミノ酸残基を変異させることである。部位特異的変異誘発またはＰＣＲ媒介変異誘発を行って変異（複数可）を導入することができ、抗体結合または他の目的の機能的特性に対する効果を、当該技術分野で既知のインビトロまたはインビボアッセイで評価することができる。典型的には、保存的置換が導入される。変異は、アミノ酸付加及び／または欠失であり得る。さらに、典型的には、ＨＶＲ領域内の１つ、２つ、３つ、４つ、または５つ以下の残基が変更される。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、重鎖ＨＶＲ及び／または軽鎖ＨＶＲにおいて１つ、２つ、３つ、または４つのアミノ酸置換を含む。別の実施形態では、アミノ酸置換は、抗体中の１つ以上のシステインを別の残基、例えば、これらに限定されないが、アラニンまたはセリンに変更することである。システインは、標準または非標準のシステインであり得る。一実施形態では、抗体誘導体は、例示的な抗体のアミノ酸配列と比較して、重鎖ＨＶＲ領域に１、２、３、または４つの保存的アミノ酸置換を有する。

【０２０６】

また、V_H及び／またはV_L領域内のフレームワーク残基に修飾を加えることもできる。典型的には、そのようなフレームワークバリアントは、抗体の免疫原性を低下させるために作製されている。１つのアプローチは、１つ以上のフレームワーク残基を、対応する生殖系列配列に「復帰変異」させることである。体細胞変異を受けた抗体は、抗体が由来する生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含有し得る。そのような残基は、抗体フレームワーク配列を、抗体が由来する生殖系列配列と比較することによって特定することができる。フレームワーク領域配列をそれらの生殖系列構成に戻すために、例えば、部位特異的変異誘発またはＰＣＲ媒介変異誘発によって、体細胞変異を生殖系列配列に「復帰変異」させることができる。

【０２０７】

さらに、修飾はまた、例示的な抗体のＦｃ領域内でもなされ、典型的には、抗体の１つ以上の機能的特性、例えば、血清半減期、補体結合、Ｆｃ受容体結合、及び／または抗原依存性細胞傷害を変更し得る。一例では、ＣＨ１のヒンジ領域は、ヒンジ領域内のシステイン残基の数が変化するように、例えば、増加または減少するように改変される。このアプローチについては、米国特許第５，６７７，４２５号にさらに記載されている。ＣＨ１のヒンジ領域のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖及び重鎖の構築を容易にするため、または抗体の安定性を増加もしくは低下させるために変更される。別の場合では、抗体のＦｃヒンジ領域が変異して、抗体の生物学的半減期が減少する。

【０２０８】

さらに、本開示の抗体は、当該技術分野で既知の日常的な実験に従って、その潜在的なグリコシル化部位またはパターンを変更するために改変され得る。別の態様では、本開示は、可変領域におけるグリコシル化のパターンを変化させる、軽鎖または重鎖の可変領域における少なくとも１つの変異を含有する本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の誘導体を提供する。このような抗体誘導体は、抗原の結合に関して増加した親和性及び／改変された特異性を有し得る。変異は、Ｖ領域に新規のグリコシ

ル化部位を追加するか、１つ以上のＶ領域グリコシル化部位（複数可）の位置を変更するか、または既存のＶ領域グリコシル化部位を除去し得る。一実施形態では、本開示は、重鎖可変領域のアスパラギンに潜在的なＮ結合型グリコシル化部位を有する、本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の誘導体を提供し、１つの重鎖可変領域の潜在的なＮ結合型グリコシル化部位が除去される。別の実施形態では、本開示は、重鎖可変領域のアスパラギンに潜在的なＮ結合型グリコシル化部位を有する、本明細書に記載の抗体（例えば、ＣＴＬＡ４またはＣＤ１３７抗体）の誘導体を提供し、両方の重鎖可変領域の潜在的なＮ結合型グリコシル化部位が除去される。抗体のグリコシル化パターンを変更する方法は、当該技術分野で既知であり、その開示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第６，９３３，３６８号に記載されているものなどがある。

【０２０９】

本開示によって提供される他の抗体誘導体の例には、単鎖抗体、ダイアボディ、ドメイン抗体、ナノボディ、及びユニボディが含まれる。「単鎖抗体」（ｓｃＦｖ）は、V_Hドメインに連結されたV_Lドメインを含む単一のポリペプチド鎖からなり、V_Lドメイン及びV_Hドメインは対合して一価分子を形成する。一本鎖抗体は、当該技術分野で既知の方法に従って調製することができる（例えば、Ｂｉｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３－４２６、及びＨｕｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８５：５８７９－５８８３を参照）。「ダイアボディ」は２つの鎖からなり、各鎖は、短いペプチドリンカーによって接続された同じポリペプチド鎖上の軽鎖可変領域に接続された重鎖可変領域を含み、同じ鎖上の２つの領域は互いに対合しないが、他方の鎖上に相補的ドメインを有し、二重特異性分子を形成する。ダイアボディを調製する方法は、当該技術分野において既知である（例えば、Ｈｏｌｌｉｇｅｒ　Ｐ．ｅｔ　ａｌ．，（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：６４４４－６４４８、及びＰｏｌｊａｋ　Ｒ．Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，（１９９４）Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　２：１１２１－１１２３を参照）。ドメイン抗体（ｄＡｂ）は抗体の小さな機能的結合単位であり、抗体の重鎖または軽鎖のいずれかの可変領域に対応している。ドメイン抗体は、細菌、酵母、及び哺乳動物細胞系においてよく発現する。ドメイン抗体及びその産生方法のさらなる詳細は、当該技術分野で既知である（例えば、米国特許第６，２９１，１５８号、同第６，５８２，９１５号、同第６，５９３，０８１号、同第６，１７２，１９７号、同第６，６９６，２４５号、欧州特許第０３６８６８４号及び同第０６１６６４０号、ＷＯ０５／０３５５７２、ＷＯ０４／１０１７９０、ＷＯ０４／０８１０２６、ＷＯ０４／０５８８２１、ＷＯ０４／００３０１９、及びＷＯ０３／００２６０９を参照）。ナノボディは、抗体の重鎖に由来する。ナノボディは、典型的には、単一の可変ドメイン及び２つの定常ドメイン（ＣＨ２及びＣＨ３）を含み、元の抗体の抗原結合能力を保持する。ナノボディは、当該技術分野で既知の方法によって調製することができる（例えば、米国特許第６，７６５，０８７号、米国特許第６，８３８，２５４号、ＷＯ０６／０７９３７２を参照）。ユニボディは、ＩｇＧ４抗体の１つの軽鎖及び１つの重鎖からなる。ユニボディは、ＩｇＧ４抗体のヒンジ領域の除去により作製され得る。ユニボディ及びそれらを調製する方法のさらなる詳細は、ＷＯ２００７／０５９７８２に見出すことができる。

【０２１０】

ＶＩＩ．組成物

他の態様では、本開示は、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）のうちの１つ以上を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物である。組成物は、当該技術分野で既知の従来的な方法によって調製することができる。

【０２１１】

「薬学的に許容される担体」という用語は、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）の送達のための製剤における使用に好適な任意の不活性物質を指す。担体は

、付着防止剤、結合剤、コーティング、崩壊剤、充填剤または希釈剤、保存剤（抗酸化剤、抗菌剤、または抗真菌剤など）、甘味料、吸収遅延剤、湿潤剤、乳化剤、緩衝剤などであり得る。好適な薬学的に許容される担体の例としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、ブドウ糖、植物油（オリーブオイルなど）、生理食塩水、緩衝液、緩衝生理食塩水、ならびに糖類、多価アルコール、ソルビトール、及び塩化ナトリウムなどの等張剤が挙げられる。

【０２１２】

組成物は、液体、半固体、及び固体剤形などの任意の好適な形態であり得る。液体剤形の例としては、溶液（例えば、注射及び注入可能な溶液）、マイクロエマルジョン、リポソーム、分散液、または懸濁液が挙げられる。固体剤形の例としては、錠剤、丸剤、カプセル、マイクロカプセル、及び散剤が挙げられる。ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）を送達するのに好適な組成物の特定の形態は、注射もしくは注入のための溶液、懸濁液、または分散液などの滅菌液体である。滅菌溶液は、適切な担体中に必要量のポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）を組み込み、続いて滅菌精密濾過することによって調製することができる。分散液は、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）を、基本的な分散媒及び他の担体を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌液体の調製のための滅菌散剤の場合、調製方法は、活性成分に、その事前に滅菌濾過された溶液からの任意の追加の所望の成分を添加した散剤を得るための、真空乾燥及びフリーズドライ（凍結乾燥）を含む。組成物の様々な剤形は、当該技術分野で既知の従来的な技法によって調製することができる。

【０２１３】

組成物中に含まれるポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）の相対量は、使用される特定のポリペプチド及び担体、剤形、ならびに所望の放出及び薬力学的特性などの多くの要因に応じて異なるであろう。単一剤形中のポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）の量は、一般的に治療効果をもたらす量であるが、より少ない量であってもよい。一般的に、この量は、剤形の総重量に対して、約０．０１パーセント～約９９パーセント、約０．１パーセント～約７０パーセント、または約１パーセント～約３０パーセントの範囲である。

【０２１４】

ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）に加えて、１つ以上の追加の治療剤を組成物に含めることができる。追加の治療剤の例は、本明細書において以下に記載される。組成物中に含まれるべき追加の治療剤の好適な量は、当業者によって容易に選択することができ、使用される特定の薬剤及び担体、剤形、ならびに所望の放出及び薬力学的特性などの多くの要因に応じて異なるであろう。単一剤形に含まれる追加の治療剤の量は、一般的に治療効果をもたらす薬剤の量であるが、より少ない量であってもよい。

【０２１５】

本明細書に記載のポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）及び／または組成物（例えば、医薬組成物）のいずれかを、医薬品（例えば、がんの治療またはがんの進行の遅延を必要とする対象においてそれを行う際に使用するための医薬品）の調製において使用することができる。

【０２１６】

ＶＩＩＩ．活性化可能結合ポリペプチド及び医薬組成物の使用

本開示により提供されるポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）及び医薬組成物は、治療、診断、または他の目的、例えば、免疫応答の調節、がんの治療、他のがん療法の効果の増強、ワクチン効果の増強、または自己免疫疾患の治療に有用である。したがって、他の態様では、本開示は、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）またはその医薬組成物を使用する方法を提供する。一態様では、本開示は、哺乳動物における障害を治療する方法を提供し、治療を必要とする哺乳動物に有効量の本開示により提供されるポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）またはその組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ＣＴＬＡ４（例えば

、ヒトＣＴＬＡ４）またはＣＤ１３７（例えば、ヒトＣＤ１３７）に結合する活性化可能結合ポリペプチドであり、哺乳動物はヒトである。いくつかの実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【０２１７】

いくつかの実施形態では、障害はがんである。本開示により提供される方法、使用、または医薬品を用いて、様々ながんを治療または予防することができる。そのようながんの例としては、気管支原性癌（例えば、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌、及び腺癌）、肺胞上皮癌、気管支腺腫、軟骨性過誤腫（非がん性）、及び肉腫（がん性）などの肺癌；粘液腫、線維腫、及び横紋筋腫などの心臓癌；骨軟骨腫、コンドロマ、軟骨芽細胞腫、軟骨粘液性線維腫、類骨骨腫、巨細胞腫瘍、軟骨肉腫、多発性骨髄腫、骨肉腫、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、ユーイング腫瘍（ユーイング肉腫）、及び細網細胞肉腫などの骨癌；神経膠腫（例えば、多形神経膠芽腫）、退形成性星細胞腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、髄芽腫、脊索腫、神経鞘腫、上衣腫、髄膜腫、下垂体腺腫、松果体腫、骨腫、血管芽腫、頭蓋咽頭腫、脊索腫、胚細胞腫、奇形腫、類皮嚢胞、及び血管腫などの脳癌；平滑筋腫、類表皮癌、腺癌、平滑筋肉腫、胃腺癌、腸脂肪腫、腸神経線維腫、腸線維腫、大腸ポリープ、及び結腸直腸癌などの消化器系におけるがん；肝細胞腺腫、血管腫、肝細胞癌、線維層板型癌、胆管癌、肝芽腫、及び血管肉腫などの肝臓癌；腎腺癌、腎細胞癌、腎機能亢進症、及び腎盂移行細胞癌などの腎臓癌；膀胱癌；急性リンパ性（リンパ芽球性）白血病、急性骨髄性（骨髄球性、骨髄性、骨髄芽球性、骨髄単球性）白血病、慢性リンパ性白血病（例えば、セザリー症候群及び有毛細胞白血病）、慢性骨髄性（骨髄様、骨髄性、顆粒球性）白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、Ｂ細胞リンパ腫、菌状息肉腫、及び骨髄増殖性疾患（真性多血症、骨髄線維症、血小板血症、及び慢性骨髄性白血病などの骨髄増殖性疾患を含む）などの血液癌；基底細胞癌、扁平上皮癌、黒色腫、カポジ肉腫、及びパジェット病などの皮膚癌；頭頸部癌；網膜芽細胞腫及び眼球内黒色腫などの眼に関連するがん；良性前立腺肥大、前立腺癌、及び精巣癌（例えば、精上皮腫、奇形腫、胚性癌腫、及び絨毛癌）などの男性生殖器系癌；乳癌；子宮癌（子宮内膜癌）、子宮頸癌（子宮頸癌腫）、卵巣癌（卵巣癌腫）、外陰癌、膣癌、卵管癌、及び胞状奇胎などの女性生殖器系癌；甲状腺癌（乳頭癌、濾胞癌、未分化癌、または髄様癌を含む）；褐色細胞腫（副腎）；副甲状腺の非がん性増殖；膵臓癌；ならびに白血病、骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、及びホジキンリンパ腫などの血液癌が挙げられる。

【０２１８】

別の態様では、本開示は、哺乳動物における免疫応答を強化する方法を提供し、哺乳動物に有効量の本開示により提供されるポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）またはその組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、ＣＴＬＡ４（例えば、ヒトＣＴＬＡ４）またはＣＤ１３７（例えば、ヒトＣＤ１３７）に結合する活性化可能結合ポリペプチドであり、哺乳動物はヒトである。用語「免疫応答の強化」またはその文法的バリエーションは、哺乳動物の免疫系の任意の応答を刺激、誘発、増加、改善、または増強することを意味する。免疫応答は、細胞応答（すなわち、細胞傷害性Ｔリンパ球媒介型などの細胞媒介型）、または体液性応答（すなわち、抗体媒介型）であり得、一次またはニ次免疫応答であり得る。免疫応答の強化の例としては、ＰＢＭＣ及び／またはＴ細胞の活性化（ＩＬ－２及び／またはＩＦＮγなどの１つ以上のサイトカインの分泌の増加を含む）が挙げられる。免疫応答の強化は、細胞傷害性Ｔリンパ球アッセイ、サイトカインの放出、腫瘍の退縮、腫瘍担持動物の生存、抗体産生、免疫細胞増殖、細胞表面マーカーの発現、及び細胞傷害活性を含むが、これらに限定されない、当業者に既知の多くのインビトロまたはインビボ測定を使用して評価することができる。典型的には、本開示の方法は、未治療の哺乳動物、または引用される方法を使用して治療されていない哺乳動物による免疫応答と比較した場合の、哺乳動物による免疫応答を強化する。

【０２１９】

治療法の実施において、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）は、単

独療法として単独で投与されてもよく、または１つ以上の追加の治療剤もしくは療法と組み合わせて投与されてもよい。したがって、別の態様では、本開示は、別個の、連続した、または同時投与のための１つ以上の追加の療法または治療剤と組み合わせたポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）を含む併用療法を提供する。「追加の治療剤」という用語は、本開示によって提供されるポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）以外の任意の治療剤を指し得る。ある特定の態様では、本開示は、哺乳動物におけるがんを治療するための併用療法を提供し、哺乳動物に有効量の本明細書に提供されるポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）を１つ以上の追加の治療剤と組み合わせて投与することを含む。さらなる実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【０２２０】

多種多様ながん治療剤は、本開示によって提供されるポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）と組み合わせて使用し得る。当業者は、本開示の方法及びポリペプチドと組み合わせて使用することができる他のがん療法の存在及び開発を認識し、本明細書に記載されている療法の形態に制限されないであろう。がんを治療するための併用療法において使用され得る追加の治療剤のカテゴリーの例には、（１）化学療法剤、（２）免疫療法剤、及び（３）ホルモン治療剤が含まれる。いくつかの実施形態では、追加の治療剤は、ウイルス遺伝子治療、免疫チェックポイント阻害剤、標的療法、放射線療法、及び／または化学療法である。

【０２２１】

「化学療法剤」という用語は、がん細胞の死滅を引き起こす、またはがん細胞の増殖、分裂、修復、及び／または機能を妨害することができる化学的または生物学的物質を指す。化学療法剤の例としては、ＷＯ２００６／１２９１６３、及びＵＳ２００６０１５３８０８に開示されているものが挙げられ、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。特定の化学療法剤の例としては、（１）クロラムブシル（ＬＥＵＫＥＲＡＮ）、シクロホスファミド（ＣＹＴＯＸＡＮ）、イホスファミド（ＩＦＥＸ）、塩酸メクロレタミン（ＭＵＳＴＡＲＧＥＮ）、チオテパ（ＴＨＩＯＰＬＥＸ）、ストレプトゾトシン（ＺＡＮＯＳＡＲ）、カルムスチン（ＢＩＣＮＵ、ＧＬＩＡＤＥＬ　ＷＡＦＥＲ）、ロムスチン（ＣＥＥＮＵ）、及びダカルバジン（ＤＴＩＣ－ＤＯＭＥ）などのアルキル化剤、（２）ドキソルビシン（ＡＤＲＩＡＭＹＣＩＮ）、エピルビシン（ＥＬＬＥＮＣＥ、ＰＨＡＲＭＯＲＵＢＩＣＩＮ）、ダウノルビシン（ＣＥＲＵＢＩＤＩＮＥ、ＤＡＵＮＯＸＯＭＥ）、ネモルビシン、イダルビシン（ＩＤＡＭＹＣＩＮ　ＰＦＳ、ＺＡＶＥＤＯＳ）、ミトキサントロン（ＤＨＡＤ、ＮＯＶＡＮＴＲＯＮＥ）、ダクチノマイシン（アクチノマイシンＤ、ＣＯＳＭＥＧＥＮ）、プリカマイシン（ＭＩＴＨＲＡＣＩＮ）、マイトマイシン（ＭＵＴＡＭＹＣＩＮ）、及びブレオマイシン（ＢＬＥＮＯＸＡＮＥ）、酒石酸ビノレルビン（ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ）、ビンブラスチン（ＶＥＬＢＡＮ）、ビンクリスチン（ＯＮＣＯＶＩＮ）、及びビンデシン（ＥＬＤＩＳＩＮＥ）などの細胞毒性抗生物質を含む、アルカロイドまたは植物ビンカアルカロイド、（３）カペシタビン（ＸＥＬＯＤＡ）、シタラビン（ＣＹＴＯＳＡＲ－Ｕ）、フルダラビン（ＦＬＵＤＡＲＡ）、ゲムシタビン（ＧＥＭＺＡＲ）、ヒドロキシウレア（ＨＹＤＲＡ）、メトトレキサート（ＦＯＬＥＸ、ＭＥＸＡＴＥ、ＴＲＥＸＡＬＬ）、ネララビン（ＡＲＲＡＮＯＮ）、トリメトレキサート（ＮＥＵＴＲＥＸＩＮ）、及びペメトレキセド（ＡＬＩＭＴＡ）などの代謝拮抗物質、（４）５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、カペシタビン（ＸＥＬＯＤＡ）、ラルチトレキセド（ＴＯＭＵＤＥＸ）、テガフール・ウラシル（ＵＦＴＯＲＡＬ）、及びゲムシタビン（ＧＥＭＺＡＲ）などのピリミジンアンタゴニスト、（５）ドセタキセル（ＴＡＸＯＴＥＲＥ）、パクリタキセル（ＴＡＸＯＬ）などのタキサン、（６）シスプラチン（ＰＬＡＴＩＮＯＬ）及びカルボプラチン（ＰＡＲＡＰＬＡＴＩＮ）、及びオキサリプラチン（ＥＬＯＸＡＴＩＮ）などのプラチナ剤、（７）イリノテカン（ＣＡＭＰＴＯＳＡＲ）、トポテカン（ＨＹＣＡＭＴＩＮ）、エトポシド（ＥＴＯＰＯＰＨＯＳ、ＶＥＰＥＳＳＩＤ、ＴＯＰＯＳＡＲ）、及びテニポシド（ＶＵＭＯＮ）などのトポイソメラーゼ阻害剤、（８）エトポシド（ＥＴＯＰＯＰＨＯＳ、ＶＥＰＥＳＳＩＤ、ＴＯＰＯＳＡＲ）などのエピポドフィロトキシン（

ポドフィロトキシン誘導体）、（９）ロイコボリン（ＷＥＬＬＣＯＶＯＲＩＮ）などの葉酸誘導体、（１０）カルムスチン（ＢｉＣＮＵ）、ロムスチン（ＣｅｅＮＵ）などのニトロソウレア、（１１）ゲフィチニブ（ＩＲＥＳＳＡ）、エルロチニブ（ＴＡＲＣＥＶＡ）、ボルテゾミブ（ＶＥＬＣＡＤＥ）、メシル酸イマチニブ（ＧＬＥＥＶＥＣ）、ゲネフィチニブ、ラパチニブ、ソラフェニブ、サリドマイド、スニチニブ（ＳＵＴＥＮＴ）、アキシチニブ、リツキシマブ（ＲＩＴＵＸＡＮ、ＭＡＢＴＨＥＲＡ）、トラスツズマブ（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ）、セツキシマブ（ＥＲＢＩＴＵＸ）、ベバシズマブ（ＡＶＡＳＴＩＮ）、及びラニビズマブ（ＬＵＣＥＮＴＩＳ）、ｌｙｍ－１（ＯＮＣＯＬＹＭ）、ＷＯ２００２／０５３５９６に記載のインスリン様増殖因子－１受容体（ＩＧＦ－１Ｒ）に対する抗体などの上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ）、インスリン受容体、インスリン様増殖因子受容体（ＩＧＦＲ）、肝細胞増殖因子受容体（ＨＧＦＲ）、及び血小板由来増殖因子受容体（ＰＤＧＦＲ）を含む、受容体型チロシンキナーゼ、（１２）ベバシズマブ（ＡＶＡＳＴＩＮ）、スラミン（ＧＥＲＭＡＮＩＮ）、アンジオスタチン、ＳＵ５４１６、サリドマイドなどの血管新生阻害剤、及びマトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤（バチマスタット及びマリマスタットなど）、及びＷＯ２００２０５５１０６に記載されているもの、ならびに（１３）ボルテゾミブ（ＶＥＬＣＡＤＥ）などのプロテアソーム阻害剤が挙げられる。

【０２２２】

「免疫療法剤」という用語は、哺乳動物の免疫応答を強化することができる化学的または生物学的物質を指す。免疫療法剤の例としては、カルメット－ゲラン桿菌（ＢＣＧ）；インターフェロンなどのサイトカイン；ＭｙＶａｘ個別化免疫療法、Ｏｎｙｖａｘ－Ｐ、Ｏｎｃｏｐｈａｇｅ、ＧＲＮＶＡＣ１、Ｆａｖｌｄ、Ｐｒｏｖｅｎｇｅ、ＧＶＡＸ、Ｌｏｖａｘｉｎ　Ｃ、ＢｉｏｖａｘＩＤ、ＧＭＸＸ、及びＮｅｕＶａｘなどのワクチン；ならびにアレムツズマブ（ＣＡＭＰＡＴＨ）、ベバシズマブ（ＡＶＡＳＴＩＮ）、セツキシマブ（ＥＲＢＩＴＵＸ）、ゲムツズナブオゾガミシン（ＭＹＬＯＴＡＲＧ）、イブリツモマブチウクセタン（ＺＥＶＡＬＩＮ）、パニツムマブ（ＶＥＣＴＩＢＩＸ）、リツキシマブ（ＲＩＴＵＸＡＮ、ＭＡＢＴＨＥＲＡ）、トラスツズマブ（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ）、トシツモマブ（ＢＥＸＸＡＲ）、イピリムマブ（ＹＥＲＶＯＹ）、トレメリムマブ、ＣＡＴ－３８８８、ＯＸ４０受容体に対するアゴニスト抗体（例えば、ＷＯ２００９／０７９３３５に開示されているもの）、ＣＤ４０受容体に対するアゴニスト抗体（例えば、ＷＯ２００３／０４０１７０に開示されているもの）、及びＴＬＲ－９アゴニスト（例えば、ＷＯ２００３／０１５７１１、ＷＯ２００４／０１６８０５、及びＷＯ２００９／０２２２１５に開示されているもの）などの抗体が挙げられる。

【０２２３】

「ホルモン治療剤」という用語は、ホルモンの産生を阻害もしくは排除するか、またはがん性細胞の増殖及び／または生存に対するホルモンの効果を阻害または妨害する、化学的または生物学的物質を指す。本明細書の方法に好適なそのような薬剤の例には、ＵＳ２００７０１１７８０９に開示されているものが含まれる。特定のホルモン治療剤の例としては、タモキシフェン（ＮＯＬＶＡＤＥＸ）、トレミフェン（Ｆａｒｅｓｔｏｎ）、フルベストラント（ＦＡＳＬＯＤＥＸ）、アナストロゾール（ＡＲＩＭＩＤＥＸ）、エキセメスタン（ＡＲＯＭＡＳＩＮ）、レトロゾール（ＦＥＭＡＲＡ）、酢酸メゲストロール（ＭＥＧＡＣＥ）、ゴセレリン（ＺＯＬＡＤＥＸ）、及びリュープロイド（ＬＵＰＲＯＮ）が挙げられる。本開示の結合分子はまた、（１）卵巣、睾丸、副腎、及び下垂体などのホルモンの産生に関与する臓器または腺のすべてまたは一部を除去する外科的方法、ならびに（２）標的化されたホルモンの産生を阻害または排除するのに十分な量で患者の臓器または腺に放射線を照射する放射線治療などの非薬物ホルモン療法と組み合わせて使用され得る。

【０２２４】

いくつかの実施形態では、追加の治療剤は、ポマリスト、レブラミド、レナリドミド、ポマリドミド、サリドマイド、ＤＮＡアルキル化白金含有誘導体、シスプラチン、５－フ

ルオロウラシル、シクロホスファミド、抗ＣＤ１３７抗体、抗ｃＴＬＡ４抗体、抗ＰＤ－１抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＣＤ２０抗体、抗ＣＤ４０抗体、抗ＤＲ５抗体、抗ＣＤ１ｄ抗体、抗ＴＩＭ３抗体、抗ＳＬＡＭＦ７抗体、抗ＫＩＲ受容体抗体、抗ＯＸ４０抗体、抗ＨＥＲ２抗体、抗ＥｒｂＢ－２抗体、抗ＥＧＦＲ抗体、セツキシマブ、リツキシマブ、トラスツズマブ、ペムブロリズマブ、放射線療法、単回放射線、分割放射線、焦点放射線、全臓器放射線、ＩＬ－１２、ＩＦＮα、ＧＭ－ＣＳＦ、キメラ抗原受容体、養子移入Ｔ細胞、抗がんワクチン、及び腫瘍溶解性ウイルスのうちの１つ以上である。

【０２２５】

また、がんを治療するための併用療法は、結合分子と、腫瘍を除去するための手術との併用も包含する。結合分子は、手術前、手術中、または手術後に哺乳動物に投与され得る。

【０２２６】

また、がんを治療するための併用療法は、ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）と、電離（電磁）放射線療法（例えば、Ｘ線またはガンマ線）及び粒子線放射線療法（例えば、高線形エネルギー放射線）などの放射線療法との併用も包含する。放射線源は、哺乳動物に対して外部でも内部でもあり得る。ポリペプチドは、放射線療法前、放射線療法中、または放射線療法後に哺乳動物に投与され得る。

【０２２７】

本開示によって提供されるポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）及び組成物は、任意の好適な投与の経腸経路または非経口経路を介して投与することができる。投与の「経腸経路」という用語は、胃腸管の任意の部分を介した投与を指す。経腸経路の例としては、経口、粘膜、頬側、及び直腸経路、または胃内経路が挙げられる。投与の「非経口経路」とは、経腸経路以外の投与経路を指す。投与の非経口経路の例としては、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、腫瘍内、膀胱内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、気管内、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、及び胸骨内、皮下、または局所投与が挙げられる。本開示のポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）及び組成物は、経口摂取、経鼻胃管、胃瘻チューブ、注射、注入、埋め込み型注入ポンプ、及び浸透圧ポンプなどの任意の好適な方法を使用して投与することができる。好適な投与経路及び投与方法は、使用されるポリペプチド、所望の吸収速度、使用される特定の製剤または剤形、治療される障害の種類または重篤度、特定の作用部位、及び患者の状態などの多数の要因に応じて異なり得、当業者によって容易に選択することができる。

【０２２８】

結合分子の「有効量」という用語は、意図された治療目的に有効な量を指し得る。例えば、免疫応答を強化する文脈において、「有効量」は、哺乳動物の免疫系の任意の応答を刺激、誘発、増加、改善、または増強するのに有効である任意の量であり得る。疾患の治療の文脈において、「有効量」は、治療される哺乳動物において任意の望ましいまたは有益な効果を引き起こすのに十分な任意の量であり得る。具体的には、がんの治療において、望ましいまたは有益な効果の例としては、がん細胞のさらなる増殖もしくは転移の阻害、がん細胞の死滅、がんの再発の阻害、がんに関連する疼痛の低減、または哺乳動物の生存能の改善が挙げられる。本明細書に記載のポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）の治療有効量は、哺乳動物の体重の約０．００１～約５００ｍｇ／ｋｇ、または約０．０１～約１００ｍｇ／ｋｇの範囲であり得る。例えば、量は、哺乳動物の体重の約０．３ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、３ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇ、５０ｍｇ／ｋｇ、または１００ｍｇ／ｋｇであり得る。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）の治療有効量は、哺乳動物の体重の約０．０１～３０ｍｇ／ｋｇの範囲である。いくつかの他の実施形態では、本開示のポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）の治療有効量は、哺乳動物の体重の約０．０５～１５ｍｇ／ｋｇの範囲である。投与される正確な投与量レベルは、当業者によって容易に決定することができ、例えば、治療される障害の種類及び重篤度、援用される特定のポリペプチド、投与経路、投与時間、治療期間、援用される特定の追加療法、治

療される患者の年齢、性別、体重、状態、一般的な健康状態及び以前の病歴、ならびに医療分野でよく知られている要因などの多数の要因に依存する。

【０２２９】

ポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）またはその組成物は、複数回投与されてもよい。単回の投薬の合間の間隔は、例えば、毎日、毎週、毎月、３か月毎、または毎年であり得る。例示的な治療レジメンは、１週間に１回、２週間に１回、３週間に１回、４週間に１回、１か月に１回、３か月に１回、または３～６か月に１回の投与を伴う。本開示のポリペプチド（例えば、活性化可能結合ポリペプチド）の薬物投与法は、以下の投与計画のうちの１つを使用して、静脈内投与を介する１ｍｇ／ｋｇ体重または３ｍｇ／ｋｇ体重を含み得る：（ｉ）４週ごとに６回の薬用量、次いで３か月ごと、（ｉｉ）３週ごと、（ｉｉｉ）３ｍｇ／ｋｇ体重を１回、その後１ｍｇ／ｋｇ体重を３週ごと。

【０２３０】

ＩＸ．キット

別の態様では、本開示のポリヌクレオチドのライブラリーを含むキットが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、キットは、例えば、目的の活性化可能結合ポリペプチドを特定するために、ライブラリーを発現、修飾、スクリーニング、ないしは別の方法で使用するための説明書を含む添付文書をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、例えば、ポリヌクレオチド（例えば、合成ポリヌクレオチド）のうちの１つ以上を保存、移行、投与、ないしは別の方法で使用するための１つ以上の緩衝液をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、ポリヌクレオチドのうちの１つ以上を保存するための１つ以上の容器をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、例えば、宿主細胞のポリヌクレオチドのうちの１つ以上でトランスフェクションするための、１つ以上のベクターをさらに含む。

【０２３１】

別の態様では、本明細書に記載の活性化可能結合ポリペプチド及び／または組成物を含むキットが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、キットは、活性化可能結合ポリペプチド及び／または組成物の使用説明書を含む添付文書をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、例えば、活性化可能結合ポリペプチド及び／または組成物を保存、移行、投与、ないしは別の方法で使用するための１つ以上の緩衝液をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、活性化可能結合ポリペプチド及び／または組成物を保存もしくは投与するための１つ以上の容器をさらに含む。

【０２３２】

前述の記述は、当業者が本開示を実践することを可能にするのに十分であるとみなされる。以下の実施例は例証目的でのみ提示され、決して本開示の範囲を限定することを意図していない。実際、本明細書に示され、説明される改変に加えて、本開示の様々な改変が前述の説明から当業者に明らかとなり、添付の特許請求の範囲内に入るであろう。

【実施例】

【０２３３】

実施例１：活性化可能結合ポリペプチド遺体する自己遮断ペプチドの特定方法

上述したように、活性化可能結合ポリペプチドに対する自己遮断ペプチドを特定するために有用な改善された方法及び生産物の必要性が存在する。したがって、良好な開発可能性を有するマスキング部分を効率的に発見するために設計及び実行されている新しいシステムが本明細書に記載される。このシステムでは、標的抗体断片Ｆａｂ（図１）またはｓｃＦｖ（図２）のいずれかが最初に酵母表面上に提示され、その抗原への結合において機能的であることが確認された。次いで、改良されたペプチドライブラリーを、軽鎖のＮ末端に直接融合し、酵母表面上に融合タンパク質を提示した酵母ライブラリーを構築した。次いで、酵母ライブラリーは数ラウンドのＦＡＣＳベースのスクリーニングを受けた：最初に、抗原への低結合を有した酵母クローンを濃縮し、次いで濃縮酵母クローンをプロテアーゼで処理してＮ末端ペプチドを除去し、抗原への高結合を有するクローンを選択した（図１及び２）。４～５ラウンドの選別後、プラスミドをこれらのクローンから抽出し、

マスキングペプチド配列をＤＮＡ配列決定により確認した。

【０２３４】

優れた開発性を備えた、標的抗体に対するマスキングペプチドを特定する際に強力にする、この新しいシステムに組み込まれたいくつかの固有の特徴がある：

１）ペプチドライブラリーが、任意の外来骨格タンパク質の代わりに標的抗体のＮ末端に直接融合され、マスキングペプチドが、最終生産物と同じ状況で発見されたことである。これは、偽陽性ペプチド配列との汚染を排除し、それらの下流の特性評価の仕事量を劇的に削減した。

２）プロテアーゼ切断媒介活性化機構が、スクリーニングプロセスに組み込まれたことである。これにより、発見されたペプチドが、活性化の前に抗原結合をマスクしたのみならず、プロテアーゼ切断後には、もはや抗原結合を遮断しないことを保証した。これらは、いかなる活性化可能抗体に対しても良好なマスキングペプチドとして資格を与えるために考慮される前提条件であった。

３）ペプチドライブラリーの改善された設計が利用されたことである。一般的に使用されるランダムペプチドライブラリーとは対照的に、提示ペプチドが制約付きの立体配座を有することを保証するために、１対のシステイン残基がペプチドライブラリーの固定位置に導入された。拘束されたペプチドが、増加した結合親和性及び特異性を呈する傾向があることが観察された（Ｕｃｈｉｙａｍａ　ｅｔ　ａｌ．（２００５）９９（５）：４４８－５６）。M及びWなどの化学的に不安定な残基を含む、すべての２０個の残基をコードする、広く使用されているＮＮＫ（またはＮＮＳ）コドンとは対照的に、ＮＨＣコドンを、ペプチドライブラリーの一部またはすべてで利用した。ＮＨＣコドンは、１２個のアミノ酸残基（Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰ）をコードし、メチオニン、トリプトファン、またはシステインなどの製造プロセスに好ましくない残基を含まない。加えて、ＮＨＣコドンの使用は、ＮＮＫ（またはＮＮＳ）コドンと比べて理論的ペプチドライブラリーサイズも劇的に縮小し、したがって、カバレッジが大幅に向上したライブラリーの構築を可能にした。これらのライブラリーは、異なる標的抗体に対して試験する場合、良好に実行された。

【０２３５】

実施例２：制約付きペプチドライブラリー（ＣＰＬ）の設計

４つの例示的な制約付きペプチドライブラリー（ＣＰＬ）を設計した（表１）。

表１：設計されたＣＰＬ

ＣＰＬ名：	アミノ酸配列：	核酸配列：
ＣＰＬ０１０	ＥＶＧＳＹ（Ｚ６）Ｃ（Ｚ６）Ｃ（Ｚ２）ＳＧＲＳＡ（配列番号４）	ｇａｇｇｔｔｇｇａｔｃｃｔａｃ（ＮＨＣ）６ｔｇｔ（ＮＨＣ）６ｔｇｃ（ＮＨＣ）２ｔｃａｇｇｔｃｇｔｔｃｃｇｃｔ（配列番号８）
ＣＰＬ０１１	ＥＶＧＳＹ（Ｚ６）Ｃ（Ｘ６）Ｃ（Ｚ２）ＳＧＲＳＡ（配列番号５）	ｇａｇｇｔｔｇｇａｔｃｃｔａｃ（ＮＨＣ）６ｔｇｔ（ＮＮＫ）６ｔｇｃ（ＮＨＣ）２ｔｃａｇｇｔｃｇｔｔｃｃｇｃｔ（配列番号９）
ＣＰＬ０１２	ＥＶＧＳＹ（Ｚ６）Ｃ（Ｚ８）Ｃ（Ｚ２）ＳＧＲＳＡ（配列番号６）	ｇａｇｇｔｔｇｇａｔｃｃｔａｃ（ＮＨＣ）６ｔｇｔ（ＮＨＣ）８ｔｇｃ（ＮＨＣ）２ｔｃａｇｇｔｃｇｔｔｃｃｇｃｔ（配列番号１０）
ＣＰＬ０１３	ＥＶＧＳＹ（Ｚ６）Ｃ（Ｘ８）Ｃ（Ｚ２）ＳＧＲＳＡ（配列番号７）	ｇａｇｇｔｔｇｇａｔｃｃｔａｃ（ＮＨＣ）６ｔｇｔ（ＮＮＫ）８ｔｇｃ（ＮＨＣ）２ｔｃａｇｇｔｃｇｔｔｃｃｇｃｔ（配列番号１１）

各Ｘは独立して、Ａ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｒ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｗ、及びＹからなる群から選択されるアミノ酸であり、各Ｚは独立して、Ｄ、Ａ、Ｙ、Ｓ、Ｔ、Ｎ、Ｉ、Ｌ、Ｆ、Ｖ、Ｈ、及びＰからなる群から選択されるアミノ酸である。

【０２３６】

それらのコアには、配列Ｚ６ＣＸ６ＣＺ２（配列番号５５）またはＺ６ＣＸ８ＣＺ２（配列番号５６）があり、２つの固定システイン残基がジスルフィド結合を形成して、ペプチドの立体配座を制約した。合成されたオリゴヌクレオチドでは、ループの内側を除くすべての場所において縮退コドンＮＨＣが適用され、ＮＮＫコドンもまたＣＰＬ０１１及びＣＰＬ０１３において援用された。ＮＮＫまたはＮＮＳコドンとは対照的に、ＮＨＣコドンは１２個の残基（表２）をコードし、有意な多様性を包含するが、化学的に不安定な残基であるメチオニン、トリプトファン、及びシステインを欠く。さらに、ＮＮＫまたはＮＮＳコドンと比較して減少した理論上の多様性は、より広い網羅範囲を有するライブラリーの構築を可能にした。

表２：ＮＨＣコドン

ＮＨＣ：	ＡＡＣ	ＡＣＣ	ＡＴＣ	ＴＡＣ	ＴＣＣ	ＴＴＣ	ＧＡＣ	ＧＣＣ	ＧＴＣ	ＣＡＣ	ＣＣＣ	ＣＴＣ
アミノ酸：	Ｎ	Ｔ	Ｉ	Ｙ	Ｓ	Ｆ	Ｄ	Ａ	Ｖ	Ｈ	Ｐ	Ｌ

【０２３７】

これらのマスキングペプチド配列に続くのは、２つのプロテアーゼ認識部位：プロテアーゼウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）のＳＧＲＳＡ（配列番号１３）、ならびにプロテアーゼマトリックスメタロプロテイナーゼ－２（ＭＭＰ－２）及びマトリックスメタロプロテイナーゼ－９（ＭＭＰ－９）のＰＬＧＬＡＧ（配列番号１４）を

含有する、インバリアント切断ペプチド配列（ＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ、配列番号１２）であった。これらの認識部位は、標的化剤のインビボ腫瘍細胞特異的活性化において、多くの群によって使用されている（例えば、Ｋｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２７２（３３）：２０４５６－６２、Ｇｅｒｓｐａｃｈ　ｅｔ　ａｌ．（２００６）Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ　５５（１２）：１５９０－６００、及びＪｉａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．（２００４）Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ　１０１（５１）：１７８６７－７２を参照）。酵母ベースのスクリーニング中に、ＴＥＶプロテアーゼの可用性及び特異性により、ＭＭＰ－９認識配列をタバコエッチウイルス（ＴＥＶ）プロテアーゼ認識配列（ＥＮＬＹＦＱＧ、配列番号１５）に置換した。

【０２３８】

ＣＰＬ及びインバリアント切断ペプチドを、酵母表面に提示されたＡｇａ２タンパク質に接続しているｓｃＦｖまたはＦａｂのいずれかの形式で、標的抗体の軽鎖のＮ末端に融合した。代理ＴＥＶプロテアーゼ認識部位の包含は、正しい種類のマスキングペプチド配列を特定する上で重要であった。すなわち、抗原結合はプロテアーゼ切断前に遮断され、抗原結合はプロテアーゼ切断後に可能となる。以下に説明する例は、酵母において最初に示された活性化可能抗体の切断活性化メカニズムが、哺乳動物細胞中で発現された完全なＩｇＧ分子において複製されることを示した。

【０２３９】

実施例３：ＣＴＬＡ４を標的化する活性化可能抗体の構築及び検証

酵母表面の機能的標的抗体の提示

低コピー数のＣＥＮ／ＡＲＳベースのベクターを使用して、酵母Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ中に、誘導性ＧＡＬ１－１０プロモーターの制御下で標的抗体（ヒトＣＴＬＡ４を標的化する抗体ＴＹ２１５８０）を発現させた。ｓｃＦｖの表面提示を、以前に公開された配置（Ｂｏｄｅｒ　ａｎｄ　Ｗｉｔｔｒｕｐ（１９９７）Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１５（６）：５５３－７）と同様に、ＧＡＬ１プロモーターの制御下でそのＣ末端に融合したＡｇａ２タンパク質を介して達成した。Ｆａｂについては、それらの表面提示を、ＧＡＬ１プロモーターの制御下で重鎖（ＶＨとＣＨ１の融合）のＮ末端に融合したＡｇａ２タンパク質によって達成したが、軽鎖（ＶＬとＣＬの融合）はＧＡＬ１０プロモーターの制御下であった。Ｆａｂを、膜に固定された重鎖との結合によって酵母表面上に提示した。

【０２４０】

ＦａｂまたはｓｃＦｖの表面提示を、融合親和性タグを認識する抗体で染色することによって検証し、酵母上に提示されたＦａｂまたはｓｃＦｖの機能を、ビオチン化ヒトＣＴＬＡ４を使用して調査した。簡潔に言えば、ガラクトース培地での誘導から４８時間後、酵母細胞（１×１０＾６）を採取し、ＰＢＳＡ緩衝液で１回洗浄し、次いで、１０ｎＭのビオチン化抗原と室温で１時間インキュベートした。次いで、酵母細胞をＰＢＳＡ緩衝液で２回洗浄し、ＰＥコンジュゲートストレプトアビジン（１：５００希釈）（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ＃２－４３１７－８７）と４℃で３０分間インキュベートした。次いで、酵母細胞をフローサイトメトリーによって分析した。図３Ａ～Ｂに示すように、ＣＴＬＡ４を標的化するＦａｂ（図３Ａ）及びｓｃＦｖ（図３Ｂ）の両方が酵母表面上に正常に提示され、それらの両方がそれらの抗原に強力に結合することが可能であった。

【０２４１】

ＣＰＬを含有する酵母ライブラリーの構築

ＣＰＬをコードする合成されたオリゴヌクレオチドを、５サイクルのＰＣＲによって切断ペプチドをコードするオリゴヌクレオチドと融合した。使用したプライマー（Ｆプライマー及びＲプライマー）を、表３に列挙する。ＰＣＲ反応の組成は、１×ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ緩衝液、２．５ｍＭのｄＮＴＰ、各１００μＭのＦプライマー及びＲプライマー、ならびに各１００μＭのテンプレート１（ＣＰＬオリゴヌクレオチド）及びテンプレート２（切断ペプチドをコードするオリゴヌクレオチド）、及び２．５ＵのＰｒｉｍｅＳＴＡＲ

ＨＳ　ＤＮＡポリメラーゼであった。使用したＰＣＲプログラムは、ａ）９６℃で５分間の１サイクル、２）９６℃（１５秒）、６０℃（１５秒）、７２℃（６秒）の５サイクル、及び３）７２℃で３分間の１サイクルであった。エキソヌクレアーゼＩを使用して、ゲル電気泳動によるＰＣＲ産物の精製前に、一本鎖ＤＮＡを分解した。次いで、精製したＰＣＲ産物をＢａｍＨＩ及びＫｐｎＩで分解し、同じ２つの制限酵素で分解した細菌フィルターベクターにクローニングした。フィルターベクターでは、ＣＰＬ及び切断ペプチドを、細菌分泌シグナルペプチドの下流、及びシグナル配列を欠くベータラクタマーゼの上流に配置した。アンピシリンプレート上で選択された機能的なベータラクタマーゼは、ＣＰＬと切断ペプチドのインフレーム融合を示し、それによって、合成された縮退オリゴヌクレオチドに導入されたあらゆるフレーム外エラー（Ｎ－１またはＮ－２）を排除した。さらに、いくつかの不完全に折りたたまれた配列もプールから削減した。ライゲーション産物をエレクトロコンピテント細菌細胞に形質転換し、ＣＰＬライブラリーの多様性は一般的に５×１０＾９～１×１０＾１０であった。個々のクローンの配列決定は、非常に高いインフレーム比（多くの場合、ほぼ１００％）がこのアプローチによって達成されたことを示した。

表３：ＰＣＲプライマー

プライマー名：	配列：	配列番号：
Ｆプライマー	Ｔｃｇｇｇｔｇａｇｇｔｔｇｇａｔｃｃｔａｃ	５１
Ｒプライマー	ｇｔａｃａｇｇｔｔｃｔｃｇｇｔａｃｃａｃｃ	５２
ＰＬ０００９＿Ｆ	ｔｇｇａｇａｃａｃａｇａｃａｇｇａｔｃａｃｔｇｇａｇａｃｔｇｇｇｔｃａｇｃａｇｇａｔａｔｃｇｇａｔｃｃｔｇａａｃｃｇｃｃｔｇａａｃ	５３
ＢＬ１０２４＿Ｒ	ｃｔｔｃｇｃｔｇｔｔｔｔｔｃａａｔａｔｔｔｔｃｔｇｔｔａｔｔｇｃｔｔｃａｇｔｔｔｔａｇｃａｇｇａｔｃｃｇａｇｇｔｔｇｇａｔｃｃｔａｃ	５４

【０２４２】

ＣＰＬを含有する酵母ライブラリーを作製するために、プラスミドを細菌ライブラリーから抽出し、ＣＰＬ及び切断ペプチドをコードするＤＮＡ断片のＰＣＲ増幅のテンプレートとして使用した。使用したプライマー（ＰＬ０００９＿Ｆ及びＢＬ１０２４＿Ｒ）を表３に列挙する。増幅されたＰＣＲ断片をゲル電気泳動によって精製し、Ａｇａ２に融合された標的抗体を発現した線形化されたプラスミドと一緒に、エレクトロコンピテント酵母細胞に形質転換した。ＰＣＲ断片及びプラスミドの両端の相同配列は、酵母細胞内での効率的な相同組換えを確実にした。構築された酵母ライブラリーの多様性は一般的に１×１０＾９～２×１０＾９であった。

【０２４３】

ＣＴＬＡ４抗体に対するマスキングペプチドのＦＡＣＳベースのスクリーニング

ＣＰＬ酵母ライブラリーからの合計１×１０＾８の酵母細胞を使用して、標的抗体に対するマスキングペプチドをスクリーニングした。ＭｏＦｌｏ　ＸＤＰによる各選別ラウンドについて、ガラクトース培地中で誘導された酵母細胞を採取し、ＰＢＳＡ緩衝液で１回洗浄し、次いで、１０ｎＭ（後のラウンドで１ｎＭに低下）のビオチン化抗原と室温で１時間インキュベートした。次いで、酵母細胞をＰＢＳＡ緩衝液で２回洗浄し、ＰＥコンジュゲートストレプトアビジン（１：５００希釈）（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ＃２－４３１７－８７）と４℃で３０分間インキュベートした。ＰＢＳＡ緩衝液でさらに２回洗浄した後、酵母細胞を２～３ＯＤ／ｍＬに調整し、選別に供した。図４に示すように、ラウンド

１では、１０ｎＭのビオチン化ＣＴＬＡ４－Ｆｃを使用して、弱い結合剤を濃縮した。ラウンド１からの酵母細胞を、グルコース培地中で増殖後、ガラクトース培地中で誘導し、ＡｃＴＥＶプロテアーゼ（６Ｕ／ＯＤ細胞）（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ＃１２５７５０１５）を用いて３０℃で２時間処理して、強力な結合剤を精製した。第３の選別ラウンドから開始して、ビオチン化ＣＴＬＡ４－Ｆｃの濃度を１ｎＭに低減し、弱い結合剤を収集した。第４のラウンドでは、酵母細胞の画分も並行してＡｃＴＥＶで処理し、標的抗体のプロテアーゼ切断媒介型活性化を検証した。図４に示すように、ＡｃＴＥＶ切断が、抗原に強力に結合する細胞集団の劇的な増加をもたらしたことは明らかであり、スクリーニング戦略が有効であったことを示唆した。第５の選別ラウンドからの単一クローンを選択培地に播種し、切断媒介型活性化抗原結合のさらなる確認のために個々に増殖させた。

【０２４４】

図５Ａ～Ｂに示すように、選択されたＣＴＬＡ４活性化可能抗体クローンは、ｓｃＦｖ（図５Ａ）またはＦａｂ（図５Ｂ）形式のいずれかで、マスキングペプチドの存在下では抗原への結合をほとんど示さなかった。しかしながら、酵母細胞をＴＥＶプロテアーゼで処理してマスキングペプチドを除去すると、抗原への結合が劇的に増加した。選択されたクローンを検証するためのＴＥＶプロテアーゼの適用と合わせて、ＴＥＶ認識部位を切断ペプチドに組み込むことにより、マスキングペプチド選択の成功率が有意に上昇した。

【０２４５】

マスキングペプチド配列を特定するために、選択された酵母クローン（Ｇｅｎｅｒａｙ＃ＧＫ２００２－２００）からシャトルプラスミドを抽出し、コンピテントなＥ．ｃｏｌｉ細胞に形質転換した。プラスミドを調製し、マスキングペプチドをコードする領域を配列決定して整列した。予想されたように、これらの配列はいくつかの群に分けることができ、選別ラウンドによって明確な濃縮を示した。マスキングペプチド配列の４つの群を、インバリアント切断ペプチド配列と一緒に表４に列挙する。

表４：マスキングペプチド配列

試料ＩＤ：	ペプチド名：	マスキング＋切断ペプチド配列：
ＴＹ２２４０１	Ｂ１３１８９	ＥＶＧＳＹＮＦＶＡＤＳＣＰＤＨＰＹＰＣＳＡＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号２８）
ＴＹ２２４０２	Ｂ１３１８０	ＥＶＧＳＹＩＶＨＨＳＤＣＤＡＦＹＰＹＣＤＳＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３０）
ＴＹ２２４０３	Ｂ１３１９２	ＥＶＧＳＹＹＳＡＹＰＡＣＤＳＨＹＰＹＣＮＳＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３２）
ＴＹ２２４０４	Ｂ１３１９７	ＥＶＧＳＹＰＮＰＳＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３４）

【０２４６】

ＩｇＧ変換及び発現

潜在的なグリコシル化部位を排除するための表４に列挙されるマスキングペプチドの４つの群、ならびにそれらの２つ（Ｂ１３１９２及びＢ１３１９７）から派生した追加の４つのマスキングペプチド配列（表５）は、ＩｇＧ１に変換された。

表５：追加のマスキングペプチド配列

試料ＩＤ：	マスキング＋切断ペプチド配列：
ＴＹ２２５６３	ＥＶＧＳＹＹＳＡＹＰＡＣＤＳＨＹＰＹＣＱＳＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３６）
ＴＹ２２５６４	ＥＶＧＳＹＹＳＡＹＰＡＣＤＳＨＹＰＹＣＮＳＡＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３７）
ＴＹ２２５６５	ＥＶＧＳＹＰＱＰＳＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３８）
ＴＹ２２５６６	ＥＶＧＳＹＰＮＰＡＳＤＣＶＰＹＹＹＡＣＡＹＳＧＲＳＡＧＧＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ（配列番号３９）

【０２４７】

重鎖及び軽鎖を哺乳動物発現ベクターｐＣＤＮＡ３．３（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、カタログ番号Ｋ８３０００１）に別個にクローニングし、マスキングペプチド及びインバリアント切断ペプチドを、酵母表面に提示されたのと同じ様式で軽鎖のＮ末端に融合した。親ＣＴＬＡ４抗体（ＴＹ２１５８０）についてのＶＨ及びＶＬ配列は以下に列挙されている（また、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、代理人整理番号６９５４０－２０００５４０で本明細書と同時出願された「Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ Ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ Ｃｒｏｓｓ－ｒｅａｃｔｉｖｅ Ａｎｔｉ－ＣＴＬＡ４ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｍａｋｉｎｇ ａｎｄ Ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ Ｓａｍｅ」と題するＰＣＴ国際出願も参照されたい）：

抗ＣＴＬＡ４重鎖可変領域（配列番号４７）：

ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＹＳＩＳＳＧＹＨＷＳＷＩＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＬＡＲＩＤＷＤＤＤＫＹＹＳＴＳＬＫＳＲＬＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＬＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＳＹＶＹＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ

抗ＣＴＬＡ４軽鎖可変領域（配列番号４８）：

ＤＩＱＬＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＶＲＧＲＦＬＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＤＡＳＮＲＡＴＧＩＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＳＳＳＷＰＰＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲ．

【０２４８】

プラスミドの対をＨＥＫ２９３Ｆ細胞に一時的にトランスフェクトした。６日後、上清を採取し、遠心分離及び濾過によって清澄化して、ＩｇＧを標準のタンパク質Ａ親和性クロマトグラフィー（ＭａｂＳｅｌｅｃｔ ＳｕＲｅ、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて精製した。ＩｇＧを溶出及び中和し、緩衝液をＰＢ緩衝液（２０ｍＭのリン酸ナトリウム、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．０）に交換した。タンパク質濃度をＵＶ分光光度法によって決定し、ＩｇＧ純度を変性、還元、及び非還元条件下で、ＳＤＳ－ＰＡＧＥまたはＳＥＣ－ＨＰＬＣによって分析した。重要なことに、ＨＥＫ２９３細胞における活性化可能抗体の発現レベルは親抗体と同様であり、タンパク質Ａ樹脂後のそれらの精製収率もまた同様であり、マスキング及び切断ペプチドの存在が哺乳動物細胞における抗体発現に悪影響を及ぼさないことを示唆した。

【０２４９】

マスキング効率の測定

ＦｏｒｔｅＢｉｏ Ｏｃｔｅｔ ＲＥＤ９６システム（Ｐａｌｌ、ＵＳＡ）を使用して

、マスキングペプチドの効率を迅速に評価した。簡潔に言えば、活性化可能抗体（及びそれらの親抗体、ＴＹ２１５８０）をＫＢ緩衝液（０．０２％のＴｗｅｅｎ　２０及び０．１％のＢＳＡで補充されたＰＢＳ緩衝液）中で３０μｇ／ｍＬに希釈し、並行して抗ヒトＩｇＧ捕捉（ＡＨＣ）バイオセンサー（Ｐａｌｌ、ＵＳＡ）によって捕捉した。次いで、センサーを、Ｈｉｓタグ化ＣＴＬＡ４タンパク質（２５ｎＭ）と３００秒間会合させ、次いで、ＫＢ緩衝液中でさらに３００秒間解離させた。製造業者のガイドラインに従って、ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｄａｔａ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　７．１（Ｐａｌｌ、ＵＳＡ）を使用して、会合及び解離曲線を１：１のＬａｎｇｍｕｉｒ結合モデルにフィッティングした。図６Ａ～Ｂに示すように、活性化可能抗体で達成された応答は、親抗体の応答よりも有意に低く、マスキングペプチドが抗体のその抗原への結合を効果的に遮断したことを示唆した。しかしながら、４つの活性化可能抗体のうち、ＴＹ２２４０１は効果が低く、以下に考察されるＥＬＩＳＡアッセイの結果と一致した。

【０２５０】

組換えヒトＣＴＬＡ４－ＦｃをＰＢＳ中で１μｇ／ｍＬに希釈し、Ｍａｘｉｓｏｒｐプレート上に４℃で一晩塗布した。プレートを、３％の無脂肪乳で補充されたＰＢＳを用いて、３７℃で１時間遮断した。洗浄後、１００μＬの３倍段階希釈抗体を各ウェルに添加した。３７℃で１時間インキュベートした後、プレートを４回洗浄し、１００μＬのＨＲＰコンジュゲート抗ヒトＩｇＧ（Ｆａｂ特異的）（１：６０００希釈）を各ウェルに添加した。プレートを３７℃で１時間インキュベートして、４回洗浄し、次いで、５０μＬのＴＭＢ基質溶液を各ウェルに添加して、プレートを室温でインキュベートした。反応をウェルあたり５０μＬのH_2SO_4で停止した後、４５０ｎｍの吸光度を測定した。EC_{50}を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　６ソフトウェアの非対称シグモイド（５パラメータロジスティック方程式）モデルを使用してＥＬＩＳＡデータをフィッティングすることによって評価した。活性化可能抗体ＴＹ２２４０１、ＴＹ２２４０２、及びＴＹ２２４０４の実験を２回実施することにより、これらの活性化可能抗体のそれぞれについて、２つの計算されたマスキング効率を得た。各活性化可能抗体のマスキング効率を、活性化可能抗体の結合のEC_{50}を、親抗体（ＴＹ２１５８０）のEC_{50}で除算することによって計算した。図７Ａ～Ｃ及び表６に示すように、親抗体と比較して、すべての活性化可能抗体がその抗原への結合の劇的な低下を示し、計算されたマスキング効率は４８～２２１３の範囲であった。マスキング効率における差異は、EC_{50}値の測定値とデータフィッティングのばらつきに起因する可能性が高く、各活性化可能抗体のマスキング効率は計算された範囲内である可能性が高い（例えば、活性化可能抗体ＴＹ２２４０２のマスキング効率は３７７～２２１３である）。これらの結果は、ＣＰＬから特定された複数のマスキングペプチドが、哺乳動物細胞において、及び完全なＩｇＧ分子の一部として発現された場合、それらのマスキング効率を維持したことを示した。

表６：プロテアーゼ切断前の活性化可能抗体ＥＬＩＳＡ

試料ＩＤ：	ＬｏｇＥＣ$_{50}$：	ＥＣ$_{50}$			
		Ｍ：	ｎＭ：	Ｒ^{2}：	マスキング効率：
データバッチ１					
ＴＹ２１５８０	－９．６６５	２．１６１Ｅ－１０	０．２１６	０．９９９	１．０
ＴＹ２２４０１	－７．６２３	２．３８２Ｅ－０８	２３．８２	０．９９７	１１０
ＴＹ２２４０２	－６．３２１	４．７７９Ｅ－０７	４７７．９	０．９９７	２２１３
ＴＹ２２４０４	－６．７４９	１７８．４Ｅ－０７	１７８．４	０．９９８	８２６
データバッチ２					
ＴＹ２１５８０	－９．４７８	３．３２４Ｅ－１０	０．３３２４	０．９９８	１．０
ＴＹ２２４０１	－７．８００	１．５８６Ｅ－０８	１５．８６	０．９９４	４８
ＴＹ２２４０２	－６．９０２	１．２５４Ｅ－０７	１２５．４	０．９９８	３７７
ＴＹ２２４０４	－６．８９２	１．２８１Ｅ－０７	１２８．１	０．９９８	３８５
ＴＹ２１５８０	－９．４８	３．３Ｅ－１０	０．３３		１．０
ＴＹ２２５６３	－７．３２	４．７７１Ｅ－０８	４７．７１		１４３．５
ＴＹ２２５６４	－７．４１	３．８９８Ｅ－０８	３８．９８		１１７．３
ＴＹ２２５６５	－６．６８	２．０９９Ｅ－０７	２０９．９		６３１．５
ＴＹ２２５６６	－６．７９	１．６２６４Ｅ－０７	１６２．６		４８９．２

【０２５１】

マスキングペプチドの除去は、抗体活性を回復する。

精製された活性化可能抗体を、切断配列を認識するプロテアーゼで処理し、次いで、マスキングペプチドの除去がそれらの活性を回復するかどうかを決定するために試験した。例として、２０μｇのＴＹ２２４０４（０．５ｍｇ／ｍＬ）を反応緩衝液（５０ｍＭのトリスＨＣｌ、０．０１％のＴｗｅｅｎ　２０、ｐＨ８．５）中の１μｇの組換えヒトｕＰＡ（Ａｃｒｏｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、＃ＰＬＵ－Ｈ５２２９）で処理したか、またはＴＹ２２４０４を反応緩衝液（５０ｍＭのトリス、１５０ｍＭのＮａＣｌ、５ｍＭのＣａＣｌ

$_2$、２０$_\mu$ＭのＺｎＣｌ２、ｐＨ７．５）中の５または１０単位の組換えヒトＭＭＰ－９（ＢｉｏＶｉｓｉｏｎ、＃７８６７－５００）で処理した。反応は３７℃で２１時間行った。マスキングペプチドは、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析によって軽鎖から除去されていることが確認された図８Ａ。次いで、マスキング効率を上記のとおりＥＬＩＳＡによって測定した。図８Ｂ及び表７に示すように、マスキングペプチドを除去した後、活性化可能抗体は抗原への結合において親抗体と区別がつかなくなった。

表７：プロテアーゼ切断後の活性化可能抗体ＥＬＩＳＡ

試料ＩＤ：	ＬｏｇＥＣ$_{50}$：	ＥＣ$_{50}$	
		ｎＭ：	マスキング効率：
ＴＹ２１５８０	－９．３５	０．４４７	１．０
ＴＹ２２４０４	－７．０１	９６．８	２１６
ＴＹ２２４０４－ｕＰＡ	－９．４０	０．４０２	０．９
ＴＹ２２４０４－ＭＭＰ－９	－９．３９	０．４１２	０．９

【０２５２】

活性化可能抗体の開発可能性プロファイル

製造目的のために、発見された活性化可能抗体が良好な開発可能性プロファイルを有することが重要である。哺乳動物細胞中に発現した精製された活性化可能抗体を用いていくつかの異なる試験を実施した。活性化可能抗体を、ｐＨ５．５の２０ｍＭのヒスチジン中で１ｍｇ／ｍＬに調整し、抗体品質分析を、Ｗａｔｅｒｓ ２９９６ ＵＶ検出器を備えたＷａｔｅｒｓ ２６９５及びＴＳＫｇｅｌ ｇ３０００ ＳＷＸＬカラム（３００ｍｍ×７．８ｍｍ）（Ｔｏｓｏｈ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を使用した分析サイズ排除クロマトグラフィーを使用して実施した。各アッセイについて、１０μｇの抗体を注入し、緩衝液（ｐＨ７．０の２００ｍＭのリン酸ナトリウム）中で０．５ｍＬ／分の流速で分画を実施した。

【０２５３】

３つの加速ストレス試験：活性化可能抗体の５０℃で７日間のインキュベーション、活性化可能抗体の４０℃で２８日間のインキュベーション、及び６サイクルの凍結融解を実施した。凍結融解試験を、１００μＬの試料（２０ｍＭのヒスチジン中１ｍｇ／ｍＬ、ｐＨ５．５）を－８０℃で３０分間凍結し、続いて室温で６０分間融解することによって実施した。図９Ａ～Ｃに示すように、すべての活性化可能抗体は安定したままであり、５０℃で７日間または４０℃で２８日間保存した後、ほとんど凝集を示さなかった。６サイクルの凍結融解後、わずかな劣化を示したが、単量体メインピークは９５％付近のままであり、これらの活性化可能抗体が、これらの加速ストレス試験下で非常に安定していたことを示した。理論に拘束されることを望むものではないが、活性化可能抗体は大規模な緩衝液最適化プロセスをまだ経ておらず、したがって、活性化可能抗体の安定性は最適化された緩衝液及び賦形剤を用いてさらに改善され得るということは注目に値する。

【０２５４】

次に、活性化可能抗体を、ｐＨ５．５の２０ｍＭのヒスチジン中で１５０ｍｇ／ｍＬ超に濃縮した（表８）。活性化可能な抗体の沈殿は観察されず、試料の粘度は非常に管理しやすかった。次いで、濃縮された活性化可能抗体を、高分子量（ＨＭＷ）種の分析のために２０ｍｇ／ｍＬまたは１ｍｇ／ｍＬのいずれかに希釈した。図１０及び表８に示すように、ＨＭＷ種の明らかな増加は観察されず、これらの活性化可能抗体が、高濃度になるまで、試験された緩衝液中で非常に溶解性及び安定性であったことを示唆した。

表８：１５０ｍｇ／ｍＬ超の活性化可能抗体の濃度

試料ＩＤ：	開始濃度（ｍｇ／ｍＬ）：	高濃度（ｍｇ／ｍＬ）：
ＴＹ２２４０１	１０．９	１８７．２
ＴＹ２２４０２	８．４	１６０．０

【０２５５】
低ｐＨでの活性化可能抗体の安定性を研究するために、精製された活性化可能抗体（２０ｍＭのヒスチジン中１０ｍｇ／ｍＬ、ｐＨ５．５）をクエン酸で１ｍｇ／ｍＬに滴定し、ｐＨを３．７に調整して、室温で３０分及び６０分間保持した。その後、試料を１Ｍのトリス塩基でｐＨ７．０に中和した。活性化可能抗体のマスキング効率を、上記のようにＦｏｒｔｅＢｉｏで測定した。図１１に示すように、マスキング効率は、３０または６０分間の低ｐＨインキュベーション後も変化しないままであり、マスキングペプチドがその遮断効果を低ｐＨインキュベーション後も保持することを示唆した。
【０２５６】
まとめると、データは、発見された活性化可能抗体が様々なストレス条件下で安定したままであり、したがって、それらが良好な開発可能性プロファイルを有することを示している。
【０２５７】
実施例４：ＣＴＬＡ４を標的化する活性化可能抗体のインビトロ及びインビボ特性評価
親抗体ＴＹ２１５８０単独では、ヒトＴ細胞活性化またはヒトＰＢＭＣ細胞の活性化を刺激しないことが以前に示されている（その全体が参照により本明細書に組み込まれる、代理人整理番号６９５４０－２０００５４０で本明細書と同時出願された「Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ Ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ Ｃｒｏｓｓ－ｒｅａｃｔｉｖｅ Ａｎｔｉ－ＣＴＬＡ４ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ａｎｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｍａｋｉｎｇ ａｎｄ Ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ Ｓａｍｅ」と題するＰＣＴ国際出願も参照されたい）。Ｔ細胞におけるＣＴＬＡ－４活性は、第１（ＴＣＲ／ＣＤ３）のシグナル及びＢ７－ＣＤ２８／ＣＴＬＡ－４に関与する第２のシグナル関連していることが知られている。一貫して、抗ＣＤ３の低濃度では、親抗体ＴＹ２１５８０が、ヒトＰＢＭＣ細胞の活性化を有意に強化することが示された。
【０２５８】
インビトロ機能的特性評価
ここで、ＣＴＬＡ４を標的化する活性化可能抗体の活性を、ヒトＰＭＢＣ活性化に対する低濃度の抗ＣＤ３抗体の存在下で評価した。ヒトＰＢＭＣを、Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ－１０７７（Ｓｉｇｍａ）を使用した密度勾配遠心分離によって、健康なドナー（＃４４）の血液から新たに単離した。抗ＣＤ３（ＯＫＴ－３）抗体を９６ウェルプレート上に４℃で一晩塗布した。洗浄後、１×１０＾５の新たに単離したヒトＰＢＭＣを各ウェルに添加し、続いて、異なる濃度で試験品を添加した。ＩＬ－２の誘導を、ヒトＩＬ－２ ＥＬＩＳＡ Ｒｅａｄｙ－ＳＥＴ－Ｇｏ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）キットを使用して刺激から４８時間後に測定した。上清中のＩＦＮ－γを、ヒトＩＦＮ－γ ＥＬＩＳＡ Ｒｅａｄｙ－ＳＥＴ－Ｇｏ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）キットを使用して測定した。図１２Ａ～Ｂに示すように、高濃度で、ＴＹ２２４０４はＩＬ－２産生を誘導し、ＴＹ２２４０１はＩＦＮ－γ産生を誘導した。それにもかかわらず、活性化可能な抗体の活性は、親抗体ＴＹ２１５８０の活性よりも有意に低かった。
【０２５９】
次に、活性化可能抗体の抗体依存性細胞傷害活性を試験し、親抗体ＴＹ２１５８０のそれと比較した。ＡＤＣＣレポーター遺伝子アッセイを使用して、活性化可能抗体のＡＤＣＣ活性を評価した。ヒトＣＴＬＡ４を過剰発現するＨＥＫ２９３Ｆ細胞（ＨＥＫ２９３Ｆ／ｈＣＴＬＡ－４細胞）を標的細胞として使用し、ＣＤ１６ａ及びＮＦＡＴ－Ｌｕｃを過剰発現するＪｕｒｋａｔ細胞株（Ｊｕｒｋａｔ／ＣＤ１６ａ細胞）をエフェクター細胞と

して使用した。１×１０＾５個のＪｕｒｋａｔ／ＣＤ１６ａ細胞及び１×１０＾４個のＨＥＫ２９３Ｆ／ｈＣＴＬＡ－４細胞（Ｅ：Ｔ比１０：１）を異なる濃度の抗体と混合した。６時間インキュベートした後、１００μＬのＯｎｅ－Ｇｌｏ試薬を細胞に添加し、細胞を１０分間溶解した。ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　ｉ３ｘプレートリーダーを使用して発光測定のために上清を除去した。図１３に示すように、活性化可能抗体は、親抗体ＴＹ２１５８０よりも数対数低いＡＤＣＣ活性を示した。ＴＹ２２４０１のＡＤＣＣ活性は、ＴＹ２２４０２及びＴＹ２２４０４の活性よりも高かった。まとめると、インビトロのデータは、より良好にマスキングされた活性化可能抗体が、より低いＡＤＣＣ活性を有したことを示している。

【０２６０】

次に、活性化可能抗体の抗腫瘍活性を評価し、ＭＣ３８結腸直腸腫瘍モデル、ＣＴ２６結腸直腸腫瘍モデル、Ｈ２２肝臓腫瘍モデル、及び３ＬＬ肺腫瘍モデルを含む複数の同系マウス腫瘍モデルにおいて親抗体ＴＹ２１５８０の抗腫瘍活性と比較した。

【０２６１】

ＭＣ３８結腸直腸腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

Ｃ５７ＢＬ／６マウス（群あたりｎ＝８、雌、６～８週齢）に、ＭＣ３８（ＮＴＣＣ－ＭＣ３８）マウス結腸癌細胞を皮下接種した。腫瘍が定着した場合（７０ｍｍ３）、治療を、週に２回、腹腔内注射により、アイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ２１５８０、または３つの活性化可能抗体のうちの１つを用いて開始した。腫瘍増殖を週２回モニターし、経時的な平均腫瘍体積±ｓ．ｅ．ｍ．（図１４Ａ）及び個々の腫瘍増殖曲線（図１４Ｂ）を評価した。図１４Ａ～Ｂに示すように、３つすべての活性化可能抗体が、ＭＣ３８同系マウス腫瘍モデルにおいて親抗体ＴＹ２１５８０に匹敵する強力な抗腫瘍活性を示した。

【０２６２】

ＣＴ２６結腸直腸腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

ＢＡＬＢ／ｃマウス（群あたりｎ＝８、雌、７～８週齢）に、ＣＴ２６（Ｓｈａｎｇｈａｉ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）マウス結腸癌細胞を皮下接種した。腫瘍が定着した場合（１００ｍｍ３）、治療を、週に２回、腹腔内注射により、アイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ２１５８０、または３つの活性化可能抗体のうちの１つを５ｍｇ／ｋｇで用いて開始した。腫瘍増殖を週２回モニターし、経時的な平均腫瘍体積±ｓ．ｅ．ｍ．として報告した。図１５に示すように、３つすべての活性化可能抗体が、ＣＴ２６同系マウス腫瘍モデルにおいて親抗体ＴＹ２１５８０に匹敵する強力な抗腫瘍活性を示した。

【０２６３】

Ｈ２２肝臓腫瘍モデルにおける抗腫瘍効果

ＢＡＬＢ／ｃマウス（群あたりｎ＝８、雌、７～８週齢）に、Ｈ２２（Ｃｈｉｎａ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）マウス肝臓癌細胞を皮下接種した。腫瘍が定着した場合（１００ｍｍ３）、治療を、週に２回、腹腔内注射により、アイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ２１５８０、または３つの活性化可能抗体のうちの１つを５ｍｇ／ｋｇで用いて開始した。腫瘍増殖を週２回モニターし、経時的な平均腫瘍体積±ｓ．ｅ．ｍ．として報告した。図１６に示すように、３つすべての活性化可能抗体が、Ｈ２２同系マウス腫瘍モデルにおいて親抗体ＴＹ２１５８０に匹敵する強力な抗腫瘍活性を示した。

【０２６４】

３ＬＬ肺癌モデルにおける抗腫瘍効果

Ｃ５７ＢＬ／６マウス（群あたりｎ＝１０、雌、６～８週齢）に、３ＬＬ（ＪＣＲＢ）マウス肺癌細胞を皮下接種した。腫瘍が定着した場合（７５ｍｍ３）、治療を、週に２回、腹腔内注射により、アイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ２１５８０、または３つの活性化可能抗体のうちの１つを用いて開始した。腫瘍増殖を週２回モニターし、経時的な平均腫瘍体積±ｓ．ｅ．ｍ．（図１７Ａ）及び個々の腫瘍増殖曲線（図１７Ｂ）を評価した。図１７Ａ～Ｂに示すように、３つすべての活性化可能抗体が、３ＬＬ同系マウス腫瘍モデ

ルにおいて親抗体ＴＹ２１５８０に匹敵する強力な抗腫瘍活性を示した。

【０２６５】

薬物動態分析

薬物動態研究を、生後約８週間の雌のＢＡＬＢ／ｃマウスにおいて実行した。１群あたり３匹のマウスに、試験品を１０ｍｇ／ｋｇで腹腔内注射した。血液試料（試料あたり約５０ｕｌ）を、投薬から３、６、２４、４８、９６、及び１６８時間後に採取した。ブランク対照血液を、抗体を投与されていない３匹の未処置の雌のマウスから採取した。各試験抗体の血清濃度をＥＬＩＳＡによって測定し、抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃを捕捉に使用し、ＨＲＰ標識抗ヒトＩｇＧ（Ｆａｂ特異的）抗体（Ｓｉｇｍａ）を検出に使用した（図１８Ａ～Ｃ）。親抗体ＴＹ２１５８０について収集された以前のデータと比較して、活性化可能抗体ＴＹ２２４０１（図１８Ａ）、ＴＹ２２４０２（図１８Ｂ）、及びＴＹ２２４０４（図１８Ｃ）は、はるかに遅いクリアランス時間及びはるかに長い半減期を有した。ＴＹ２２４０１は１９６時間の半減期を有し、１６８時間での薬物濃度は約５５μｇ／ｍＬであった。ＴＹ２２４０２は１３４時間の半減期を有し、１６８時間での薬物濃度は約４０μｇ／ｍＬであった。ＴＹ２２４０４は２５４時間の半減期を有し、１６８時間での薬物濃度は約４５μｇ／ｍＬであった。比較すると、親抗体ＴＹ２１５８０は１０７時間の半減期を有し、１６８時間での薬物濃度は約１７μｇ／ｍＬであった。

【０２６６】

反復投与毒性試験

ＮＯＤマウスにおける糖尿病発症年齢に対するＴＹ２１５８０の効果を評価しているときに、高投与量のＴＹ２１５８０はＮＯＤの動物の死亡につながり得るが、正常なＢＡＬＢ／ｃマウスでは起こらないことを見出した。ここで、ＮＯＤマウスモデルを使用して、ＴＹ２１５８０の安全性と比較して、活性化可能抗体の安全性を評価した。ＮＯＤマウス（群あたりｎ＝５、雌、６週齢）を、０、３、７、及び１２日目に、腹腔内注射により、５０ｍｇ／ｋｇでアイソタイプ対照抗体、親抗体ＴＹ２１５８０、または３つの活性化可能抗体のうちの１つを用いて治療した。ＴＹ２１５８０治療群では、３回目の投薬後に１匹が死亡し、４回目の投薬後に３匹が死亡した。図１９に示すように、アイソタイプ対照または３つの活性化可能抗体のいずれかで治療されたすべての動物は、研究の終了時に生存しており、健康であった。これらのデータは、活性化可能抗体が、マウスにおいて許容できる安全性／毒性プロファイルを有し、かつ、ＮＯＤマウスにおいて、活性化可能抗体が親抗体ＴＹ２１５８０よりもはるかに安全であることを示した。

【０２６７】

実施例５：ＣＤ１３７を標的化する活性化可能抗体の構築及び検証

ヒトＣＤ１３７を標的化する活性化可能抗体を、上記実施例３に記載される抗ＣＴＬＡ４活性化可能抗体の開発で使用されたスキームと同様に開発した。親ＣＤ１３７抗体のＦａｂ断片（図２０Ａ）またはｓｃＦｖ（図２０Ｂ）を、Ａｇａ２タンパク質への融合を介して、酵母の表面上に提示させ、それらのＣＤ１３７に結合する能力を、フローサイトメトリーによって確認した。親ＣＤ１３７抗体（ＴＹ２１２４２）についてのＶＨ及びＶＬ配列を以下に列挙する（また、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ国際出願第ＰＣＴ／ＣＮ２０１７／０９８３３２号も参照されたい）：

抗ＣＤ１３７重鎖可変領域（配列番号４９）：

ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＳＬＳＴＧＧＶＧＶＧＷＩＲＱＡＰＧＫＧＬＥＷＬＡＬＩＤＷＡＤＤＫＹＹＳＰＳＬＫＳＲＬＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＬＹＬＱＬＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＧＧＳＤＴＶＩＧＤＷＦＡＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ

抗ＣＤ１３７軽鎖可変領域（配列番号５０）：

ＤＩＱＬＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＳＩＧＳＹＬＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＤＡＳＮＬＥＴＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＧＹＹＬＷＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ．

【０２６８】

酵母ライブラリーを、軽鎖のＮ末端に融合されたＣＰＬをもしいて構築し、ＦＡＣＳベースのスクリーニングプロセスに供した。第４または第５の選別ラウンドからの単一クローン（図２１）を選択培地に播種し、切断媒介型活性化抗原結合の確認のために個々に増殖させた。図２２Ａ～Ｂに示すように、選択されたＣＤ１３７活性化可能抗体のクローンは、マスキングペプチドの存在下では抗原に対する結合をほとんど示さなかったが、抗原への結合は、酵母細胞がＴＥＶプロテアーゼで処理されて、マスキングペプチドを除去した場合に、劇的に増加した。

【０２６９】

ＣＴＬＡ４活性化可能抗体で観察されたように、特定されたマスキング配列はいくつかの群に分けることができ、選別ラウンドによって明確な濃縮を示した。マスキングペプチド配列の７つの群を、インバリアント切断ペプチド配列と一緒に表９に列挙する。これらの配列群（ＴＹ２２５９４、ＴＹ２２５９５、ＴＹ２２５９６、ＴＹ２２５９８、ＴＹ２２５９９）は、２つの固定されたＣｙｓ残基の間のループにＮＮＫコドンを含有するＣＰＬ０１１ライブラリーに由来していた。興味深いことに、すべてのこれらの配列群には、ループ内に２つ以上のＡｒｇ残基があり、マスキングペプチドと親抗体のＣＤＲとの間に電荷間相互作用が関与し得ることを示唆している。実際に、ＶＨ　ＣＤＲ２及びＶＨ　ＣＤＲ３には負帯電Ａｓｐ残基がある。

表９：マスキングペプチド配列

試料ＩＤ：	マスキング＋切断ペプチド配列：
ＴＹ２２５８６	ＥＶＧＳＹＰＴＤＬＤＡＣＡＤＡＰＮＨＣＨＦＳＧＲＳＡＧＧ ＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ （配列番号４０）
ＴＹ２２５９１	ＥＶＧＳＹＳＳＴＨＡＨＣＨＨＳＰＡＮＣＩＳＳＧＲＳＡＧＧ ＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ （配列番号４１）
ＴＹ２２５９４	ＥＶＧＳＹＤＴＤＹＤＦＣＰＩＬＲＨＲＣＤＳＳＧＲＳＡＧＧ ＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ （配列番号４２）
ＴＹ２２５９５	ＥＶＧＳＹＮＤＹＮＹＨＣＫＷＲＰＳＲＣＨＮＳＧＲＳＡＧＧ ＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ （配列番号４３）
ＴＹ２２５９６	ＥＶＧＳＹＹＨＤＹＤＤＣＲＶＬＰＲＲＣＦＮＳＧＲＳＡＧＧ ＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ （配列番号４４）
ＴＹ２２５９８	ＥＶＧＳＹＳＮＮＦＡＳＣＬＷＲＨＲＳＣＡＤＳＧＲＳＡＧＧ ＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ （配列番号４５）
ＴＹ２２５９９	ＥＶＧＳＹＴＤＮＹＤＹＣＰＲＬＲＲＫＣＹＨＳＧＲＳＡＧＧ ＧＧＳＰＬＧＬＡＧＳＧＧＳ （配列番号４６）

【０２７０】

次いで、マスキング配列及びインバリアント切断配列を、哺乳動物細胞でＩｇＧ４分子が完全に発現された状態で試験した。それらの発現レベルは、親抗体と同様であり、タンパク質Ａ樹脂後のそれらの精製収率もまた同様であり、マスキングペプチド及び切断ペプチドの存在が哺乳動物細胞における抗体発現に悪影響を及ぼさないことを示唆した。

【０２７１】

次いで、マスキング効率を、フローサイトメトリーによって測定した。簡単に言うと、それらの表面にヒトＣＤ１３７を提示する酵母細胞をＰＢＳＡ緩衝液で２回洗浄し、５０μＬ（１×１０＾６）の細胞を、９６ウェルプレートの各ウェルに分配した。次いで、細胞を抗体の３倍の系列希釈物と氷上で１時間インキュベートし、ＰＢＳＡ緩衝液で１回洗浄し、次いで、１００μＬのＰＥ結合マウス抗ヒトＦｃ（１μｇ／ｍｌ）と氷上で３０分間インキュベートした。次いで、フローサイトメトリー（Ｂｅｃｋｍａｎ（登録商標）ＣｙｔｏＦｌｅｘ）による分析の前に、細胞を１回洗浄した。図２３及び表１０に示すように、親抗体ＴＹ２１２４２と比べて、すべての活性化可能抗体は、細胞表面上のヒトＣＤ１３７への劇的に減少した結合を示し、計算されたマスキング効率は、ＴＹ２２５９６の２０倍から、ＴＹ２２５８６、ＴＹ２２５９５及びＴＹ２２５９９の３００倍超までの範囲であった。これらの結果は、酵母上で提示されたＣＰＬライブラリーから特定されたマスキングペプチドが、哺乳動物細胞で発現される場合、それらのマスキング効率を維持することを示した。

表１０：ＣＤ１３７活性化可能抗体のマスキング効率

試料ＩＤ：	EC_{50}	
	K_D（ｎＭ）：	マスキング効率：
ＴＹ２１２４２	０．２８	１．０
ＴＹ２２５８６	低すぎる＊	非常に高い
ＴＹ２２５９１	１０．８	３８．３
ＴＹ２２５９４	２３．６	８３．７
ＴＹ２２５９５	１０６．８	３７８．７
ＴＹ２２５９６	５．８６	２０．８
ＴＹ２２５９８	８．６１	３０．５
ＴＹ２２５９９	９８．１	３４７．９

低すぎる＝結合が弱すぎるため、このアッセイでは検出不能であった。

【０２７２】

まとめると、データは、複数の強力なマスキングペプチドが、本明細書に記載の方法を使用して各標的抗体に対して成功裏に発見されることを示した。

【０２７３】

実施例６：ＣＴＬＡ４を標的化する活性化可能抗体のマスキング効率に及ぼすマスキングペプチド長の効果

２つの活性化可能抗体、ＴＹ２２４０２及びＴＹ２２４０４を選択して、マスキングペプチドの長さに対するマスキング効率の依存性を試験し、それらの特定の用途に適合させた。ＴＹ２２４０２及びＴＹ２２４０４のマスキングペプチドを、Ｎ末端から残基を除去することによって２１残基から１６または１２残基に短縮し、マスキングペプチド中の第１のシステイン残基の前に５または２残基のみを残した（表１１）。これらの活性化可能抗体を哺乳動物細胞から発現及び精製して、それらのマスキング効率を実施例３に記載のとおり測定し、親抗体ＴＹ２１５８０と比較した。２つの実験からの結果は、第１のシステイン残基の前に２～１１残基の範囲の長さを有する異なるマスキングペプチドを使用してこれらの活性化可能抗体を作製し、抗体のマスキング効率を調節することができることを示した（図２４Ａ及び２４Ｂ；表１２及び１３）。これは、コアマスキングモチーフがシステインループ及びそのすぐ隣接する残基を含有し、マスキング効率を維持するのに十分であることを示唆すると考えられる。

表１１：異なるペプチド長を有するマスキングペプチド

試料ＩＤ：	マスキング＋切断ペプチド配列（下線）：
ＴＹ２２４０２	EVGSYIVHHSDCDAFYPYCDSSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS（配列番号１１８）
ＴＹ２２７７５	EVGHSDCDAFYPYCDSSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS（配列番号１１９）
ＴＹ２２８６４	EDCDAFYPYCDSSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS（配列番号１２０）
ＴＹ２２４０４	EVGSYPNPSSDCVPYYYACAYSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS（配列番号１２１）
ＴＹ２２７７６	EVGSSDCVPYYYACAYSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS（配列番号１２２）
ＴＹ２２８７１	EDCVPYYYACAYSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS（配列番号１２３）

【０２７４】

表１２は、図２４Ａ中の抗体のマスキング効率を示す。表１３は、図２４Ｂ中の抗体のマスキング効率を示す。

表１２：異なるマスキングペプチド長を有する抗体のマスキング効率

試料ＩＤ	ＥＣ５０（ｎＭ）	マスキング効率
ＴＹ２１５８０	０．２２２３	
ＴＹ２２４０２	５３．９９	２４３
ＴＹ２２７７５	３７．３１	１６８
ＴＹ２２４０４	６８．４０	３０８
ＴＹ２２７７６	６５．９０	２９６

表１３：異なるマスキングペプチド長を有する抗体のマスキング効率

試料ＩＤ	ＥＣ５０（ｎＭ）	マスキング効率
ＴＹ２１５８０	０．２１２５	
ＴＹ２２４０２	１１５．６	５５４
ＴＹ２２８６４	１１７	５５０
ＴＹ２２４０４	１２１．５	５７２
ＴＹ２２８７１	８８．０９	４１４

【０２７５】

実施例７：ＣＴＬＡ４を標的化する活性化可能抗体のマスキング効率に及ぼす切断ペプチド長の効果

ＴＹ２２４０４を選択して、切断ペプチドの長さに対するマスキング効率の依存性を試験し、それらの特定の用途に適合させた。ＴＹ２２４０４の切断ペプチドを、様々な長さに短縮した（表１４）。活性化可能抗体を哺乳動物細胞から発現及び精製して、それらのマスキング効率を実施例３に記載のとおり測定し、親抗体ＴＹ２１５８０と比較した。図２５及び表１５に示すように、結果は、５～２０残基の範囲の長さを有する異なる切断ペプチドを使用してこれらの活性化可能抗体を作製し、抗体のマスキング効率を調節することができることを示した。マスキングモチーフと切断モチーフとの間の強い相関は顕著であり、ＴＹ２３２９１のマスキング効率は、ペプチド長が４１～１７個のアミノ酸に短縮されている場合、ＴＹ２２４０４と比較して少なくとも３０倍増強されている。これらの結果は、いくつかの新規マスキングペプチドが設計及び操作され得ることを示す。さらに、マスキングモチーフと切断モチーフとの間のカップリングをさらに探究することができる。

表１４：異なる切断ペプチド長を有するマスキングペプチド

試料ＩＤ	ペプチド名	マスキング＋切断ペプチド配列（下線）：
ＴＹ２２４０４		EVGSYPNPSSDCVPYYYACAYSGRSAGGGGTPLGLAGSGGS（配列番号１２１）
ＴＹ２３２８６		EVGSYPNPSSDCVPYYYACAYSGRSAPLGLA（配列番号１３０）
ＴＹ２３２８９		EDCVPYYYACAYSGRSAPLGLA（配列番号１３１）
ＴＹ２３２８０		EDCVPYYYACAYSGRSA（配列番号１３２）
ＴＹ２３２９１		EDCVPYYYACAYPLGLA（配列番号１３３）

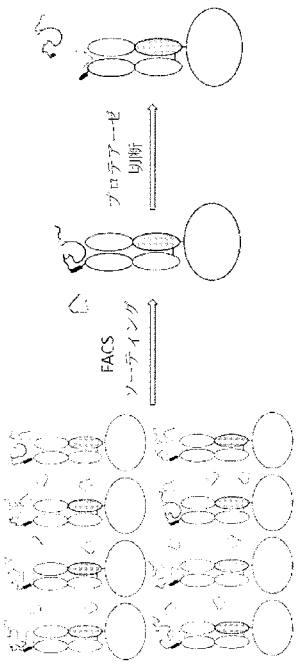
【０２７６】

表１５は、図２５中の抗体のマスキング効率を示す。

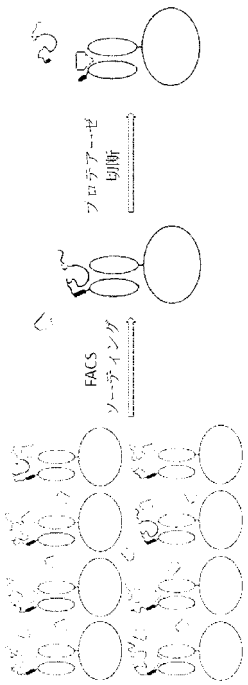
表１５：異なる切断ペプチド長を有する抗体のマスキング効率

試料ＩＤ	ＥＣ５０（ｎＭ）	マスキング効率
ＴＹ２１５８０	０．２５０５	
ＴＹ２２４０４	１１７．４	４６９
ＴＹ２３２８６	１４９６	５９７２
ＴＹ２３２８９	１３３．２	５３２
ＴＹ２３２８０	２９５２	１１７８４
ＴＹ２３２９１	３６５６	１４５９５

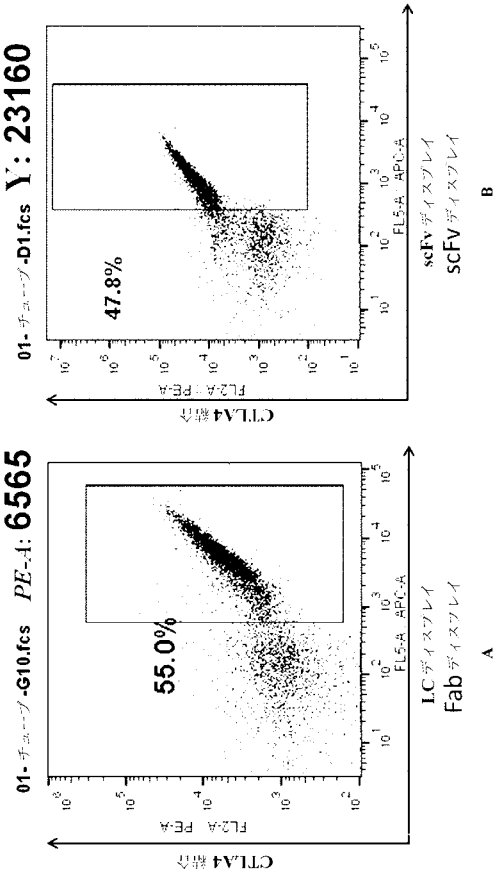
【図１】



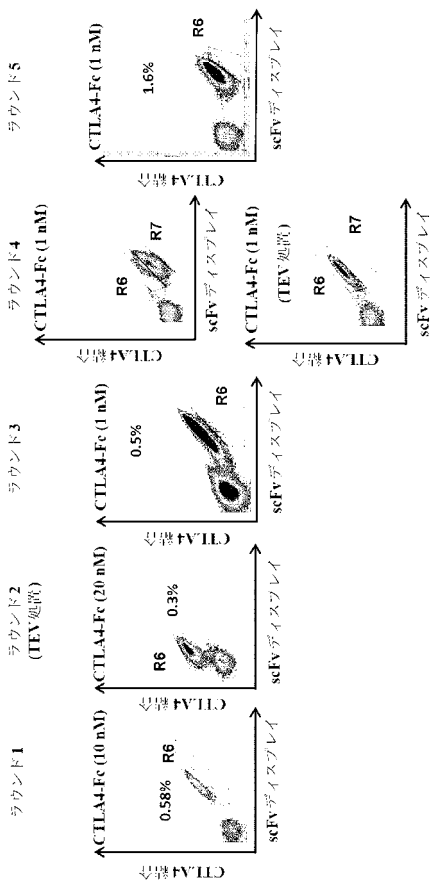
【図２】



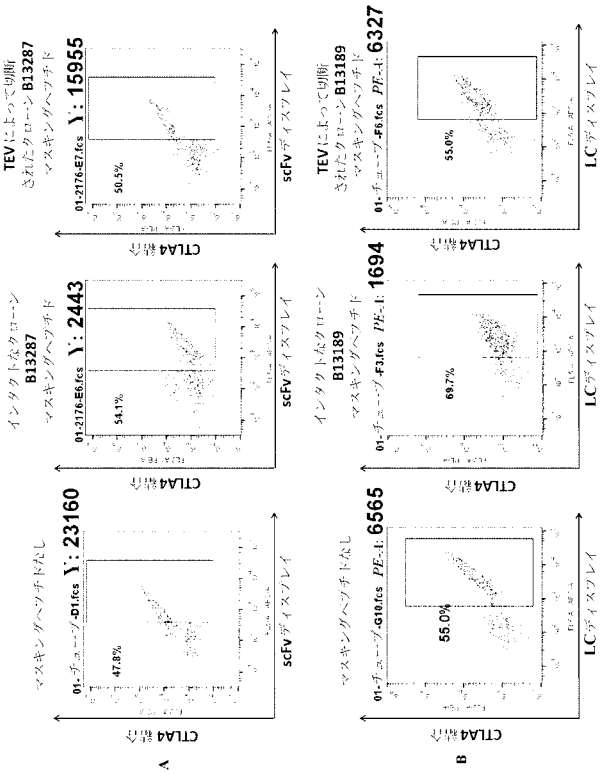
【図３】


01-チューブ-D1.fcs Y: 23160
47.8%
01-チューブ-G10.fcs PE-A: 6565
55.0%
CTLA4 結合
scFv ディスプレイ
LC ディスプレイ
Fab ディスプレイ
A
B

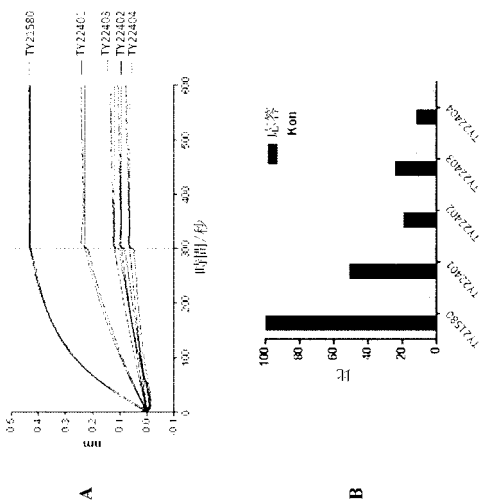
【図４】


ラウンド1
ラウンド2 (TEV処置)
ラウンド3
ラウンド4
ラウンド5
CTLA4-Fc (10 nM)
CTLA4-Fc (20 nM)
CTLA4-Fc (1 nM)
CTLA4-Fc (1 nM) (TEV処置)
0.58%
0.3%
0.5%
1.6%
R6
R7
CTLA4 結合
scFv ディスプレイ

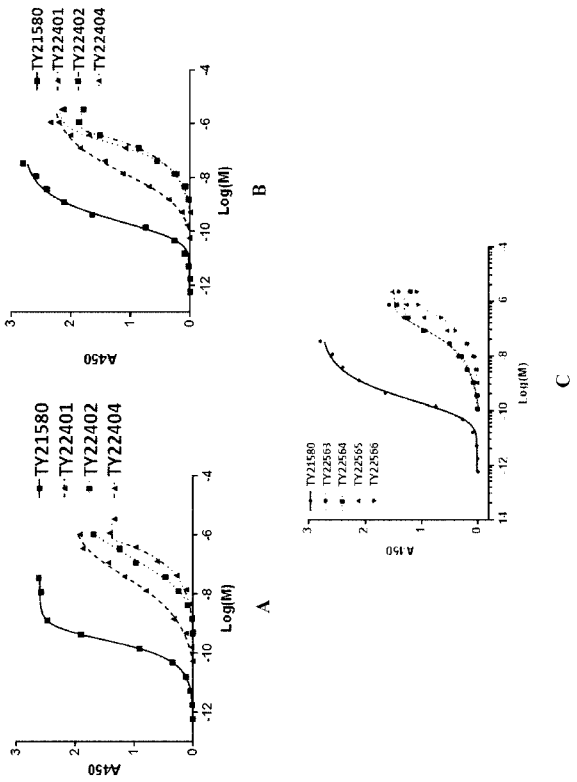
【図５】


インタクトなクローン B13287 マスキングペプチド
TEVによって切断されたクローン B13287 マスキングペプチド
インタクトなクローン B13189 マスキングペプチド
TEVによって切断されたクローン B13189 マスキングペプチド
マスキングペプチドなし
Y: 23160
Y: 2443
Y: 15955
PE-A: 1694
PE-A: 6565
PE-A: 6327
47.8%
54.1%
50.5%
69.7%
55.0%
55.0%
CTLA4 結合
scFv ディスプレイ
LC ディスプレイ
A
B

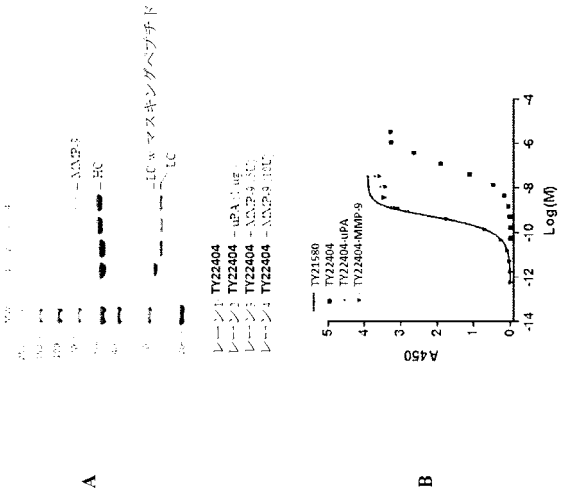
【図６】


TY23580
TY22403
TY22402
TY22404
nm
時間 / 秒
応答
Kon
TY23580
TY22403
TY22402
TY22404
A
B

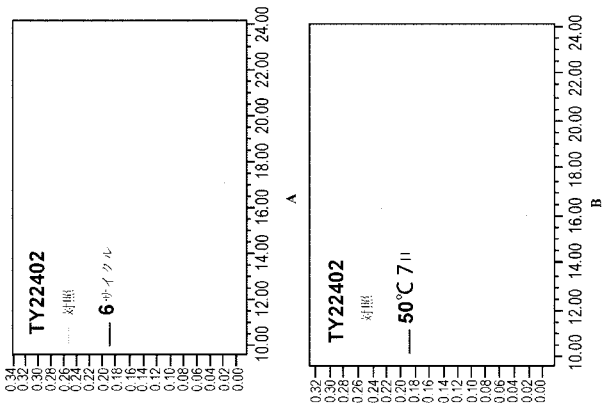
【図７】


TY21580
TY22401
TY22402
TY22404
A450
Log(M)
A
B
C
TY22563
TY22564
TY22565
TY22566

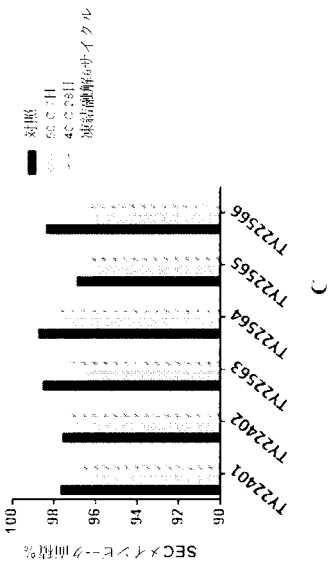
【図８】


A
B
TY21580
TY22404
TY22404-uPA
TY22404-MMP-9
A450
Log(M)

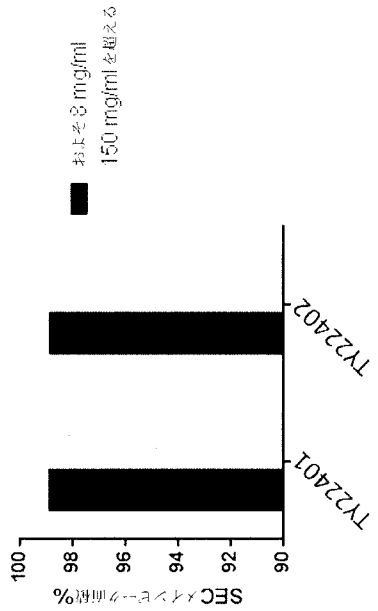
【図９－１】


TY22402
対照
6サイクル
50℃ 7日
A
B

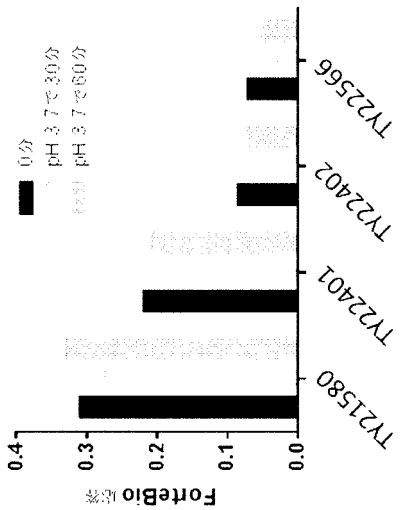
【図９－２】


対照
凍結融解6サイクル
TY22401
TY22402
TY22563
TY22564
TY22565
TY22566
C

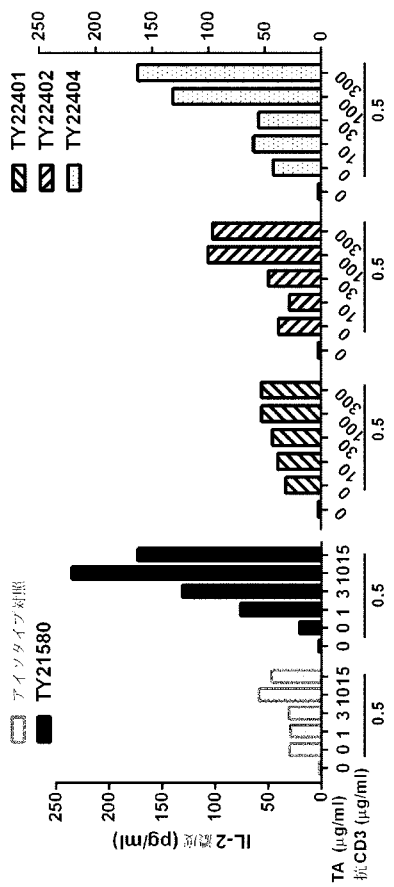
【図１０】



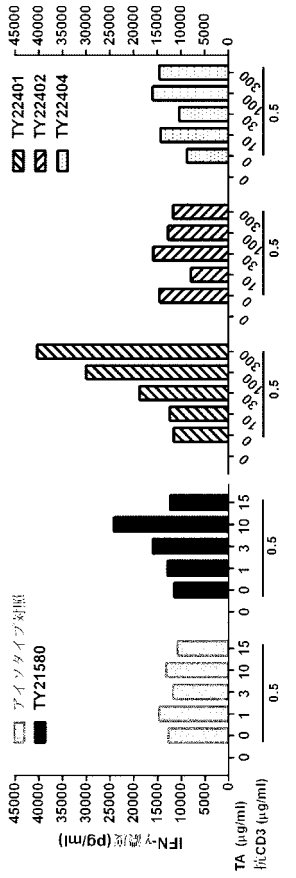
【図１１】



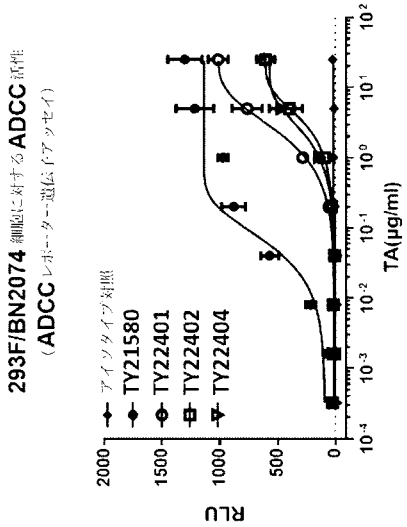
【図１２Ａ】



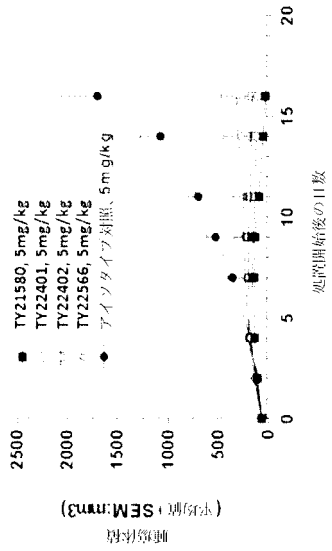
【図１２Ｂ】



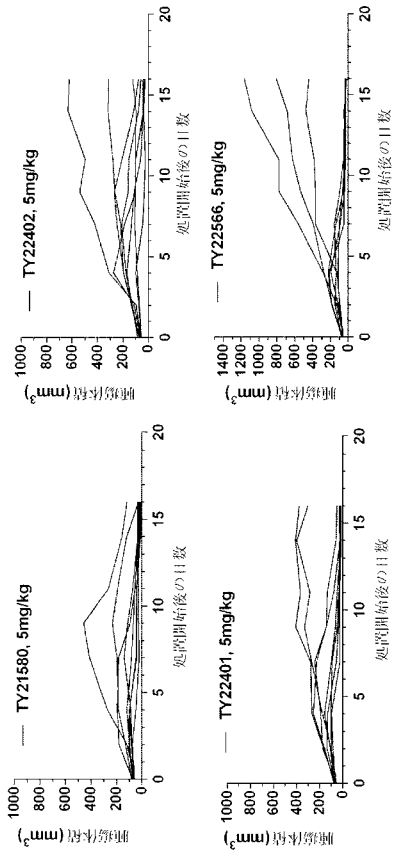
【図１３】



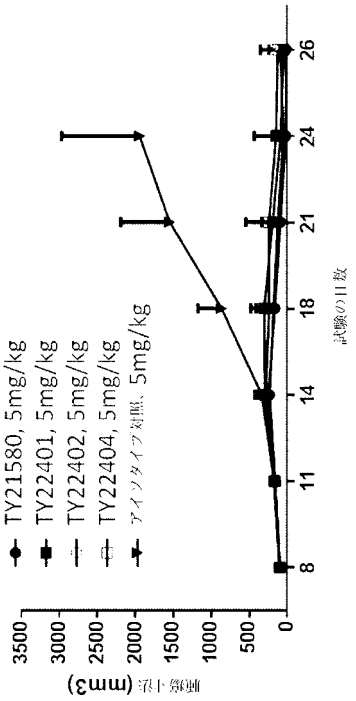
【図１４Ａ】



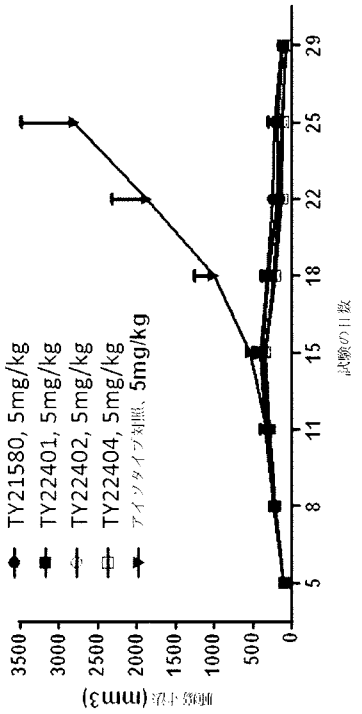
【図１４Ｂ】



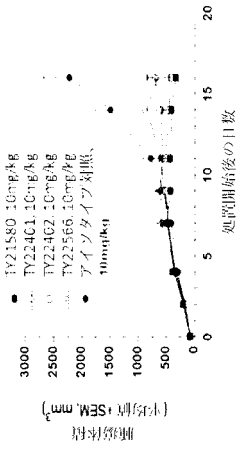
【図１５】



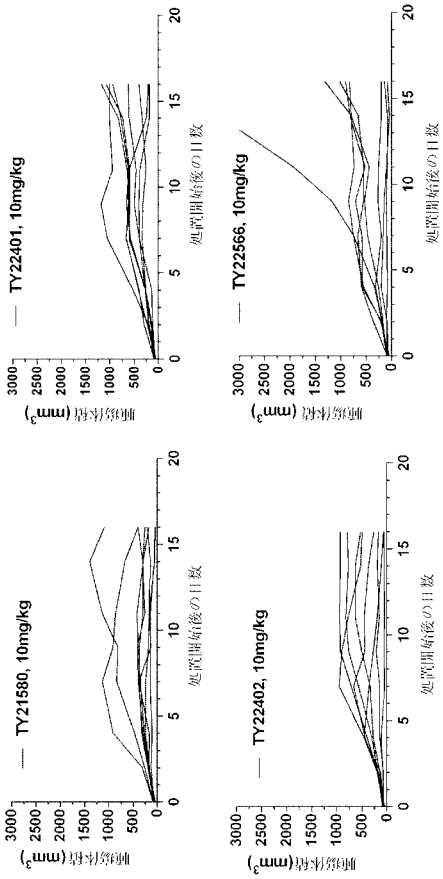
【図１６】



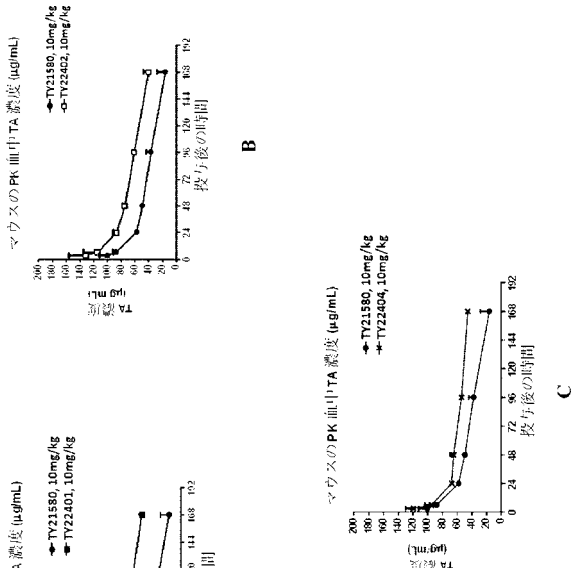
【図１７Ａ】



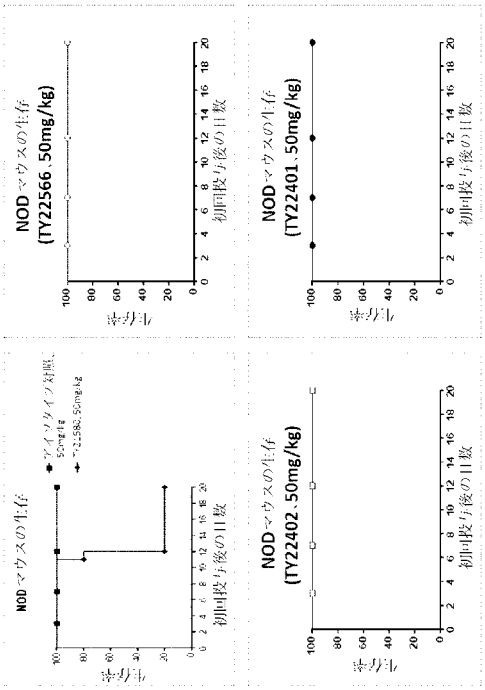
【図１７Ｂ】



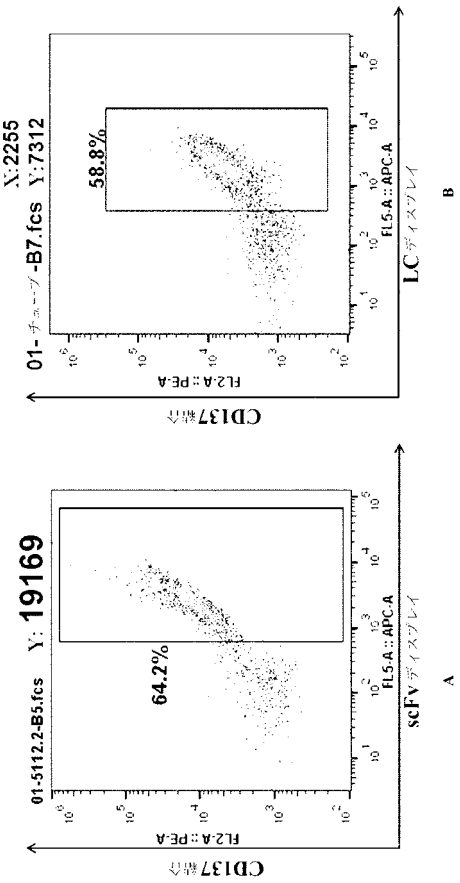
【図１８】



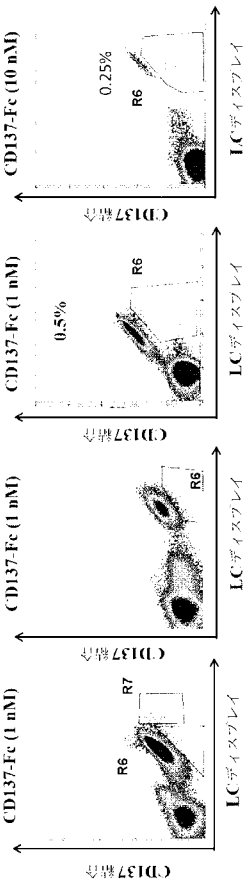
【図１９】



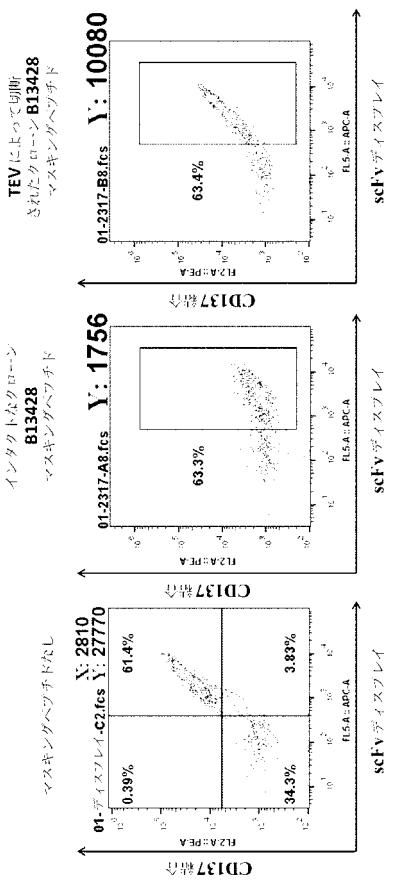
【図２０】



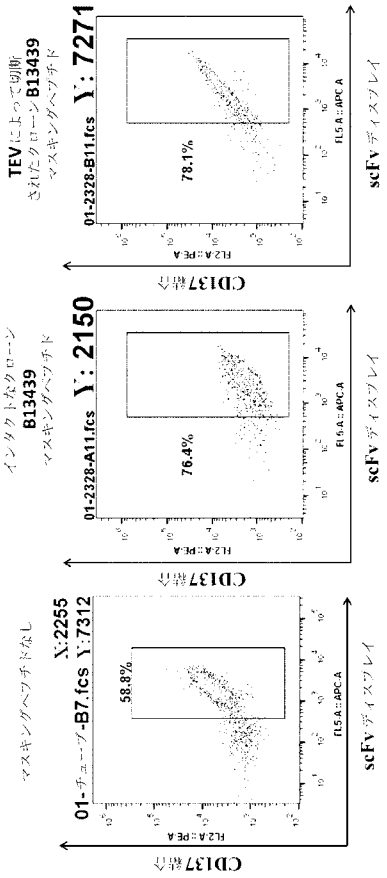
【図２１】



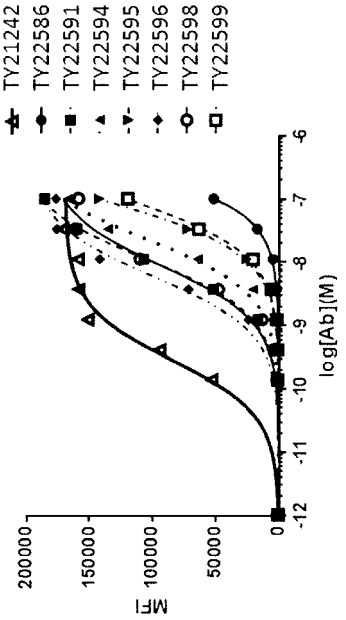
【図２２Ａ】



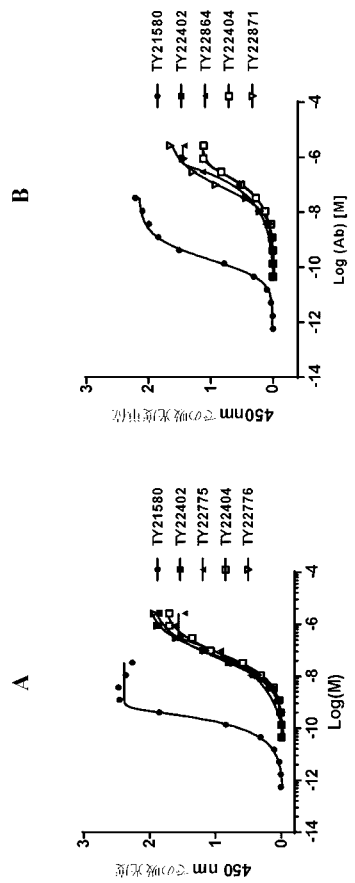
【図２２Ｂ】



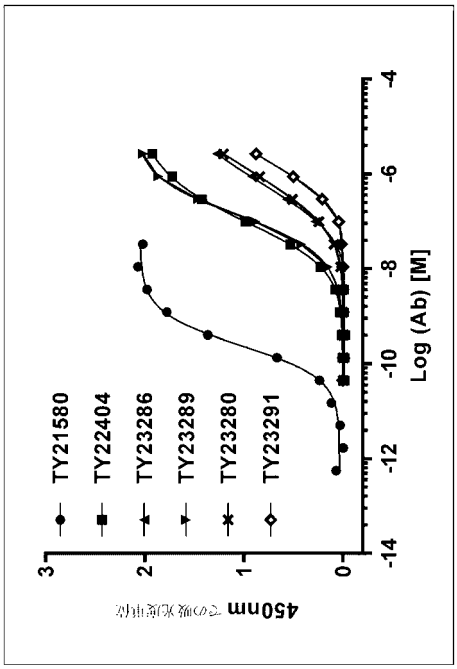
【図２３】



【図２４】



【図２５】



【配列表】
2021512122000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/074581

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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; A61P

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)

TWTXT;CNTXT;DWPI;EPTXT;WOTXT;USTXT;JPTXT;NCBI;CNKI;GOOGLE SCHOLAR;ISI-WEB OF SCIENCE; ELSEVIER: library,cleavable,cut,cleave,XmCXnCXo, masking, TBM, moiety, FP,target, screen, binding, CM, MM, polypeptide,NNK,TGY,antibody,EVGSY,SEQUENCE BLASTING,cysteine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009025846 A2 (UNIV CALIFORNIAET AL.) 26 February 2009 (2009-02-26) See the whole document, especially claims 1-40, description, paragraphs 28, 140, 148, 153, 156-158, 166, 222, 238, 241, 268, 269, table 4	1-3, 5-97
Y	WO 2009025846 A2 (UNIV CALIFORNIAET AL.) 26 February 2009 (2009-02-26) See the whole document, especially claims 1-40, description, paragraphs 28, 140, 148, 153, 156-158, 166, 222, 238, 241, 268, 269, table 4	4
Y	WO 03074678 A2 (DYAX CORPET AL.) 12 September 2003 (2003-09-12) See the whole document, especially claims 11 and 32, description, pages 11 and 19	4
A	WO 2016200645 A1 (WANG TIANXIN) 15 December 2016 (2016-12-15) See the whole document	1-97

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
28 April 2019	**08 May 2019**
Name and mailing address of the ISA/CN **National Intellectual Property Administration, PRC** **6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing** **100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer **TIAN,Yuan** Telephone No. **62411047**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/074581

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.: **94-97**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[2] The subject matter of claims 94-97 relates to a treatment method of the human or animal body according to the criteria set out in Rule 39.1(iv). However, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compositions.

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).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/074581

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2009025846	A2	26 February 2009	EP	2190861	A4	30 March 2011
				JP	2015110619	A	18 June 2015
				GB	2455449	A	17 June 2009
				US	8518404	B2	27 August 2013
				JP	2010536370	A	02 December 2010
				US	2016122425	A1	05 May 2016
				US	8541203	B2	24 September 2013
				US	10077300	B2	18 September 2018
				WO	2009025846	A3	14 May 2009
				AU	2008289441	A1	26 February 2009
				US	2012244154	A1	27 September 2012
				GB	0902572	D0	01 April 2009
				JP	6035009	B2	30 November 2016
				US	2014045195	A1	13 February 2014
				CA	2697032	A1	26 February 2009
				US	2012237977	A1	20 September 2012
				JP	2017108737	A	22 June 2017
				US	8529898	B2	10 September 2013
				US	9169321	B2	27 October 2015
				EP	2190861	A2	02 June 2010
				US	2009304719	A1	10 December 2009
				US	2012237512	A1	20 September 2012
WO	03074678	A2	12 September 2003	AU	2003217906	A1	16 September 2003
				EP	1523574	A4	30 November 2005
				US	2003186223	A1	02 October 2003
				JP	2005519595	A	07 July 2005
				CA	2477947	A1	12 September 2003
				WO	03074678	A3	24 February 2005
				EP	1523574	A2	20 April 2005
WO	2016200645	A1	15 December 2016	US	2016362469	A1	15 December 2016
				CN	108431018	A	21 August 2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12P	*21/02*	*(2006.01)*	C12P	21/02	C	4C085
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C07K	16/18		4H045
A61K	*45/00*	*(2006.01)*	A61K	45/00		
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	T	
A61P	*35/02*	*(2006.01)*	A61K	39/395	E	
A61K	*48/00*	*(2006.01)*	A61P	35/02		
A61K	*38/16*	*(2006.01)*	A61K	48/00		
A61K	*38/10*	*(2006.01)*	A61K	38/16		
A61K	*38/08*	*(2019.01)*	A61K	38/10		
A61K	*47/65*	*(2017.01)*	A61K	38/08		
A61P	*35/04*	*(2006.01)*	A61K	47/65		
C40B	*30/04*	*(2006.01)*	A61P	35/04		
G01N	*33/50*	*(2006.01)*	C40B	30/04		
G01N	*33/15*	*(2006.01)*	G01N	33/50	Z	
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	G01N	33/15	Z	
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/12		
			C12N	15/13		

(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,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,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,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

(72)発明者　ルオ，　ピーター　ペイチー
中華人民共和国　チャンスー，　スーチョウ，　スーチョウ　インダストリアル　パーク，　シンフー　ストリート　２１８，　ビルディング　シー１４，　４階，　シー／オー　アダジーン　インコーポレイテッド
(72)発明者　トゥー，　ファンヨン
中華人民共和国　チャンスー，　スーチョウ，　スーチョウ　インダストリアル　パーク，　シンフー　ストリート　２１８，　ビルディング　シー１４，　４階，　シー／オー　アダジーン　インコーポレイテッド

Ｆターム(参考)　2G045 AA40 DA37 FB03
4B064 AG27 CA19 CC15 CC24
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA44
4C076 AA12 AA17 AA22 AA95 BB11 CC27 EE41 EE59 FF31
4C084 AA02 AA07 AA13 AA19 BA01 BA17 BA18 BA19 BA23 MA02
MA17 MA21 MA22 MA23 MA24 MA35 MA37 MA38 MA43 MA66
NA05 NA13 ZB072 ZB262 ZB272 ZC751
4C085 AA13 AA14 BB31 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41 BB43

CC22 CC23 DD62 EE01 EE03 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA28 FA74