

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-511190
(P2025-511190A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全168頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-558027(P2024-558027)	(71)出願人	510046457		
(86)(22)出願日	令和5年3月31日(2023.3.31)		サイトムエックス セラピューティクス		
(85)翻訳文提出日	令和6年11月15日(2024.11.15)		, インク.		
(86)国際出願番号	PCT/US2023/065191		C y t o m X T h e r a p e u t i c		
(87)国際公開番号	WO2023/192973		s , I n c .		
(87)国際公開日	令和5年10月5日(2023.10.5)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4		
(31)優先権主張番号	63/326,692		0 8 0 , サウス サンフランシスコ, オ		
(32)優先日	令和4年4月1日(2022.4.1)		イスター ポイント ブールバード 1 5		
(33)優先権主張国・地域又は機関			1 , スイート 4 0 0		
	米国(US)		1 5 1 O y s t e r P o i n t B o		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		u l e v a r d , S u i t e 4 0 0 ,		
	,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),		S o u t h S a n F r a n c i s c o		
	EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(		, C a l i f o r n i a , 9 4 0 8 0		
	AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,		U . S . A .		
	FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(74)代理人	100198915		
	最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 活性化可能な多重特異性分子及びその使用方法

(57)【要約】

第1の標的に特異的に結合する第1の標的結合タンパク質 (T B 1) ; 第2の標的に特異的に結合する第2の標的結合タンパク質 (T B 2) であって、前記 T B 2 は前記 T B 1 に直接的にまたは間接的にカップリングされている、前記 T B 2 ; 前記 T B 1 の前記第1の標的への結合を阻害し、切断可能な部分を介して直接的にまたは間接的に、例えば、1つ以上のリンカーまたは他の構成要素を介して前記 T B 1 にカップリングされた第1のマスキング部分 (M M 1) ; 前記 T B 2 の前記第2の標的への結合を阻害し、切断可能な部分を介して前記 T B 1 もしくは前記 T B 2 のいずれかに直接的または間接的にカップリングされた第2のマスキング部分 (M M 2) ; 及び切断可能な部分を介して前記 T B 1 もしくは前記 T B 2 のいずれかに直接的にまたは間接的にカップリングされた半減期延長部分 (E M) ; を含む、活性化可能なタンパク質。

【選択図】 図 1

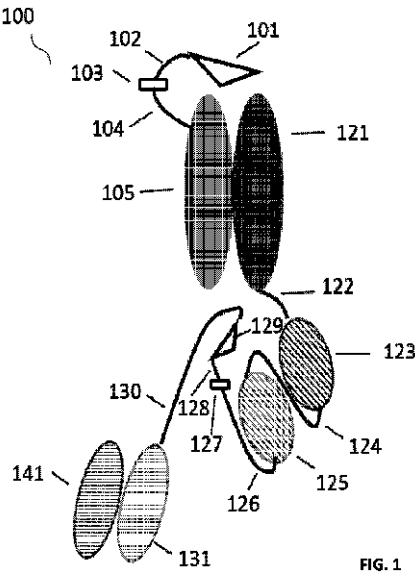


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性化可能なタンパク質であって、

第 1 の標的に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメイン（A B 1）であって、前記 A B 1 は、第 1 の重鎖可変ドメイン（H V D 1）及び第 1 の軽鎖可変ドメイン（L V D 1）を含む、前記 A B 1 と；

第 2 の標的に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメイン（A B 2）であって、前記 A B 2 は、第 2 の重鎖可変ドメイン（H V D 2）及び第 2 の軽鎖可変ドメイン（L V D 2）を含み、前記 A B 2 は、前記 H V D 1 の C 末端もしくは前記 L V D 1 の C 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、前記 A B 2 と；

第 1 の切断可能な部分（C M 1）を介して直接的にまたは間接的にいずれかで前記 A B 1 にカップリングされた第 1 のマスキング部分（M M 1）であって、前記 M M 1 は、前記第 1 の標的に対する前記 A B 1 の結合を阻害する、前記 M M 1 と；

第 2 のマスキング部分（M M 2）に直接的にまたは間接的にカップリングされた半減期延長部分（E M）と；を含み、

前記 E M は、前記 A B 1 または前記 A B 2 に第 2 の切断可能な部分（C M 2）を介して、直接的にまたは間接的にいずれかでカップリングされており、

前記 M M 2 は、前記 A B 2 の前記第 2 の標的への結合を阻害する、前記活性化可能なタンパク質。

【請求項 2】

前記 E M は、第 1 の断片結晶化可能（F c）ドメイン及び第 2 の F c ドメインによって形成される二量体である、請求項 1 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 3】

前記 E M は、前記 A B 1 または前記 A B 2 の C 末端であり、前記 E M は、前記 C M 2 を介して直接的にまたは間接的にいずれかでカップリングされている前記 A B 1 または前記 A B 2 の C 末端であり、前記 M M 1 は前記 A B 1 の N 末端である、請求項 1 または請求項 2 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 4】

活性化可能なタンパク質であって、

第 1 の標的に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメイン（A B 1）であって、前記 A B 1 は、第 1 の重鎖可変ドメイン（H V D 1）及び第 1 の軽鎖可変ドメイン（L V D 1）を含む、前記 A B 1 と；

第 2 の標的に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメイン（A B 2）であって、前記 A B 2 は、第 2 の重鎖可変ドメイン（H V D 2）及び第 2 の軽鎖可変ドメイン（L V D 2）を含み、前記 A B 2 は、前記 H V D 1 もしくは前記 L V D 1 の C 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、前記 A B 2 と；

第 1 の切断可能な部分（C M 1）及び任意選択で 1 つ以上のリンカーを介して前記 A B 1 にカップリングされた第 1 のマスキング部分（M M 1）であって、前記 M M 1 は、前記第 1 の標的に対する前記 A B 1 の結合を阻害する、前記 M M 1 と；

第 2 のマスキング部分（M M 2）に直接的にまたは間接的にカップリングされた半減期延長部分（E M）であって、前記 E M 及び前記 M M 2 は、第 2 の切断可能な部分（C M 2）及び任意選択で 1 つ以上のリンカーを介して前記 A B 1 または前記 A B 2 にカップリングされている、前記 E M と；を含み、

前記 M M 2 は、前記 A B 2 の前記第 2 の標的への結合を阻害する、前記活性化可能なタンパク質。

【請求項 5】

前記 C M 2 は、前記 M M 2 の N 末端であり、前記 M M 2 は、前記 E M の N 末端であり、前記 C M 2 は、前記 E M 及び前記 M M 2 が前記 C M 2 及び任意選択的に 1 つ以上のリンカーを介してカップリングされている前記 A B 1 または前記 A B 2 の C 末端である、請求項 4 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 6】

活性化可能なタンパク質であって、

第 1 の標的に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメイン（A B 1）であって、前記 A B 1 は、第 1 の重鎖可変ドメイン（H V D 1）及び第 1 の軽鎖可変ドメイン（L V D 1）を含む、前記 A B 1 と；

第 2 の標的に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメイン（A B 2）であって、前記 A B 2 は、第 2 の重鎖可変ドメイン（H V D 2）及び第 2 の軽鎖可変ドメイン（L V D 2）を含み、前記 A B 2 は、前記 H V D 1 もしくは前記 L V D 1 の C 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、前記 A B 2 と；

第 1 の切断可能な部分（C M 1）及び任意選択で 1 つ以上のリンカーを介して前記 A B 1 にカップリングされた第 1 のマスキング部分（M M 1）であって、前記 M M 1 は、前記第 1 の標的に対する前記 A B 1 の結合を阻害する、前記 M M 1 と；

第 1 の半減期延長部分（E M 1）及び第 2 の半減期延長部分（E M 2）の二量体を含む半減期延長部分（E M）と；を含み、

前記 E M 1 は、第 2 の切断可能な部分（C M 2）及び任意選択で 1 つ以上のリンカーを介して前記 A B 1 にカップリングされており、

前記 E M 2 は、第 2 のマスキング部分（M M 2）に直接的にまたは間接的にカップリングされており、

前記 M M 2 は、前記 A B 2 の前記第 2 の標的への結合を阻害する、前記活性化可能なタンパク質。

10

20

【請求項 7】

前記 C M 2 は、前記 E M 1 の N 末端であり、前記 C M 2 は、前記 A B 1 の C 末端である、請求項 6 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 8】

前記活性化可能なタンパク質は、少なくとも第 1 のポリペプチド及び第 2 のポリペプチドを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 9】

前記第 1 のポリペプチドは、N 末端から C 末端の順に、前記 M M 1、前記 C M 1、及び前記 V L D 1 を含む、請求項 8 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 10】

前記第 2 のポリペプチドは、前記 V H D 1、前記 V H D 2、前記 V L D 2、前記 C M 2、前記 M M 2、及び第 1 の F c ドメインを含み、前記活性化可能なタンパク質は、第 2 の F c ドメインを含む第 3 のポリペプチドを更に含む、請求項 8 ～ 9 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

30

【請求項 11】

前記第 2 のポリペプチドは、N 末端から C 末端の順に、前記 V H D 1、前記 V H D 2、前記 V L D 2、前記 C M 2、前記 M M 2、及び第 1 の F c ドメインを含む、請求項 10 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 12】

前記第 2 のポリペプチドは、N 末端から C 末端の順に、前記 V H D 1、前記 C M 2、前記 M M 2、及び第 1 の F c ドメインを含む、請求項 9 に記載の活性化可能なタンパク質。

40

【請求項 13】

前記第 2 のポリペプチドは、N 末端から C 末端の順に、前記 V H D 1、前記 C M 2、及び第 1 の F c ドメインを含む、請求項 9 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 14】

前記第 1 のポリペプチドは、前記 M M 1、前記 C M 1、前記 V L D 1、前記 V H D 2、及び前記 V L D 2 を含む、請求項 9 または 12 ～ 13 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 15】

前記第 1 のポリペプチドは、N 末端から C 末端の順に、前記 M M 1、前記 C M 1、前記

50

V L D 1、前記 V H D 2、及び前記 V L D 2 を含む、請求項 1 3 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 1 6】

前記第 1 のポリペプチドは、N 末端から C 末端の順に、前記 M M 1、前記 C M 1、前記 V L D 1、前記 V L D 2、及び前記 V H D 2 を含む、請求項 1 3 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 1 7】

前記タンパク質は、第 3 のポリペプチドを含み、前記第 3 のポリペプチドは、第 2 の F c ドメイン及び前記 M M 2 を含む、請求項 1 3 ～ 1 6 のいずれかに記載の活性化可能なタンパク質。

10

【請求項 1 8】

前記 M M 2 は、前記第 2 の F c ドメインの C 末端にリンカーを介して連結されている、請求項 1 7 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 1 9】

前記 M M 2 は、前記第 2 の F c ドメインの N 末端にリンカーを介して連結されている、請求項 1 7 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 2 0】

(i) M M 1 及び C M 1、

(i i) C M 1 及び V L D 1、

(i i i) V H D 1 及び V L D 2、

(i v) V H D 1 及び V H D 2、

(v) V H D 1 及び C M 2、

(v i) V L D 2 及び V H D 2、

(v i i) C M 2 及び M M 2、

(v i i i) C M 2 及び E M、

(i x) E M 及び M M 2、

(x) V L D 1 及び V H D 2、ならびに／または

(x i) V L D 1 及び V L D 2 をカップリングする、リンカーを更に含む、請求項 1 ～ 1 9 のいずれかに記載の活性化可能なタンパク質。

20

【請求項 2 1】

前記リンカーは、5 ～ 3 0、6 ～ 2 9、7 ～ 2 8、8 ～ 2 7、9 ～ 2 6、1 0 ～ 2 5、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、または 2 4 個のアミノ酸を有するペプチドである、請求項 1 8 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

30

【請求項 2 2】

前記第 1 の F c ドメインは、F c ドメインのホール変異体であり、前記第 2 の F c ドメインは、F c ドメインのノブ変異体である、請求項 2 及び 1 0 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 2 3】

前記 F c ドメインのホール変異体は、配列番号 2 の配列を含み、前記 F c ドメインのノブ変異体は、配列番号 1 の配列を含む、請求項 2 2 に記載の活性化可能なタンパク質。

40

【請求項 2 4】

前記 C M 2 は、前記 A B 1 の C 末端または前記 A B 2 の C 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、請求項 1 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 2 5】

前記 M M 2 は、前記 C M 2 の C 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、前記 M M 2 は、前記 E M の N 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、請求項 2 4 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 2 6】

前記 E M は、第 1 の半減期延長部分 (E M 1) 及び第 2 の半減期延長部分 (E M 2) の

50

二量体を含む、請求項 1 または請求項 2 4 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 2 7】

前記 C M 2 は、前記 E M 1 の N 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、請求項 2 6 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 2 8】

前記 C M 2 は、前記 M M 2 の N 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、前記 M M 2 は、前記 E M 1 の N 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、請求項 2 6 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 2 9】

前記 M M 2 は、前記 E M 2 の N 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、請求項 2 6 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 3 0】

前記第 1 の標的またはエピトープは、腫瘍関連抗原である、請求項 1 ～ 2 9 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 3 1】

前記腫瘍関連抗原は、ヒト上皮増殖因子受容体 2 (H E R 2) である、請求項 3 0 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 3 2】

前記 A B 1 は、トラスツズマブの F a b である、請求項 3 1 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 3 3】

前記 H V D 1 は、配列番号 2 7 の配列を含み、前記 L V D 1 は、配列番号 1 7 の配列を含む、請求項 3 1 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 3 4】

前記 A B 2 は、
F v に会合する免疫エフェクター細胞、
s c F v に会合する白血球、
s c F v に会合する T 細胞、
s c F v に会合する N K 細胞、
s c F v に会合するマクロファージ、または
s c F v に会合する単核細胞である、請求項 1 ～ 3 3 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 3 5】

前記 A B 2 は、抗 C D 3 イプシロン s c F v もしくは抗 C T L A - 4 s c F v であるか、またはそれに由来する、請求項 1 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 3 6】

前記 A B 2 は、抗 C D 3 イプシロン s c F v であるか、またはそれに由来する、請求項 3 5 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 3 7】

前記 H V D 2 は、配列番号 3 0 の配列を含み、前記 L V D 2 は、配列番号 3 1 の配列を含む、請求項 3 6 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 3 8】

前記 A B 1 は、抗 H E R 2 抗体であるか、またはそれに由来する、請求項 1 ～ 3 7 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 3 9】

前記 C M 1 及び前記 C M 2 は、それぞれ独立して、腫瘍微小環境内で上方制御されるプロテアーゼの基質を含む、請求項 1 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 4 0】

前記 A B 1 は、断片抗原結合 (F a b) である、請求項 1 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 4 1】

前記第 2 の標的は、共刺激分子である、請求項 1 ～ 4 0 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 4 2】

前記共刺激分子は、C D 3 である、請求項 4 1 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 4 3】

前記 C M 1 及び前記 C M 2 のそれぞれは、同じプロテアーゼの基質を含む、請求項 1 ～ 4 2 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

10

【請求項 4 4】

前記 C M 1 及び前記 C M 2 は、異なるプロテアーゼの基質を含む、請求項 1 ～ 4 2 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 4 5】

活性化可能な分子であって、

第 1 の標的に特異的に結合する第 1 の標的結合ドメイン (T B 1) と；

第 2 の標的に特異的に結合する第 2 の標的結合ドメイン (T B 2) であって、前記 T B 2 は、前記 T B 1 に直接的にまたは間接的にカップリングされている、前記 T B 2 と；

第 1 の切断可能な部分 (C M 1) を介して直接的にまたは間接的に前記 T B 1 にカップリングされた第 1 のマスキング部分 (M M 1) であって、前記 M M 1 は、前記第 1 の標的に対する前記 T B 1 の結合を阻害する、前記 M M 1 と；

20

第 2 の切断可能な部分 (C M 2) を介して前記 T B 1 または前記 T B 2 に直接的にまたは間接的にカップリングされた半減期延長部分 (E M) 及び第 2 のマスキング部分 (M M 2) であって、前記 M M 2 は前記 T B 2 の前記第 2 の標的への結合を阻害する、前記 E M 及び前記 M M 2 と；を含み、

前記活性化可能な分子の構成要素は、前記 C M 1 及び前記 C M 2 の切断が、前記 T B 2 に直接的にまたは間接的にカップリングされている前記 T B 1 から前記 M M 1、前記 M M 2、及び前記 E M を放出するように構成されており、

任意選択で、前記 T B 1 は、H V D 1 及び L V D 1 を含む抗原結合分子 (A B 1) であり、任意選択で、前記 T B 2 は、H V D 2 及び L V D 2 を含む抗原結合分子 (A B 2) である、前記活性化可能な分子。

30

【請求項 4 6】

前記 C M 1 及び前記 C M 2 のそれぞれは、独立して、A D A M S、A D A M T S、A D A M 8、A D A M 9、A D A M 1 0、A D A M 1 2、A D A M 1 5、A D A M 1 7 / T A C E、A D A M D E C 1、A D A M T S 1、A D A M T S 4、A D A M T S 5、アスパラギン酸プロテアーゼ、B A C E、レニン、アスパラギン酸カテプシン、カテプシン D、カテプシン E、カスパーゼ、カスパーゼ 1、カスパーゼ 2、カスパーゼ 3、カスパーゼ 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 1 0、カスパーゼ 1 4、システインカテプシン、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 / L 2、カテプシン X / Z / P、システインプロテイナーゼ、クルジパイン、レグマイン、オツベイン-2、K L K、K L K 4、K L K 5、K L K 6、K L K 7、K L K 8、K L K 1 0、K L K 1 1、K L K 1 3、K L K 1 4、メタロプロテイナーゼ、メプリン、ネプリライシン、P S M A、B M P-1、M M P、M M P 1、M M P 2、M M P 3、M M P 7、M M P 8、M M P 9、M M P 1 0、M M P 1 1、M M P 1 2、M M P 1 3、M M P 1 4、M M P 1 5、M M P 1 6、M M P 1 7、M M P 1 9、M M P 2 0、M M P 2 3、M M P 2 4、M M P 2 6、M M P 2 7、セリンプロテアーゼ、活性化タンパク質 C、カテプシン A、カテプシン G、キマーゼ、凝固因子プロテアーゼ、F V I I a、F I X a、F X a、F X I a、F X I I a、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、H t r A 1、ヒト好中球エラスターゼ、ラクトフェリン、マラプシン、N S 3 / 4 A、P A C E 4、プラスミン、P S A、t P A

40

50

、トロンビン、トリプターゼ、uPA、II型膜貫通型、セリンプロテアーゼ、TTSP、DESC1、DPP-4、FAP、ヘプシン、マトリプターゼ-2、MTSP1/マトリプターゼ、TMPRSS2、TMPRSS3、及びTMPRSS4からなる群から選択されるプロテアーゼの基質を含む、請求項1～45のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項47】

前記MM1は、2～40アミノ酸長のペプチドである、請求項1～46のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項48】

前記MM2は、2～40アミノ酸長のペプチドである、請求項1～47のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項49】

前記AB2の重鎖可変領域は、前記AB1の重鎖断片のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、

前記MM2のN末端は、前記CM2を介して前記AB2の軽鎖可変領域のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、

前記EMは、第1のFcドメイン及び第2のFcドメインの二量体を含み、前記MM2のC末端は、前記EMの第1のFcドメインのN末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、請求項47または48に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項50】

前記AB2の重鎖可変領域は、前記AB1の軽鎖断片のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、

前記MM2のN末端は、前記CM2を介して前記AB1の重鎖断片のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、

前記EMは、第1のFcドメイン及び第2のFcドメインの二量体を含み、前記MM2のC末端は、前記EMの第1のFcドメインのN末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、請求項47または48に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項51】

前記AB2の重鎖可変領域は、前記AB1の軽鎖断片のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、

前記EMは、第1のFcドメイン及び第2のFcドメインの二量体を含み、前記第1のFcドメインのN末端は、前記CM2を介して前記AB1の重鎖断片のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、

前記MM2のN末端は、前記第2のFcドメインのC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、請求項47または48に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項52】

前記AB2の重鎖可変領域は、前記AB1の軽鎖断片のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、

前記EMは、第1のFcドメイン及び第2のFcドメインの二量体を含み、前記第1のFcドメインのN末端は、前記CM2を介して前記AB1の重鎖断片のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、

前記MM2のC末端は、前記第2のFcドメインのN末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、請求項47または48に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項53】

前記MM2と、前記MM2に直接的にまたは間接的にカップリングされた前記第1または前記第2のFcドメインとの間にリンカーを更に含む、請求項49～52のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項54】

前記MM1は、配列番号40の配列を含み、前記MM2は、配列番号34～37または66～70のいずれか1つの配列を含む、請求項1～53のいずれか一項に記載の活性化

10

20

30

40

50

可能なタンパク質。

【請求項 5 5】

前記 M M 1 は、前記第 1 の標的またはエピトープに結合するための前記 A B 1 の解離定数よりも大きい、前記 A B 1 に結合するための解離定数を有し、前記 M M 2 は、前記第 2 の標的またはエピトープに結合するための前記 A B 2 の解離定数よりも大きい、前記 A B 2 に結合するための解離定数を有する、請求項 1 ～ 5 4 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 5 6】

前記活性化可能なタンパク質の構成要素は、前記 C M 1 及び前記 C M 2 の切断が前記活性化可能なタンパク質から前記 M M 1、前記 M M 2、及び前記 E M が切り離され、それによって、前記 T B 1、前記 T B 2、及び前記 E M を含む対応分子と比較して、短い半減期を有する活性化タンパク質を作製するように構成される、請求項 1 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 5 7】

前記活性化可能なタンパク質の構成要素は、前記 C M 1 及び前記 C M 2 の切断が前記活性化可能なタンパク質から前記 M M 1、前記 M M 2、及び前記 E M が切り離され、それによって、前記 T B 1、前記 T B 2、及び前記 E M を含む対応分子と比較して、高い標的結合活性を有する活性化タンパク質を作製するように構成される、請求項 1 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 5 8】

前記第 2 のポリペプチドは、前記 M M 2 と前記 A B 2 との間にリンカー（L 2）を更に含む、請求項 1 ～ 5 7 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 5 9】

前記 L 2 は、5 ～ 3 0、6 ～ 2 9、7 ～ 2 8、8 ～ 2 7、9 ～ 2 6、1 0 ～ 2 5、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、または 2 7 アミノ酸長を有するペプチドである、請求項 5 8 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 6 0】

前記第 2 のポリペプチドは、前記 A B 2 と前記 A B 1 との間にリンカー（L 3）を更に含む、請求項 1 ～ 5 9 のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 6 1】

前記 L 3 は、5 ～ 3 0、6 ～ 2 9、7 ～ 2 8、8 ～ 2 7、9 ～ 2 6、1 0 ～ 2 5、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、または 2 7 アミノ酸長を有するペプチドである、請求項 6 0 に記載の活性化可能なタンパク質。

【請求項 6 2】

請求項 1 ～ 4 4 のいずれか一項以上に記載の特徴を更に含む、請求項 4 5 に記載の活性化可能な分子。

【請求項 6 3】

活性化可能なタンパク質であって、

第 1 の標的に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメイン（A B 1）であって、前記 A B 1 は、第 1 の重鎖可変ドメイン（H V D 1）及び第 1 の軽鎖可変ドメイン（L V D 1）を含む、前記 A B 1 と；

第 2 の標的に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメイン（A B 2）であって、前記 A B 2 は、第 2 の重鎖可変ドメイン（H V D 2）及び第 2 の軽鎖可変ドメイン（L V D 2）を含み、前記 A B 2 は、前記 H V D 1 の N 末端もしくは前記 L V D 1 の N 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、前記 A B 2 と；

第 1 の切断可能な部分（C M 1）及び任意選択で 1 つ以上のリンカーを介して前記 A B 1 にカップリングされた第 1 のマスキング部分（M M 1）であって、前記 M M 1 は、前記第 1 の標的に対する前記 A B 1 の結合を阻害する、前記 M M 1 と；

第2の切断可能な部分（CM2）及び任意選択で1つ以上のリンカーを介して前記AB1にカップリングされた第2のマスキング部分（MM2）であって、前記MM2は、前記第2の標的に対する前記AB2の結合を阻害する、前記MM2と；

第3の切断可能な部分（CM3）及び任意選択で1つ以上のリンカーを介して前記HVD1のC末端にもしくは前記LVD1のC末端に、直接的にまたは間接的にカップリングされた半減期延長部分（EM）と、を含む、前記活性化可能なタンパク質。

【請求項64】

請求項1～66のいずれか一項以上に記載の特徴を更に含む、請求項63に記載の活性化可能な分子。

【請求項65】

請求項1～64のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質、及び担体を含む、組成物。

【請求項66】

前記組成物は、医薬組成物であり、前記担体は、薬学的に許容される担体である、請求項65に記載の組成物。

【請求項67】

請求項66に記載の組成物の少なくとも1回の用量を含む、容器、バイアル、シリンジ、注射ペン、またはキット。

【請求項68】

請求項8、10～13、58、または60のいずれかに記載の第2のポリペプチドをコードする配列を含む、核酸。

【請求項69】

請求項68に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項70】

請求項68に記載の核酸、または請求項69に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項71】

薬剤にコンジュゲートされた請求項1～64のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質を含む、コンジュゲートされた活性化可能なタンパク質。

【請求項72】

前記薬剤は、治療剤、抗腫瘍剤、毒素、診断剤、治療用高分子、ターゲティング部分、または検出可能な部分である、請求項71に記載のコンジュゲートされた活性化可能なタンパク質。

【請求項73】

前記薬剤は、リンカーを介して前記抗体にコンジュゲートされる、請求項71または請求項72に記載のコンジュゲートされた活性化可能なタンパク質。

【請求項74】

前記リンカーは、切断可能なリンカーである、請求項72に記載のコンジュゲートされた活性化可能なタンパク質。

【請求項75】

前記リンカーは、非切断型リンカーである、請求項72に記載のコンジュゲートされた活性化可能なタンパク質。

【請求項76】

治療を必要とする対象の治療方法であって、治療上有効な量の請求項1～64のいずれか一項に記載の活性化可能なタンパク質、請求項65もしくは66に記載の組成物、または請求項71～75のいずれか一項に記載のコンジュゲートされた活性化可能なタンパク質を、前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項77】

前記対象は、がんを有すると特定または診断されている、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

活性化可能なタンパク質を生成する方法であって、

10

20

30

40

50

請求項 70 に記載の細胞を培養培地中で前記活性化可能なタンパク質を生成するのに十分な条件下にて培養することと、
前記細胞または前記培養培地から前記活性化可能なタンパク質を回収することと、を含む、前記方法。

【請求項 79】

前記細胞または前記培養培地から回収した前記活性化可能なタンパク質を単離することを更に含む、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 80】

前記活性化可能なタンパク質を単離することは、タンパク質精製タグ及び／またはサイズ排除クロマトグラフィーを使用して行われる、請求項 79 に記載の方法。

10

【請求項 81】

前記活性化可能なタンパク質を医薬組成物中に配合することを更に含む、請求項 78 ～ 80 のいずれかに記載の方法。

【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、2022年4月1日出願の米国仮特許出願第US63／326,692号の優先権の利益を主張し、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

20

配列表

EFSによって本出願と共に提出され、「4862-122PCT.xml」と題された配列表は、2023年3月30日に作成され、サイズは639,463バイトであり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

本開示は、バイオテクノロジー分野に関するものであり、より具体的には、活性化可能な多重特異性分子に関する。

【背景技術】

【0004】

抗体ベースの療法は、様々な疾患に対する実証済みの効果的な治療法を提供している。しかしながら、場合によっては、広い標的発現に起因する毒性により、それらの治療効果が制限される。更に、抗体ベースの治療薬は、投与後の循環からの急速なクリアランスなどの他の制限を示している。

30

【0005】

活性化可能な抗体は、抗体ベースの療法の治療指数を拡大する試みを進めている。これらの分子は、所望の作用部位でまたはその近くで *in vivo* で活性化される活性化可能なプロドラッグとして投与される。この作用機序は、親抗体の治療指数の増加につながり得る。しかしながら、抗体ベースの治療薬の治療指数を増加させるための他の戦略が継続的に必要とされている。

40

【発明の概要】

【0006】

本開示は、活性化可能なタンパク質、ならびに関連する組成物及び方法を提供する。

【0007】

一態様では、本開示は、第1の標的に特異的に結合する第1の標的結合ドメイン(TB1)；第2の標的に特異的に結合する第2の標的結合ドメイン(TB2)であって、TB2は、TB1にカップリングされている、第2の標的結合ドメイン(TB2)；第1の切断可能な部分(CM1)を介してTB1にカップリングされた第1のマスキング部分(MM1)であって、MM1は、TB1の第1の標的への結合を阻害する、第1のマスキング部分(MM1)；TB2の第2の標的への結合を阻害する第2のマスキング部分(MM2

50

）；第2の切断可能な部分（CM2）；MM1もしくはMM2に直接的にまたは間接的にのいずれかでカップリングされた半減期延長部分（EM）；を含む、活性化可能なタンパク質を提供し、活性化可能なタンパク質の構成要素は、CM1及びCM2の切断時に、得られる活性化タンパク質がTB1及びTB2を含むが、MM1、MM2及びEMを含まないように構成される。本明細書で使用する場合かつ特に明記しない限り、「カップリング」される活性化可能な分子の構成要素は、直接共有結合または間接共有結合のいずれか、例えば、1つ以上の連結ペプチド（「リンカー」とも呼ばれる）、切断可能な部分、または活性化可能なタンパク質の他の構成要素を介してカップリングされ得る。

【0008】

一態様では、本開示は、第1の標的に特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン（AB1）であって、AB1は、第1の重鎖可変ドメイン（HVD1）及び第1の軽鎖可変ドメイン（LVD1）を含む、第1の抗原結合ドメイン（AB1）；第2の標的に特異的に結合する第2の抗原結合ドメイン（AB2）であって、AB2は、第2の重鎖可変ドメイン（HVD2）及び第2の軽鎖可変ドメイン（LVD2）を含み、AB2は、HVD1のC末端もしくはLVD1のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、第2の抗原結合ドメイン（AB2）；第1の切断可能な部分（CM1）を介して（直接的にまたは間接的に、例えば、1つ以上のリンカーを介してのいずれかで）AB1にカップリングされた第1のマスキング部分（MM1）であって、MM1は、第1の標的へのAB1の結合を阻害する、第1のマスキング部分（MM1）；第2のマスキング部分（MM2）に直接的にまたは間接的にカップリングされた半減期延長部分（EM）であって、EMは、第2の切断可能な部分（CM2）を介して（直接的にまたは間接的に、例えば、1つ以上のリンカーまたは活性化可能なタンパク質の他の構成要素を介してのいずれかで）AB1またはAB2にカップリングされており、MM2は、第2の標的へのAB2の結合を阻害する、半減期延長部分（EM）；を含む、活性化可能なタンパク質を提供する。

【0009】

一態様では、本開示は、第1の標的に特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン（AB1）であって、AB1は、第1の重鎖可変ドメイン（HVD1）及び第1の軽鎖可変ドメイン（LVD1）を含む、第1の抗原結合ドメイン（AB1）；第2の標的に特異的に結合する第2の抗原結合ドメイン（AB2）であって、AB2は、第2の重鎖可変ドメイン（HVD2）及び第2の軽鎖可変ドメイン（LVD2）を含み、AB2は、HVD1もしくはLVD1のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、第2の抗原結合ドメイン（AB2）；第1の切断可能な部分（CM1）を介して（直接的にまたは間接的に、例えば、1つ以上のリンカーを介してのいずれかで）AB1にカップリングされた第1のマスキング部分（MM1）であって、MM1は、第1の標的へのAB1の結合を阻害する、第1のマスキング部分（MM1）；第2のマスキング部分（MM2）に直接的にまたは間接的にカップリングされた半減期延長部分（EM）であって、EM及びMM2は、第2の切断可能な部分（CM2）を介して（直接的にまたは間接的に）AB1またはAB2のいずれかにカップリングされており、MM2は、第2の標的へのAB2の結合を阻害する、半減期延長部分（EM）；を含む、活性化可能なタンパク質を提供する。

【0010】

一態様では、本開示は、第1の標的に特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン（AB1）であって、AB1は、第1の重鎖可変ドメイン（HVD1）及び第1の軽鎖可変ドメイン（LVD1）を含む、第1の抗原結合ドメイン（AB1）；第2の標的に特異的に結合する第2の抗原結合ドメイン（AB2）であって、AB2は、第2の重鎖可変ドメイン（HVD2）及び第2の軽鎖可変ドメイン（LVD2）を含み、AB2は、HVD1もしくはLVD1のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、第2の抗原結合ドメイン（AB2）；第1の切断可能な部分（CM1）を介して（直接的にまたは間接的に、例えば、1つ以上のリンカーを介してのいずれかで）AB1にカップリングされた第1のマスキング部分（MM1）であって、MM1は、第1の標的へのAB1の結合を阻害する、第1のマスキング部分（MM1）；第1の半減期延長部分（EM1）及び第2の

半減期延長部分（E M 2）の二量体を含む半減期延長部分（E M）であって、E M 1は、第2の切断可能な部分（C M 2）を介して（直接的にまたは間接的に、例えば、1つ以上のリンカーを介してのいずれかで）A B 1にカップリングされており、E M 2は、第2のマスキング部分（M M 2）に直接的にまたは間接的にカップリングされており、M M 2は、第2の標的へのA B 2の結合を阻害する、半減期延長部分（E M）；を含む、活性化可能なタンパク質を提供する。

【0011】

一態様では、本開示は、第1の標的に特異的に結合する第1の標的結合ドメイン（T B 1）；第2の標的に特異的に結合する第2の標的結合ドメイン（T B 2）であって、T B 2は、T B 1に直接的にまたは間接的にカップリングされる、第2の標的結合ドメイン（T B 2）；第1の切断可能な部分（C M 1）を介して（直接的にまたは間接的に、例えば、1つ以上のリンカーを介してのいずれかで）T B 1にカップリングされた第1のマスキング部分（M M 1）であって、M M 1は、T B 1の第1の標的への結合を阻害する、第1のマスキング部分（M M 1）；第2の切断可能な部分（C M 2）を介して（直接的にまたは間接的に、例えば、1つ以上のリンカーを介してのいずれかで）T B 1またはT B 2にカップリングされた半減期延長部分（E M）及び第2のマスキング部分（M M 2）を含み、M M 2は、T B 2の第2の標的への結合を阻害する、半減期延長部分（E M）及び第2のマスキング部分（M M 2）；を含む、活性化可能なタンパク質を提供し、活性化可能な分子の構成要素は、C M 1及びC M 2の切断が、T B 1及びT B 2（該当する場合）からM M 1、M M 2及びE Mを放出するように構成され、任意選択で、T B 1は、H V D 1及びL V D 1を含む抗原結合分子（A B 1）であり、任意選択で、T B 2は、H V D 2及びL V D 2を含む抗原結合分子（A B 2）である。

【0012】

一態様では、本開示は、第1の標的に特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン（A B 1）であって、A B 1は、第1の重鎖可変ドメイン（H V D 1）及び軽鎖可変ドメイン（L V D 1）を含む、第1の抗原結合ドメイン（A B 1）；第2の標的に特異的に結合する第2の抗原結合ドメイン（A B 2）であって、A B 2は、第2の重鎖可変ドメイン（H V D 2）及び第2の軽鎖可変ドメイン（L V D 2）を含み、A B 2は、H V D 1もしくはL V D 1のC末端に直接的にまたは間接的に（例えば、リンカーを介して）のいずれかでカップリングされている、第2の抗原結合ドメイン（A B 2）；第1の切断可能な部分（C M 1）を介して（直接的にまたは間接的に、例えば、1つ以上のリンカーを介してのいずれかで）A B 1にカップリングされた第1のマスキング部分（M M 1）であって、M M 1は、第1の標的へのA B 1の結合を阻害する、第1のマスキング部分（M M 1）；第2の切断可能な部分（C M 2）を介して（直接的にまたは間接的に、例えば、1つ以上のリンカーを介してのいずれかで）A B 2にカップリングされた第2のマスキング部分（M M 2）であって、M M 2は、第2の標的へのA B 2の結合を阻害する、第2のマスキング部分（M M 2）；M M 1もしくはM M 2に直接的にまたは間接的にのいずれかでカップリングされた半減期延長部分（E M）；を含む、活性化可能なタンパク質を提供する。

【0013】

別の態様では、本開示は、第1の標的に特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン（A B 1）であって、A B 1は、第1の重鎖可変ドメイン（H V D 1）及び第1の軽鎖可変ドメイン（L V D 1）を含む、第1の抗原結合ドメイン（A B 1）；第2の標的に特異的に結合する第2の抗原結合ドメイン（A B 2）であって、A B 2は、第2の重鎖可変ドメイン（H V D 2）及び第2の軽鎖可変ドメイン（L V D 2）を含み、A B 2は、H V D 1のN末端もしくはL V D 1のN末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている、第2の抗原結合ドメイン（A B 2）；第1の切断可能な部分（C M 1）及び任意選択で1つ以上のリンカーを介してA B 1にカップリングされた第1のマスキング部分（M M 1）であって、M M 1は、第1の標的へのA B 1の結合を阻害する、第1のマスキング部分（M M 1）；第2の切断可能な部分（C M 2）及び任意選択で1つ以上のリンカーを介してA B 2にカップリングされた第2のマスキング部分（M M 2）であって、M M 2は、第2の

標的への A B 2 の結合を阻害する、第 2 のマスキング部分 (M M 2) ; 第 3 の切断可能な部分 (C M 3) 及び任意選択で 1 つ以上のリンカーを介して H V D 1 の C 末端または L V D 1 の C 末端にカップリングされた半減期延長部分 (E M) ; を含む、活性化可能なタンパク質を提供する。

【0014】

いくつかの実施形態では、E M は、第 1 の断片結晶化可能 (F c) ドメイン及び第 2 の F c ドメインによって形成される二量体である。いくつかの実施形態では、タンパク質は、少なくとも第 1 のポリペプチド及び第 2 のポリペプチドを含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、第 1 のポリペプチドは、N 末端から C 末端への順に、M M 1、C M 1、及び V L D 1 を (エレメント間の 1 つ以上の任意のリンカーを含めて) 含む。いくつかの実施形態では、第 2 のポリペプチドは、V H D 1、V H D 2、V L D 2、C M 2、M M 2、及び第 1 の F c ドメインを含み、活性化可能なタンパク質は、第 2 の F c ドメインを含む第 3 のポリペプチドを更に含む。いくつかの実施形態では、第 2 のポリペプチドは、N 末端から C 末端への順に、V H D 1、V H D 2、V L D 2、C M 2、M M 2、及び第 1 の F c ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第 2 のポリペプチドは、N 末端から C 末端への順に、V H D 1、C M 2、M M 2、及び第 1 の F c ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第 2 のポリペプチドは、N 末端から C 末端への順に、V H D 1、C M 2、及び第 1 の F c ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第 1 のポリペプチドは、M M 1、C M 1、ならびに V L D 1、V H D 2、及び V L D 2 を含む。いくつかの実施形態では、第 1 のポリペプチドは、N 末端から C 末端への順に、M M 1、C M 1、V L D 1、V H D 2、及び V L D 2 を含む。いくつかの実施形態では、第 1 のポリペプチドは、N 末端から C 末端への順に、M M 1、C M 1、V L D 1、V L D 2、及び V H D 2 を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質は、第 3 のポリペプチドを含み、第 3 のポリペプチドは、第 2 の F c ドメイン及び M M 2 を含む。前述の実施形態のそれぞれでは、かつ特に明記しない限り、ポリペプチドは、例えば、列挙されたエレメントのそれぞれの間に 1 つ以上の任意のリンカーを含んでもよい。

【0016】

いくつかの実施形態では、M M 2 は、連結ペプチドを介して第 2 の F c ドメインの C 末端に連結されている。いくつかの実施形態では、M M 2 は、連結ペプチド (「リンカー」とも呼ばれる) を介して第 2 の F c ドメインの N 末端に連結されている。いくつかの実施形態では、第 2 のポリペプチドは、M M 2 と第 1 の F c ドメインの間にリンカー (L 1) を更に含む。いくつかの実施形態では、L 1 は、5 ~ 30、6 ~ 29、7 ~ 28、8 ~ 27、9 ~ 26、10 ~ 25、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または 24 個のアミノ酸の長さを有するペプチドである。前述の段落及び本開示の全体を通じて開示された構造配置では、1 つ以上のリンカーは、任意選択でエレメント間に存在し得る。更に、本開示はまた、開示されたエレメントのいずれか 1 つ以上が、任意選択で互いに直接当接しており、その結果、エレメント間にリンカーまたは他のアミノ酸配列が存在しない、活性化可能なタンパク質を企図し、これを含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、第 1 の F c ドメインは、F c ドメインのホール変異体であり、第 2 の F c ドメインは、F c ドメインのノブ変異体である。いくつかの実施形態では、F c ドメインのホール変異体は、配列番号 2 の配列を含み、F c ドメインのノブ変異体は、配列番号 1 の配列を含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、第 1 の標的またはエピトープは、腫瘍関連抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍関連抗原は、ヒト上皮増殖因子受容体 2 (H E R 2) である。いくつかの実施形態では、A B 1 は、トラスツズマブの F a b である。いくつかの実施形態では、H V D 1 は、配列番号 27 の配列を含み、L V D 1 は、配列番号 17 の配列を含む。いくつかの実施形態では、A B 2 は、s c F v に会合する免疫エフェクター細胞、s

10

20

30

40

50

c F v に会合する白血球、s c F v に会合する T 細胞、s c F v に会合する N K 細胞、s c F v に会合するマクロファージ、または s c F v に会合する単核細胞である。いくつかの実施形態では、A B 2 は、抗 C D 3 イプシロン s c F v もしくは抗 C T L A - 4 s c F v であるか、またはそれに由来する。いくつかの実施形態では、A B 2 は、抗 C D 3 イプシロン s c F v であるか、またはそれに由来する。いくつかの実施形態では、H V D 2 は、配列番号 30 の配列を含み、L V D 2 は、配列番号 31 の配列を含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、A B 1 は、抗 H E R 2 抗体であるか、またはそれに由来する。いくつかの実施形態では、A B 1 は s c F v であり、活性化可能なタンパク質は、活性化可能な二重特異性 T 細胞エンゲージャー (B i T E) または二重親和性リターゲットイング抗体 (D A R T) である。いくつかの実施形態では、A B 1 は、断片抗原結合 (F a b) である。いくつかの実施形態では、第 2 の標的は、共刺激分子である。いくつかの実施形態では、共刺激分子は、C D 3 である。

10

【0020】

いくつかの実施形態では、C M 1 及び C M 2 のそれぞれは、同一のプロテアーゼの基質を含む。いくつかの実施形態では、C M 1 及び C M 2 は、異なるプロテアーゼの基質を含む。いくつかの実施形態では、C M 1 及び C M 2 のそれぞれは、独立して、A D A M S、A D A M T S、A D A M 8、A D A M 9、A D A M 10、A D A M 12、A D A M 15、A D A M 17 / T A C E、A D A M D E C 1、A D A M T S 1、A D A M T S 4、A D A M T S 5、アスパラギン酸プロテアーゼ、B A C E、レニン、アスパラギン酸カテプシン、カテプシン D、カテプシン E、カスパーゼ、カスパーゼ 1、カスパーゼ 2、カスパーゼ 3、カスパーゼ 4、カスパーゼ 5、カスパーゼ 6、カスパーゼ 7、カスパーゼ 8、カスパーゼ 9、カスパーゼ 10、カスパーゼ 14、システインカテプシン、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 / L 2、カテプシン X / Z / P、システインプロテイナーゼ、クルジパイン、レグマイン、オツベイン-2、K L K、K L K 4、K L K 5、K L K 6、K L K 7、K L K 8、K L K 10、K L K 11、K L K 13、K L K 14、メタロプロテイナーゼ、メプリン、ネプリライシン、P S M A、B M P - 1、M M P、M M P 1、M M P 2、M M P 3、M M P 7、M M P 8、M M P 9、M M P 10、M M P 11、M M P 12、M M P 13、M M P 14、M M P 15、M M P 16、M M P 17、M M P 19、M M P 20、M M P 23、M M P 24、M M P 26、M M P 27、セリンプロテアーゼ、活性化タンパク質 C、カテプシン A、カテプシン G、キマーゼ、凝固因子プロテアーゼ、F V I I a、F I X a、F X a、F X I a、F X I I a、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、H t r A 1、ヒト好中球エラスターゼ、ラクトフェリン、マラプシン、N S 3 / 4 A、P A C E 4、プラスミン、P S A、t P A、トロンビン、トリプターゼ、u P A、I I 型膜貫通型、セリンプロテアーゼ、T T S P、D E S C 1、D P P - 4、F A P、ヘプシン、マトリプターゼ-2、M T - S P 1 / マトリプターゼ、T M P R S S 2、T M P R S S 3、及び T M P R S S 4 からなる群から選択されるプロテアーゼの基質を含む。

20

30

【0021】

いくつかの実施形態では、M M 1 及び M M 2 は、それぞれ独立して、2 ~ 40 アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、M M 1 及び M M 2 は、それぞれ独立して、4 ~ 30 アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、A B 2 の重鎖可変領域は、A B 1 の重鎖断片の C 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、M M 2 の N 末端は、C M 2 を介して (直接的にまたは間接的に、例えば、1 つ以上のリンカーを介してのいずれかで) A B 2 の軽鎖可変領域の C 末端にカップリングされており、E M は、第 1 の F c ドメイン及び第 2 の F c ドメインの二量体を含み、M M 2 の C 末端は、E M の第 1 の F c ドメインの N 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている。いくつかの実施形態では、A B 2 の重鎖可変領域は、A B 1 の軽鎖断片の C 末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、M M 2 の N 末端は、C M 2 を介して (直接的にまたは間接的に、例えば、1 つ以上のリンカーを介してのいずれかで) A B 1 の重鎖断片の C 末端にカップリ

40

50

ングされており、EMは、第1のFcドメイン及び第2のFcドメインの二量体を含み、MM2のC末端は、第1のFcドメインのN末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている。いくつかの実施形態では、AB2の重鎖可変領域は、AB1の軽鎖断片のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、EMは、第1のFcドメイン及び第2のFcドメインの二量体を含み、第1のFcドメインのN末端は、CM2を介して（直接的にまたは間接的に、例えば、1つ以上のリンカーを介してのいずれかで）AB1の重鎖断片のC末端にカップリングされており、MM2のN末端は、第2のFcドメインのC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている。いくつかの実施形態では、AB2の重鎖可変領域は、AB1の軽鎖断片のC末端に直接的にまたは間接的にカップリングされており、EMは、第1のFcドメイン及び第2のFcドメインの二量体を含み、第1のFcドメインのN末端は、CM2を介して（直接的にまたは間接的に、例えば、1つ以上のリンカーを介してのいずれかで）AB1の重鎖断片のC末端にカップリングされており、MM2のC末端は、第2のFcドメインのN末端に直接的にまたは間接的にカップリングされている。

10

20

30

40

50

【0022】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、MM2と、MM2に直接的にまたは間接的にカップリングされた第1または第2のFcドメインの間にリンカーを更に含む。いくつかの実施形態では、MM1は、配列番号40の配列を含み、MM2は、配列番号34～37または66～70のうちのいずれか1つの配列を含む。いくつかの実施形態では、MM1は、第1の標的またはエピトープに結合するためのAB1の解離定数よりも大きい、AB1に結合するための解離定数を有し、MM2は、第2の標的またはエピトープに結合するためのAB2の解離定数よりも大きい、AB2に結合するための解離定数を有する。いくつかの実施形態では、活性化分子は、活性化分子と同じであるがEMを含む対応分子と比較して、より短い半減期を有する。いくつかの実施形態では、活性化分子は、活性化分子と同じであるがEMを含む対応分子と比較して、より高い標的結合活性を有する。いくつかの実施形態では、活性化分子は、活性化可能な分子と比較して、より高い標的結合活性を有する。

【0023】

いくつかの実施形態では、第2のポリペプチドは、MM2とAB2との間にリンカー（L2）を更に含む。いくつかの実施形態では、L2は、5～30、6～29、7～28、8～27、9～26、10～25、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、または27アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、第2のポリペプチドは、AB2とAB1との間にリンカー（L3）を更に含む。いくつかの実施形態では、L3は、5～30、6～29、7～28、8～27、9～26、10～25、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、または27アミノ酸長である。一般に、本明細書の各実施形態では、特に明記しない限り、ポリペプチドは、列挙されるエレメントのそれぞれの間に1つ以上の任意のリンカーを含んでもよく、このようなリンカーは、1～30、6～29、7～28、8～27、9～26、10～25、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、または27アミノ酸長であり得る。

【0024】

別の態様では、本開示は、本明細書の活性化可能なタンパク質及び担体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、医薬組成物であり、担体は、薬学的に許容される担体である。

【0025】

別の態様では、本開示は、本明細書の組成物の少なくとも1回の用量を含む、容器、バイアル、シリンジ、インジェクターペン、またはキットを提供する。

【0026】

別の態様では、本開示は、本明細書の第2のポリペプチドをコードする配列を含む、核

酸を提供する。

【0027】

別の態様では、本開示は、本明細書の核酸を含む、ベクターを提供する。

【0028】

別の態様では、本開示は、本明細書の核酸またはベクターを含む、細胞を提供する。

【0029】

別の態様では、本開示は、薬剤にコンジュゲートされた本明細書の活性化可能なタンパク質を含む、コンジュゲートされた活性化可能なタンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、薬剤は、治療剤、抗腫瘍剤、毒素、診断薬、治療用高分子、ターゲティング部分、または検出可能部分である。いくつかの実施形態では、薬剤は、リンカーを介して抗体にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、非切断型リンカーである。

10

【0030】

別の態様では、本開示は、治療上有効な量の活性化可能なタンパク質、組成物、または本明細書のコンジュゲートされた活性化可能なタンパク質を対象に投与することを含む、治療を必要とする対象を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、対象はがんを有すると特定または診断されている。

【0031】

別の態様では、本開示は、活性化可能なタンパク質を生成する方法であって、活性化可能なタンパク質を生成するのに十分な条件下で、本明細書の細胞を培地で培養することと、細胞または培地から活性化可能なタンパク質を回収することと、を含む、前記方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞または培地から回収した活性化可能なタンパク質を単離することを更に含む。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質を単離することは、タンパク質精製タグ及び／またはサイズ排除クロマトグラフィーを使用して行われる。いくつかの実施形態では、本方法は、活性化可能なタンパク質を医薬組成物に配合することを更に含む。

20

【0032】

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

【図面の簡単な説明】

30

【0033】

【図1】例示的な活性化可能な分子の配置を示す。分子は、活性化可能な分子の活性化から生じる活性化分子が半減期延長部分を含まず、したがって、活性化分子と同じであるが半減期延長部分を含む対応分子よりも短い半減期を有するように設計されている。

【図2】例示的な活性化可能な分子の配置を示す。分子は、活性化可能な分子の活性化から生じる活性化分子が半減期延長部分を含まず、したがって、活性化分子と同じであるが半減期延長部分を含む対応分子よりも短い半減期を有するように設計されている。

【図3】例示的な活性化可能な分子の配置を示す。分子は、活性化可能な分子の活性化から生じる活性化分子が半減期延長部分を含まず、したがって、活性化分子と同じであるが半減期延長部分を含む対応分子よりも短い半減期を有するように設計されている。

40

【図4】例示的な活性化可能な分子の配置を示す。分子は、活性化可能な分子の活性化から生じる活性化分子が半減期延長部分を含まず、したがって、活性化分子と同じであるが半減期延長部分を含む対応分子よりも短い半減期を有するように設計されている。

【図5】プロテアーゼによる活性化前及び後の、本開示のいくつかの実施形態による例示的な活性化可能な（二重にマスクされた）二重特異性抗体の概略図である。左側には、活性化可能な二重マスクされたタンパク質が概略的に例示されている。エレメント501と505の間、及びエレメント502と503の間の破線は、切断可能な部分を示している。右側には、活性化タンパク質が概略的に例示される。活性化された二重特異性抗体はマスキング部分を含まないため、活性化可能な二重特異性抗体と比較して、その標的に対する結合親和性が増加している。活性化された二重特異性抗体はまた、半減期延長部分を含

50

まず、したがって、活性化可能な二重特異性抗体よりも短い半減期を有する。

【図 6 A】Her 2 を認識するマスクされた Fab 断片、CD 3 を認識するマスクされた sc F V 構成要素、及びノブとホール F c ドメインの対を含む半減期延長部分を有する例示的な二重マスクされた二重特異性活性化可能抗体の構成要素の概略図である。

【図 6 B】図 6 A に示す例示的な二重マスクされた二重特異性活性化可能抗体をコードする 3 つのポリペプチドの構成要素を示す概略図である。破線は、切断可能な部分を示す。

【図 7 A】還元条件下で泳動させた SDS-PAGE ゲルの画像である。ゲルを以下のとおりにロードした：(1) 20 G G CD 3 マスクで二重マスクされた二重特異性活性化可能抗体 (Pro C 1 4 4 6、配列番号 21)、(2) Pro C 1 4 4 6 と u P A の生成物 (Pro C 1 4 4 6 + u P A)、(3) MN 1 5 a CD 3 マスクで二重マスクされた二重特異性活性化可能抗体 (Pro C 1 4 4 7、配列番号 22)、(4) Pro C 1 4 4 7 と u P A の生成物 (Pro C 1 4 4 7 + u P A)、(5) MN 1 5 b CD 3 マスクで二重マスクされた二重特異性活性化可能抗体 (Pro C 1 4 4 8、配列番号 23)、(6) Pro C 1 4 4 8 と u P A との生成物 (Pro C 1 4 4 8 + u P A)。

【図 7 B】プロテアーゼ活性化前及び後の各活性化可能な抗体コンストラクトの構成要素の予想分子量を要約する表である。

【図 8】プレートに結合した CD 3 抗原に結合する活性化可能な分子及び活性化分子の能力を決定するための ELISA 結合アッセイの結果を提供する：非マスク参照二重特異性分子 (Pro C 5 3 1)、20 G G CD 3 マスクで二重マスクされた活性化可能な二重特異性分子 (Pro C 1 4 4 6、配列番号 21)、Pro C 1 4 4 6 と u P A の生成物 (Pro C 1 4 4 6 + u P A)、MN 1 5 a マスクで二重にマスクされた分子 (Pro C 1 4 4 7、配列番号 22)、Pro C 1 4 4 7 及び u P A の生成物 (Pro C 1 4 4 7 + u P A)、MN 1 5 b マスクで二重マスクされた分子 (Pro C 1 4 4 8、配列番号 23)、Pro C 1 4 4 8 と u P A の生成物 (Pro C 1 4 4 8 + u P A)。この結果は、抗 CD 3 sc F v と F c 領域との間のそれぞれの CD 3 マスクが、プレートにコーティングされた CD 3 抗原への抗 CD 3 sc F v の結合の減弱を示したことを示す。二重マスクされた活性化可能な二重特異性抗体をプロテアーゼ u P A で処理すると、非マスク参照二重特異性分子 Pro C 5 3 1 と同等の CD 3 抗原結合がもたらされた。

【図 9 A】は、二重マスクされた活性化可能な二重特異性抗体の in vitro の効力を決定するための HER 2 依存性細胞毒性アッセイの結果を提供する (図 9 A : Pro C 1 4 4 6)。この結果は、本開示のプロテアーゼ処理 (活性化) された二重特異性分子が、同じ HER 2 及び CD 3 結合ドメインを有するが、異なる形態で配置された一価の非マスク二重特異性抗体対照 (「Pro C 3 0 6」) よりも活性が高かったことを示す。

【図 9 B】は、二重マスクされた活性化可能な二重特異性抗体の in vitro の効力を決定するための HER 2 依存性細胞毒性アッセイの結果を提供する (図 9 B : Pro C 1 4 4 7)。この結果は、本開示のプロテアーゼ処理 (活性化) された二重特異性分子が、同じ HER 2 及び CD 3 結合ドメインを有するが、異なる形態で配置された一価の非マスク二重特異性抗体対照 (「Pro C 3 0 6」) よりも活性が高かったことを示す。

【図 9 C】は、二重マスクされた活性化可能な二重特異性抗体の in vitro の効力を決定するための HER 2 依存性細胞毒性アッセイの結果を提供する (、図 9 C : Pro C 1 4 4 8)。この結果は、本開示のプロテアーゼ処理 (活性化) された二重特異性分子が、同じ HER 2 及び CD 3 結合ドメインを有するが、異なる形態で配置された一価の非マスク二重特異性抗体対照 (「Pro C 3 0 6」) よりも活性が高かったことを示す。

【図 10】例示的な活性化可能な分子の配置を示す。この分子は、第 3 の切断可能な部分を介して C 末端にカップリングした EM を有する二重マスクされた活性化可能な二重特異性抗体を含む。分子は、活性化可能な分子の活性化から生じる活性化分子が半減期延長部分を含まず、したがって、活性化分子と同じであるが半減期延長部分を含む対応分子よりも短い半減期を有するように設計されている。

【図 11】例示的な活性化可能な分子の配置を示す。この分子は、第 3 の切断可能な部分を介して C 末端にカップリングした EM を有する二重マスクされた活性化可能な二重特異

10

20

30

40

50

性抗体を含む。分子は、活性化可能な分子の活性化から生じる活性化分子が半減期延長部分を含まず、したがって、活性化分子と同じであるが半減期延長部分を含む対応分子よりも短い半減期を有するように設計されている。

【図12】プロテアーゼによる活性化前及び後の、本開示のいくつかの実施形態による例示的な活性化可能な（二重にマスクされた）二重特異性抗体の概略図である。左側には、活性化可能な二重マスクされたタンパク質が概略的に例示されている。右側には、活性化タンパク質が概略的に例示される。活性化された二重特異性抗体はマスキング部分を含まないため、活性化可能な二重特異性抗体と比較して、その標的に対する結合親和性が増加している。活性化された二重特異性抗体はまた、半減期延長部分を含まず、したがって、活性化可能な二重特異性抗体よりも短い半減期を有する。破線は、切断可能な部分を示す。

10

【図13A】NCI-N87及びSKOV3細胞への、それぞれ、マスクされた活性化可能な短い半減期抗体、Proc1446 (SHL1)、Proc3007 (SHL2)、Proc3008 (SHL2)、及びマスクされた抗体、Proc1441 (1/2TCB、活性化可能ではない、短い半減期抗体)、及び非マスク (Proc1963 (SHL1、非マスク、Fcなし)、Proc1965 (SHL2、非マスク、Fcなし)、及びProc306) 抗CD3、抗HER2二重特異性抗体、ならびに二次抗体 (「Secのみ」、陰性対照) の結合の結果 (すなわち、HER2結合) を提供する。

【図13B】NCI-N87及びSKOV3細胞への、それぞれ、マスクされた活性化可能な短い半減期抗体、Proc1446 (SHL1)、Proc3007 (SHL2)、Proc3008 (SHL2)、及びマスクされた抗体、Proc1441 (1/2TCB、活性化可能ではない、短い半減期抗体)、及び非マスク (Proc1963 (SHL1、非マスク、Fcなし)、Proc1965 (SHL2、非マスク、Fcなし)、及びProc306) 抗CD3、抗HER2二重特異性抗体、ならびに二次抗体 (「Secのみ」、陰性対照) の結合の結果 (すなわち、HER2結合) を提供する。

20

【図13C】Jurkat細胞への同じ分子の結合の結果 (すなわち、CD3結合) を提供する。

【図14A】NCI-N87細胞 (図14A) を使用して、示された濃度でのProc1963 (SHL1)、Proc1965 (SHL2)、及びProc306の用量反応を示す細胞毒性アッセイの結果を提供する。

30

【図14B】SKOV3細胞 (図14B) を使用して、示された濃度でのProc1963 (SHL1)、Proc1965 (SHL2)、及びProc306の用量反応を示す細胞毒性アッセイの結果を提供する。

【図15A】NCI-N87細胞 (図15A) を使用して、示された濃度でのProc1963、Proc1965、Proc1446、Proc3007、及びProc3008の用量反応を示す細胞毒性アッセイの結果を提供する。

【図15B】SKOV3細胞 (図15B) を使用して、示された濃度でのProc1963、Proc1965、Proc1446、Proc3007、及びProc3008の用量反応を示す細胞毒性アッセイの結果を提供する。

【図16A】細胞毒性アッセイの結果を提供する。Aは、NCI-N87細胞 (図16A) を使用して、Proc1963、Proc1965、Proc3007、Proc3008、Proc306、及びProc1441の用量反応を示す。

40

【図16B】細胞毒性アッセイの結果を提供する。Bは、SKOV3細胞 (図16B) を使用して、Proc1963、Proc1965、Proc3007、Proc3008、Proc306、及びProc1441の用量反応を示す。

【図16C】細胞毒性アッセイの結果を提供する。Cは、NCI-N87細胞 (図16C) を使用して、Proc1963、Proc1965、Proc1446、Proc306、及びProc1441の用量反応を示す。

【図16D】細胞毒性アッセイの結果を提供する。Dは、SKOV3細胞 (図16D) を使用して、Proc1963、Proc1965、Proc1446、Proc306、

50

及びProC1441の用量反応を示す。

【図17】NCI-N87異種移植モデルを使用した*in vivo*腫瘍増殖アッセイの結果を提供する。プロットは、ミリグラム／キログラム（mpk）で示される用量で投与されたProC1965、ProC3007、ProC3008、及びProC1441による初期処置後の日数に対する腫瘍体積を示している。

【発明を実施するための形態】

【0034】

本明細書で提供される図は、例示のみを目的としており、必ずしも一定の縮尺で描かれているわけではない。

【0035】

本明細書では、比較的に低い結合活性、及び半減期延長部分（EM）を含む構造を有する活性化可能な分子（例えば、活性化可能な抗体及び他の活性化可能な治療用または活性化可能な診断用タンパク質などの活性化可能なタンパク質）が提供される。特定の活性化条件への曝露によって活性化される場合（例えば、活性化可能な分子が腫瘍に送達される場合）、得られる活性化分子は、活性化可能な分子と比較して、結合活性が高く、半減期が短い。一態様では、活性化可能な分子は、活性化可能な治療用高分子であってよい。いくつかの態様では、活性化可能な治療用高分子は、活性化可能な抗体または任意の他の所望のタンパク質、例えば、治療用タンパク質であり得る。

【0036】

一般に、本明細書の活性化可能な分子は、1つ以上の標的結合ドメイン（TB）、それらの標的へのTBの結合を低減、阻害、または妨害する1つ以上のマスキング部分（MM）、1つ以上のMMを1つ以上のTBにカップリングする1つ以上の切断可能な部分（CM）、及び1つ以上のCMを介してTBにカップリングされた1つ以上の半減期延長部分（EM）を含み得る。ポリペプチド内の2つの構成要素のカップリングは、直接または間接であり得る。2つの構成要素が直接的にカップリングされている場合、一方の構成要素のC末端のアミノ酸残基は、他方の構成要素のN末端のアミノ酸残基とペプチド結合を形成する。2つの構成要素が間接的にカップリングされている場合、2つの構成要素の間に一続きのアミノ酸が存在する。いくつかの例では、ポリペプチドの2つの構成要素は、ポリペプチド中の1つ以上の他の構成要素を介して間接的にカップリングされ得る。すなわち、1つ以上の他の構成要素は、2つのカップリングされた構成要素の間にある。別の構成要素を介して間接的にカップリングまたは連結する場合、1つ以上の他の構成要素は、リンカー、TB（複数可）（例えば、AB（複数可））、CM（複数可）、MM（複数可）、またはこれらの任意の組み合わせであり得る。

【0037】

CMは、配列特異的プロテアーゼ、例えば、健康な組織よりも腫瘍などの疾患組織の環境において多い量で存在する（または、多い量で活性化状態で存在する）プロテアーゼの基質を含む、ポリペプチドである。本明細書に記載の活性化可能な分子のMM及びEMは、CMを切断して、活性化分子を作成することによってTBから放出され得る。活性化分子は、MM（複数可）を含む対応する活性化可能な分子と比較して、その標的に対してより高い結合親和性を示す。いくつかの実施形態では、活性化分子は、活性化分子と同じであるがEMを含む対応分子と比較して、より短い半減期を有する。活性化分子は、活性化分子と同じであるがEMを含む対応分子と比較して、毒性が低減され、オフターゲット効果が低減され得る。

【0038】

いくつかの実施形態では、活性化可能な分子は、二重マスクされた二重特異性標的結合分子であり得る。いくつかの態様では、このような分子は、少なくとも2つの標的結合タンパク質及び少なくとも2つのマスキング部分を含み得、マスキング部分のそれぞれは、標的結合タンパク質のその標的への結合を阻害する。例えば、活性化可能な分子は、第1の標的に特異的に結合する第1の標的結合タンパク質（TB1）、TB1と第1の標的との結合を阻害する第1のマスキング部分（MM1）、MM1とTB1との間に配置された

10

20

30

40

50

切断可能な部分（ＣＭ１）、第２の標的に特異的に結合する第２の標的結合タンパク質（ＴＢ２）、ＴＢ２と第２の標的との結合を阻害する第２のマスキング部分（ＭＭ２）、ＭＭ２とＴＢ２との間に配置された切断可能な部分（ＣＭ２）、切断可能な部分（ＣＭ）を介してＴＢ１またはＴＢ２にカップリングされたＥＭを含み得る。いくつかの実施形態では、ＥＭは、ＭＭもＴＢに結合するＣＭを介してＴＢにカップリングされ得る。いくつかの実施形態では、ＥＭは、ＣＭ１及びＣＭ２とは異なるＣＭ（例えば、第３のＣＭまたは「ＣＭ３」）を介してＴＢにカップリングされ得る。活性化状態では、ＥＭは、活性化分子から放出され得る。したがって、活性化分子（ＴＢ１及びＴＢ２を含むが、ＭＭ１、ＭＭ２またはＥＭを含まない）は、ＴＢ１、ＴＢ２、及びＥＭを含むがＭＭ１またはＭＭ２を含まない参照分子と比較して、より短い半減期を有する。活性化分子（ＴＢ１及びＴＢ２を含むが、ＭＭ１、ＭＭ２、及びＥＭを含まない）は、ＴＢ１、ＴＢ２、及びＥＭを含むがＭＭ１またはＭＭ２を含まない参照分子と比較して、高い標的結合活性を有する。

10

【００３９】

本明細書ではまた、関連する組成物、キット、核酸及び組換え細胞、ならびに本明細書に記載の活性化可能な分子（例えば、活性化可能な抗体及び他のタンパク質）のいずれかの使用方法及び作製方法を含む、関連する方法も提供される。

【００４０】

定義

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

20

【００４１】

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

【００４２】

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

30

【００４３】

濃度、量及び他の数値データは、本明細書で範囲形式で表されてよい、または示されてよい。かかる範囲形式は便宜上及び簡略性のためだけに使用され、したがって範囲の制限として明示的に列挙された数値だけでなく、あたかも各数値及び部分的な範囲が明示的に列挙されるかのように、その範囲内に包含された全ての個々の数値または部分的な範囲もまた含むと柔軟に解釈されるべきであることを理解されたい。実例として、「約０．０１～２．０」の数値の範囲は、約０．０１～約２．０という明示的に列挙された値だけでなく、示された範囲内の個々の数値及び部分的な範囲もまた含むと解釈されるべきである。したがって、この数値の範囲内には、個々の値、例えば０．５、０．７及び１．５など、ならびに部分的な範囲、例えば０．５～１．７、０．７～１．５、及び１．０～１．５などが含まれる。更に、このような解釈は、記載されている範囲の幅または特性に関係なく適用されるべきである。加えて、全ての百分率は、特に明記しない限り、重量ベースで計算されていることに留意されたい。

40

【００４４】

本開示の範囲を理解する上で、用語「含む（*including*）」、または「含む（

50

comprising)」及びそれらの派生形は、本明細書で使用する場合、記載された特徴、エレメント、構成要素、グループ、整数及び／または工程の存在を規定するが、その他の記載されていない特徴、エレメント、構成要素、グループ、整数及び／または工程の存在を排除しない、オープンエンドの用語であることを意図する。上記は、類似の意味を有する単語、例えば用語「含む(including)」、「有する(having)」及びそれらの派生形にも適用される。用語「含む(comprising)」及びその派生形は、本明細書で使用する場合、記載された特徴、エレメント、構成要素、グループ、整数及び／または工程の存在を規定するが、その他の記載されていない特徴、エレメント、構成要素、グループ、整数及び／または工程の存在を排除する、クローズドエンドの用語であることを意図する。本明細書で使用する場合、「から本質的になる(consisting essentially of)」という用語は、記載された特徴、エレメント、構成要素、グループ、整数及び／または工程の存在、ならびに特徴、エレメント、構成要素、グループ、整数及び／または工程の基本的かつ新規の特徴(複数可)に実質的に影響を及ぼさない存在を規定することを意図する。これらの移行句のいずれか1つ(すなわち、「含む(comprising)」、「なる(consisting)」または「本質的になる(consisting essentially)」)への言及は、具体的には用いられていない、他の移行句のいずれかへの置き換えに対する直接的な支持を提供すると理解される。例えば、用語「含む(comprising)」から「から本質的になる(consisting essentially of)」または「からなる(consisting of)」への修正は、本開示を通して開示される任意のエレメントがこのように定義されるために、直接的な支持が見出される。この定義に基づいて、本明細書に開示される、または参照によって組み込まれる任意のエレメントは、特許請求される発明に含まれてもよく、または除外されてもよい。

10

20

【0045】

本明細書で使用する場合、便宜上、複数の化合物、エレメントまたは工程が一般的な一覧において提示されてよい。ただし、これらの一覧は、一覧の各メンバーが別個の一意のメンバーとして個別に識別されるかのように解釈されるべきである。したがって、このような一覧の個別のメンバーは、そうでないという表示がない場合、単に一般的なグループでの提示のみに基づいて、同じ一覧の任意のその他のメンバーと事実上同等のものとして解釈されるべきでない。

30

【0046】

本明細書では「例示的な」という用語は、例、実例、または説明として役立つという意味で使用される。本明細書で「例示的な」として記載される任意の態様または設計は、必ずしも他の態様または設計よりも好ましい、または有利であると解釈されるべきではない。むしろ、例示的という言葉の使用は、より具体的な方法で概念を提示することを意図している。

【0047】

更に、特定の分子、コンストラクト、組成物、エレメント、部分、賦形剤、疾患、状態、特性、ステップなどは、本開示のある特定の実施形態もしくは態様、または別個の段落もしくはセクションの文脈で議論されてよい。これは単に便宜的かつ簡潔にするためのものであり、そのような任意の開示は、本開示及び特許請求の範囲のどこかに見出される他の任意の実施形態または態様にも同様に適用可能であり、それらと組み合わせることが意図されており、これら全てが、出願日において本出願及び特許請求された発明を形成していることが理解される。例えば、構成体、組成物もしくは方法に関して記載された構成体、分子、方法ステップ、キット、または組成物の一覧は、本開示の任意のその他の部分に記載される構成体、組成物、配合物及び方法に関連した実施形態の直接的な支持を、それらの方法ステップ、有効な薬剤、キットまたは組成物が、その実施形態または態様の文脈またはセクションにおいて再列挙されていない場合であっても、見出すことが意図され、直接的な支持を見出す。

40

【0048】

50

活性化可能な分子

一態様では、本明細書で提供される活性化可能な分子は、活性化可能な標的結合タンパク質（TB）、例えば、活性化可能な抗体、または標的に特異的に結合する別のタンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、活性化可能な分子は、標的に特異的に結合するTB（例えば、抗原結合タンパク質（AB））；TB（例えば、AB）に直接的に共有結合した（「直接的にカップリングされた」とも呼ばれる）か、またはTBに間接的に共有結合した（「間接的にカップリングされた」とも呼ばれる）切断可能な部分（CM）であって、CMは、TBと、TB（例えば、AB）のその標的（複数可）への結合を低減、阻害、または妨害するマスキング部分（MM）との間に位置する、CM；及び1つ以上のCMを介してTB（例えば、AB）にカップリングされる1つ以上の半減期延長部分（EM）を含む。MM及びEMは、CMを切断して、活性化分子を生成することによってTBから放出され得る。いくつかの実施形態では、活性化可能な分子は、第1の標的に特異的に結合する第1の抗原結合タンパク質（AB1）；第1の標的へのAB1の結合を阻害し、第1の切断可能な部分（CM1）を介してAB1にカップリングされた第1のマスキング部分（MM1）；第2の標的（AB2）に特異的に結合する第2の抗原結合タンパク質（AB2）；第2の標的へのAB2の結合を阻害し、第2の切断可能な部分（CM2）を介してAB1またはAB2のいずれかにカップリングされた第2のマスキング部分（MM2）；及び切断可能な部分を介してAB1またはAB2のいずれかにカップリングされたEMを含む。いくつかの態様では、EMは、MM1をAB1にカップリングするのと同じ切断可能な部分（CM1）を介してAB1にカップリングされ得る。いくつかの態様では、EMは、MM2をAB2にカップリングするのと同じ切断可能な部分（CM2）を介してAB2にカップリングされ得る。いくつかの態様では、EMは、MM2をAB1にカップリングするのと同じ切断可能な部分（CM2）を介してAB1にカップリングされ得る。いくつかの態様では、EMは、第3の切断可能な部分（CM3）を介してAB1またはAB2にカップリングされ得る。前述の態様のそれぞれでは、活性化可能な分子のエレメントは、直接的にカップリングされてもよい、または要素間の1つ以上の任意のリンカーを介して間接的にカップリングされてもよい。活性化状態では、EMは、活性化可能なタンパク質から放出され得、その結果、AB1及びAB2を含むがMM1、MM2、またはEMを含まない活性化タンパク質をもたらす、活性化タンパク質は、AB1、AB2、及びEMを含むが、MM1またはMM2を含まない参照抗体と比較して、より短い半減期を有する。

10

20

30

【0049】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、TBが標的への結合をマスクしないかまたは他の方法で阻害しなかった場合、非治療部位でのTB（例えば、AB）の結合に起因し得る毒性及び／またはオフターゲット副作用の低減を提供する。活性化可能な状態では、MMは、TBのその標的分子への結合を妨害し得る。

【0050】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、第1の標的に特異的に結合する第1の抗原結合タンパク質（AB1）であって、AB1は、重鎖断片及び軽鎖断片を含む抗体またはその断片を含む、第1の抗原結合タンパク質（AB1）；第2の標的に特異的に結合する第2の抗原結合タンパク質（AB2）であって、AB2は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む単鎖断片可変（scFv）を含み、AB2は、AB1の重鎖断片または軽鎖断片のC末端にカップリングされている、第2の抗原結合タンパク質（AB2）；第1の切断可能な部分（CM1）を介してAB1にカップリングされ、活性化可能なタンパク質が非切断状態にあるときに第1の標的へのAB1の結合を阻害する、第1のマスキング部分（MM1）；AB2にカップリングされ、活性化可能なタンパク質が非切断状態にあるときに第2の標的へのAB2の結合を阻害する第2のマスキング部分（MM2）；及び第2の切断可能な部分（CM2）を介してAB1またはAB2の構成要素にカップリングされた半減期延長部分（EM）を含む。いくつかの例では、AB1は、Fabであり得る。いくつかの例では、AB1は、scFvであり得る。いくつかの態様では、EM

40

50

は、マスキング部分、例えば、E M－M M－C M－A BまたはA B－C M－M M－E M構造により、任意選択で、1つ以上の構成要素の間の1つ以上のリンカーを介して、A B 1またはA B 2にカップリングされている。本明細書で使用する場合、構造式中の「－」という記号は、2つの構成要素の直接的または間接的なカップリングを示す（例えば、任意のリンカーは、構成要素の間に存在し得る）。本開示の分子の構造配置は、以下に詳細に記載され、例えば、図1～図6に示されている。

【0051】

本明細書で使用する場合、「活性化可能なタンパク質」及び「活性化可能な標的結合タンパク質」（例えば、「活性化可能な抗体」）という用語、ならびに「インタクト」、「非切断型」及び／または「不活性」という用語を加えた前述のいずれかは、M M、C M、及びT Bの少なくとも1つのセットを含み、同じ生物学的標的に対する同じT Bを含む対応物「活性化」タンパク質（例えば、活性化抗体など）の結合と比較して、生物学的標的への結合の減弱を示すタンパク質を指すために互換的に使用される。活性化可能なタンパク質をC M特異的プロテアーゼに曝露することにより、M MがT B（例えば、A B）とその標的との間の結合を低減、阻害、または妨害しない、「活性化」タンパク質が生成され得ることは、当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態では、適切なプロテアーゼによるC Mの切断は、M Mの放出をもたらし得る。いくつかの実施形態では、適切なプロテアーゼによるC Mの切断は、E Mの放出をもたらし得る。「活性化タンパク質」、「活性化標的結合タンパク質」（例えば、「活性化抗体」）、「切断型活性化可能タンパク質」、及び「切断型活性化可能な標的結合タンパク質」（例えば、「切断型活性化可能抗体」という用語は、本明細書では、活性化可能なタンパク質をC M特異的プロテアーゼに曝露した後に生成されるT B含有切断産物を互換的に指す。本開示全体を通して使用する場合、活性化可能な抗体に関する説明は、活性化可能な標的結合タンパク質にも適用可能であると解釈するものとする。

【0052】

本明細書で使用する場合、「マスキング部分」及び「M M」という用語は、T B（例えば、A B）の近位に配置される場合、生物学的標的へのT Bの結合を妨害するペプチドまたはタンパク質を指すために互換的に使用される。「切断可能な部分」及び「C M」という用語は、本明細書では互換的に使用され、配列特異的なプロテアーゼの基質を含むペプチドを意味する。活性化可能なタンパク質では、C Mは、M M及びT Bに対して配置され、その結果、切断により、T Bの生物学的標的に結合することができる分子がもたらされる。したがって、活性化可能なタンパク質は、活性化タンパク質と比較して、生物学的標的への結合の低減を示す。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、目的のT Bを選択し、活性化可能なタンパク質の残りの部分を構築することによって、M MがT Bのマスキングまたはその標的に対するT Bの結合の低減を提供するように設計され得る。この機能的特徴を提供するために、構造設計基準を考慮することができる。

【0053】

活性化可能なタンパク質は、活性化されたときに複数の別個の抗原に結合することができる多重特異性（例えば、二重特異性、三重特異性、四重特異性、及び他の多重特異性の活性化可能なタンパク質）の活性化可能なタンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、多重特異性活性化可能なタンパク質は、結合部位が同じもしくは異なる抗原またはエピトープを認識するかどうかに関係なく、例えば、複数の標的結合部位を含む、多価であり得る。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、単一特異性であり得、例えば、活性化されたときに1つの抗原のみに結合することができる。

【0054】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、二重特異性である。「二重特異性」という用語は、活性化可能なタンパク質が、活性化された場合、2つの異なる標的に特異的に結合することができることを意味する。通常、活性化可能な二重特異性の活性化可能タンパク質は、2つのT B、すなわち、第1のT B及び第2のT Bを含み、これらのそれぞれは、活性化後に異なる標的（すなわち、それぞれ、第1の標的及び第2の標的）

に特異的に結合することができる。いくつかの実施形態では、活性化後に、得られる二重特異性標的結合分子は、2つの標的、例えば、2つの別個の細胞上で発現する2つの標的タンパク質に同時に結合することが可能であり得る。

【0055】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、疾患に関連する細胞（例えば、腫瘍細胞）の表面上の分子に結合することができるAB1、及び免疫細胞の表面上の分子に結合することができるAB2を含み得る。活性化されると、このような二重特異性の活性化可能なタンパク質は、免疫細胞及び疾患に関連する細胞（例えば、腫瘍細胞）に同時に結合し、そうして、免疫細胞を活性化し、活性化された免疫細胞を疾患に関連する細胞に架橋し得る。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、プロ二重特異性T細胞エンゲージャー（*pro-BiT E*）分子、プロキメラ抗原受容体（*pro-CAR*）改変T細胞、または他の操作された受容体もしくは他の免疫エフェクター細胞、例えば、CAR改変NK細胞の一部として配合され得る。

【0056】

いくつかの例では、活性化可能なタンパク質は、活性化可能なT細胞会合二重特異性抗体（TCB）またはその断片であり得る。例えば、活性化可能なタンパク質は、疾患に関連する細胞を標的とするAB1、及びT細胞受容体を標的とするAB2を含み得る。

【0057】

本開示は、本明細書に記載の様々な構造配置の活性化可能なタンパク質を含む。活性化可能なタンパク質の例示的な構成を、以下で提供する。TB、MM、CM、及びEMのN末端からC末端への順序は、活性化可能なタンパク質内で逆にされ得る。CM及びMMは、アミノ酸配列が重複し得、例えば、その結果、配列特異的プロテアーゼによって認識されるCM配列は、少なくとも部分的にMM内に含有される。例えば、AB1が抗原結合断片（Fab）であり、AB2が単鎖断片可変である、活性化可能な抗原結合タンパク質の様々な構造配置が企図されており、以下の式で表され得る（アミノ（N）末端領域からカルボキシル（C）末端領域への順で）。下記の式では、「：」は2つの異なるポリペプチドを区切っており、「Fab__L」及び「Fab__H」は、それぞれ、Fabの軽鎖断片及び重鎖断片であり（「Fab__L」は、可変軽鎖領域（VL）及び軽鎖定常領域を含み、「Fab__H」は、可変重鎖領域（VH）及びCH1領域を含む）、「VL*」及び「VH*」は、scFvの軽鎖及び重鎖可変領域である。更に、本明細書で使用する場合かつ特に明記しない限り、活性化可能な分子の構成要素間の各ダッシュ（-）は、直接結合、または1つ以上のリンカーを介した間接結合のいずれかを表す。

(MM1-CM1-Fab__L) : (Fab__H-VH*-VL*-CM2-MM2-EM)

(MM1-CM1-Fab__L) : (Fab__H-VH*-VL*-CM2-EM-MM2)

Fab__L : (MM1-CM1-Fab__H-VH*-VL*-CM2-MM2-EM)

Fab__L : (MM1-CM1-Fab__H-VH*-VL*-CM2-EM-MM2)

(MM1-CM1-Fab__L-VH*-VL*-CM2-MM2-EM) : Fab__H

(MM1-CM1-Fab__L-VH*-VL*-CM2-EM-MM2) : Fab__H

(Fab__L-VH*-VL*-CM2-MM2-EM) : (MM1-CM1-Fab__H)

(Fab__L-VH*-VL*-CM2-EM-MM2) : (MM1-CM1-Fab__H)

(MM1-CM1-Fab__L-VH*-VL*) : (Fab__H-CM2-MM2-EM)

(MM1-CM1-Fab__L-VH*-VL*) : (Fab__H-CM2-EM-MM2)

(Fab__L-VH*-VL*) : (MM1-CM1-Fab__H-CM2-MM2-EM)

10

20

30

40

50

(F a b __ L - V H * - V L *) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - C M 2 - E M - M M 2)

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - C M 2 - M M 2 - E M) : (F a b __ H - V H * - V L *)

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - C M 2 - E M - M M 2) : (F a b __ H - V H * - V L *)

(F a b __ L - C M 2 - M M 2 - E M) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - V H * - V L *)

(F a b __ L - C M 2 - E M - M M 2) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - V H * - V L *)

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L) : (M M 2 - C M 2 - V H * - V L * - F a b __ H - C M 3 - E M)

(M M 1 - C M 1 - F a b __ H) : (M M 2 - C M 2 - V H * - V L * - F a b __ L - C M 3 - E M)

(M M 2 - C M 2 - V H * - V L * - F a b __ L) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - C M 3 - E M)

(M M 2 - C M 2 - V H * - V L * - F a b __ H) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ L - C M 3 - E M)

【 0 0 5 8 】

構成のいずれかでは、活性化可能なタンパク質は、構成要素のうちの任意の2つの間に1つ以上のリンカーを含んでもよい。例えば、活性化可能なタンパク質は、M M 1とC M 1との間のリンカー、C M 1とF a b __ Lとの間のリンカー、F a b __ HとV H *との間のリンカー、V H *とV L *との間のリンカー、V L *とC M 2との間のリンカー、C M 2とM M 2との間のリンカー、M M 2とE Mとの間のリンカー、F a b __ LとV H *との間のリンカー、C M 1とF a b __ Hとの間のリンカー、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態では、E Mは、2つ以上の部分（例えば、F cドメインの対）を含み得る。例えば、E Mは、2つの部分、E M 1及びE M 2を含むタンパク質複合体であってもよい。そのような場合、そのような活性化可能なタンパク質の例は、以下の式によって表され得る（アミノ（N）末端領域からカルボキシル（C）末端領域の順に）：

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L) : (F a b __ H - V H * - V L * - C M 2 - M M 2 - E M 1) : E M 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L) : (F a b __ H - V H * - V L * - C M 2 - E M 1 - M M 2) : E M 2

F a b __ L : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - V H * - V L * - C M 2 - M M 2 - E M 1) : E M 2

F a b __ L : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - V H * - V L * - C M 2 - E M 1 - M M 2) : E M 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L) : (F a b __ H - V H * - V L * - C M 2 - E M 1) : (M M 2 - E M 2)

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L) : (F a b __ H - V H * - V L * - C M 2 - E M 1) : (E M 2 - M M 2)

F a b __ L : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - V H * - V L * - C M 2 - E M 1) : (M M 2 - E M 2)

F a b __ L : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - V H * - V L * - C M 2 - E M 1) : (E M 2 - M M 2)

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - V H * - V L * - C M 2 - M M 2 - E M 1) : F a b __ H : E M 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - V H * - V L * - C M 2 - E M 1 - M M 2) : F a b __

H : EM 2

(F a b __ L - V H * - V L * - C M 2 - M M 2 - E M 1) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H) : EM 2

(F a b __ L - V H * - V L * - C M 2 - E M 1 - M M 2) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H) : EM 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - V H * - V L * - C M 2 - E M 1) : F a b __ H : M M 2 - E M 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - V H * - V L * - C M 2 - E M 1) : F a b __ H : E M 2 - M M 2

(F a b __ L - V H * - V L * - C M 2 - E M 1) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H) : 10
M M 2 - E M 2

(F a b __ L - V H * - V L * - C M 2 - E M 1) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H) :
E M 2 - M M 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - V H * - V L *) : (F a b __ H - C M 2 - M M 2 - E M 1) : EM 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - V H * - V L *) : (F a b __ H - C M 2 - E M 1 - M M 2) : EM 2

(F a b __ L - V H * - V L *) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - C M 2 - M M 2 - E M 1) : EM 2

(F a b __ L - V H * - V L *) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - C M 2 - E M 1 - M 20
M M 2) : EM 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - V H * - V L *) : (F a b __ H - C M 2 - E M 1) :
M M 2 - E M 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - V H * - V L *) : (F a b __ H - C M 2 - E M 1) :
E M 2 - M M 2

(F a b __ L - V H * - V L *) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - C M 2 - E M 1) :
M M 2 - E M 2

(F a b __ L - V H * - V L *) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - C M 2 - E M 1) :
E M 2 - M M 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - C M 2 - M M 2 - E M 1) : (F a b __ H - V H * - V 30
L *) : EM 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - C M 2 - E M 1 - M M 2) : (F a b __ H - V H * - V
L *) : EM 2

(F a b __ L - C M 2 - M M 2 - E M 1) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - V H * - V
L *) : EM 2

(F a b __ L - C M 2 - E M 1 - M M 2) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - V H * - V
L *) : EM 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - C M 2 - E M 1) : (F a b __ H - V H * - V L *) :
M M 2 - E M 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L - C M 2 - E M 1) : (F a b __ H - V H * - V L *) : 40
E M 2 - M M 2

(F a b __ L - C M 2 - E M 1) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - V H * - V L *) :
M M 2 - E M 2

(F a b __ L - C M 2 - E M 1) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - V H * - V L *) :
E M 2 - M M 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ L) : (M M 2 - C M 2 - V H * - V L * - F a b __ H - C
M 3 - E M 1) : EM 2

(M M 1 - C M 1 - F a b __ H) : (M M 2 - C M 2 - V H * - V L * - F a b __ L - C
M 3 - E M 1) : EM 2

(M M 2 - C M 2 - V H * - V L * - F a b __ L) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ H - C 50

M 3 - E M 1) : E M 2

(M M 2 - C M 2 - V H * - V L * - F a b __ H) : (M M 1 - C M 1 - F a b __ L - C M 3 - E M) : E M 2

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態では、E M 1 及び E M 2 は、2つの断片結晶化可能 (F c) ドメインであり得る。2つのF cドメインは、半減期延長部分として二量体を形成し得る。いくつかの例では、E M 1 及び E M 2 は、2つの同一のF cドメインであり得、したがって、ホモ二量体を形成し得る。いくつかのコンストラクトでは、E M 1 及び E M 2 は、一緒になってヘテロ二量体を形成する2つの異なるアミノ酸配列を有するF cドメインを含む。いくつかの例では、2つのF cドメインは、F cドメインのホール変異体及びF cドメインのノブ変異体であり得、ヘテロ二量体を形成し得る。これらの構成のいずれかでは、活性化可能なタンパク質は、構成要素のうちの任意の2つの間に1つ以上のリンカーを含んでもよい。例えば、活性化可能なタンパク質は、M M 1 と C M 1 との間のリンカー、C M 1 と F a b __ L との間のリンカー、F a b __ H と V H * との間のリンカー、V H * と V L * との間のリンカー、V L * と C M 2 との間のリンカー、C M 2 と M M 2 との間のリンカー、M M 2 と E M との間のリンカー、F a b __ L と V H * との間のリンカー、C M 1 と F a b __ H との間のリンカー、C M 2 と E M 1 との間のリンカー、M M 2 と E M 1 との間のリンカー、M M 2 と E M 2 との間のリンカー、またはこれらの任意の組み合わせを含み得る。

【 0 0 6 1 】

図1～図4は、本明細書に開示される活性化可能な分子の例示的な構成を示す。これらの非限定的な例では、活性化可能な分子は、F a b であり得るA B 1 ; s c F v であり得るA B 2 ; 2つのF cドメインによって形成される二量体であるE M ; C M 1 を介してA B 1 にカップリングされ、A B 1 及びその標的の結合を妨害することができるM M 1 ; A B 2 及びその標的の結合を妨害することができるM M 2 ; 及びE M のF cドメインとA B 1 またはA B 2 との間のC M 2 ; を含む。図1～図4に例示した活性化可能な分子構造は、A B 1 及びA B 2 がF a b 及びs c F v 以外の抗原結合タンパク質である分子にも同様に適用できることが理解されよう。同様に、図1～図4に例示される活性化可能な分子構造は、A B 1 及びA B 2 が、それぞれ、必ずしも抗原結合ドメインを含むものではない標的結合タンパク質であり得る、T B 1 及びT B 2 によって置き換えられている分子に類似して適用することができる。

【 0 0 6 2 】

図1は、3つのポリペプチドを含む、例示的な活性化可能なタンパク質100を示す。第1のポリペプチドは、アミノ (N) 末端領域からカルボキシル (C) 末端領域の順に、M M 1 101、任意のリンカー102、C M 1 103、任意のリンカー104、及びA B 1 の軽鎖断片105を含む。第2のポリペプチドは、アミノ (N) 末端領域からカルボキシル (C) 末端領域の順に、A B 1 の重鎖断片121、リンカー122、A B 2 の重鎖可変領域123、リンカー124、A B 2 の軽鎖可変領域125、リンカー126、C M 2 127、任意のリンカー128、M M 2 129、リンカー130、及びE M の第1のF cドメイン131を含む。第3のポリペプチドは、E M の第2のF cドメイン141を含む。代替の例示的な構成では、図1では、105は、A B 1 の重鎖断片であり、121は、A B 1 の軽鎖断片である。代替の例示的な構成では、図1では、123は、A B 2 の軽鎖可変領域であり、125は、A B 2 の重鎖可変領域である。代替の例示的な構成では、図1では、E M の第1のF cドメイン131は、F cドメインのホール変異体であり、E M の第2のF cドメイン141は、F cドメインのノブ変異体である。代替の例示的な構成では、図1では、E M の第1のF cドメイン131は、F cドメインのノブ変異体であり、E M の第2のF cドメイン141は、F cドメインのホール変異体である。

【 0 0 6 3 】

図2は、3つのポリペプチドを含む、別の例示的な活性化可能なタンパク質200を示す。第1のポリペプチドは、アミノ (N) 末端領域からカルボキシル (C) 末端領域の順

に、MM1 201、任意のリンカー202、CM1 203、任意のリンカー204、AB1の軽鎖断片205、リンカー206、AB2の重鎖可変領域207、リンカー208、及びAB2の軽鎖可変領域209を含む。第2のポリペプチドは、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、AB1の重鎖断片221、任意のリンカー222、CM2 223、任意のリンカー224、MM2 225、リンカー226、及びEMの第1のFcドメイン227を含む。第3のポリペプチドは、EMの第2のFcドメイン241を含む。代替の例示的な構成では、図2では、205は、AB1の重鎖断片であり、221は、AB1の軽鎖断片である。代替の例示的な構成では、図2では、207は、AB2の軽鎖可変領域であり、209は、AB2の重鎖可変領域である。代替の例示的な構成では、図2では、EMの第1のFcドメイン227は、Fcドメインのホール変異体であり、EMの第2のFcドメイン241は、Fcドメインのノブ変異体である。代替の例示的な構成では、図2では、EMの第1のFcドメイン227は、Fcドメインのノブ変異体であり、EMの第2のFcドメイン241は、Fcドメインのホール変異体である。

10

20

30

40

50

【0064】

図3は、3つのポリペプチドを含む、別の例示的な活性化可能なタンパク質300を示す。第1のポリペプチドは、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、MM1 301、任意のリンカー302、CM1 303、任意のリンカー304、AB1の軽鎖断片305、リンカー306、AB2の重鎖可変領域307、リンカー308、及びAB2の軽鎖可変領域309を含む。第2のポリペプチドは、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、AB1の重鎖断片321、任意のリンカー322、CM2 323、任意のリンカー324、及びEMの第1のFcドメイン325を含む。第3のポリペプチドは、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、EMの第2のFcドメイン341、リンカー342、及びMM2 343を含む。代替の例示的な構成では、図3では、305は、AB1の重鎖断片であり、321は、AB1の軽鎖断片である。代替の例示的な構成では、図3では、307は、AB2の軽鎖可変領域であり、309は、AB2の重鎖可変領域である。代替の例示的な構成では、図3では、EMの第1のFcドメイン325は、Fcドメインのホール変異体であり、EMの第2のFcドメイン341は、Fcドメインのノブ変異体である。代替の例示的な構成では、図3では、EMの第1のFcドメイン325は、Fcドメインのノブ変異体であり、EMの第2のFcドメイン341は、Fcドメインのホール変異体である。

【0065】

図4は、3つのポリペプチドを含む、別の例示的な活性化可能なタンパク質400を示す。第1のポリペプチドは、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、MM1 401、任意のリンカー402、CM1 403、任意のリンカー404、AB1の軽鎖断片405、リンカー406、AB2の重鎖可変領域407、リンカー408、及びAB2の軽鎖可変領域409を含む。第2のポリペプチドは、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、AB1の重鎖断片421、任意のリンカー422、CM2 423、任意のリンカー424、及びEMの第1のFcドメイン425を含む。第3のポリペプチドは、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、MM2 441、リンカー442、及びEMの第2のFcドメイン443を含む。代替の例示的な構成では、図4では、405は、AB1の重鎖断片であり、421は、AB1の軽鎖断片である。代替の例示的な構成では、図4では、407は、AB2の軽鎖可変領域であり、409は、AB2の重鎖可変領域である。代替の例示的な構成では、図4では、EMの第1のFcドメイン425は、Fcドメインのホール変異体であり、EMの第2のFcドメイン443は、Fcドメインのノブ変異体である。代替の例示的な構成では、図4では、EMの第1のFcドメイン425は、Fcドメインのノブ変異体であり、EMの第2のFcドメイン443は、Fcドメインのホール変異体である。

【0066】

図5は、第1の標的に結合するFab構成要素(501)；CM1及びFab構成要素

をマスクするMM1を含む第1のプロドメイン(505)；第2の標的に結合するscFv構成要素(502)；CM2及びscFv構成要素をマスクするMM2を含む第2のプロドメイン(503)；及びノブとホールFcドメインの対を含むEM(504)；を含む例示的な活性化可能な二重特異性抗体を示す。活性化されると、活性化二重特異性抗体から、CM1は切断されてMM1を放出し、CM2は切断されてMM2及びFcドメイン(504)の両方を放出する。Fcドメインを欠く活性化された二重特異性抗体は、その親の活性化可能な二重特異性抗体と比較して、比較的短い半減期を有する。

【0067】

図6Aは、Her2及びCD3を標的とする例示的な活性化可能な二重特異性抗体を示す。この例では、活性化可能な二重特異性抗体は、3つのポリペプチドを含む。第1のポリペプチドは、N末端からC末端の順に、トラスツズマブのFab(抗HER2抗体)の重鎖断片；25個のアミノ酸を有するリンカー；抗CD3 scFv；27個のアミノ酸を有するGSATリンカー；CM1；抗CD3 scFvをマスクするMM1；24個のアミノ酸を有するGSリンカー；及びFcドメインのホール変異体；を含む。第2のポリペプチドは、Fabを作製するためのMM2、CM2、及びFabの軽鎖断片を含む。第3のポリペプチドは、Fcドメインのノブ変異体を含む。図6の構成を有する活性化可能な二重特異性抗体の例は、配列番号21～24のいずれか1つの配列を含む第1のポリペプチド、配列番号18の配列を含む第2のポリペプチド、及び配列番号1の配列を含む第3のポリペプチドを含み得る。図6Bは、図6Aに示す活性化可能な二重特異性抗体を形成する3つのポリペプチドの概略図である。

【0068】

図10は、3つのポリペプチドを含む、別の例示的な活性化可能なタンパク質1000を示す。第1のポリペプチドは、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、MM1 1001、任意のリンカー1002、CM1 1003、任意のリンカー1004、及びAB1の軽鎖断片1005を含む。第2のポリペプチドは、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、MM2 1021、任意のリンカー1022、CM2 1023、任意のリンカー1024、AB2の重鎖可変領域1025、リンカー1026、AB2の軽鎖可変領域1027、リンカー1028、AB1の重鎖断片1029、任意のリンカー1030、第3の切断可能な部分(CM3) 1031、任意のリンカー1032、及びEMの第1のドメイン(EM1) 1033を含む。第3のポリペプチドは、EMの第2のドメイン(EM2) 1041を含む。代替の例示的な構成では、図10では、1005は、AB1の重鎖断片であり、1029は、AB1の軽鎖断片である。代替の例示的な構成では、図10では、1025は、AB2の軽鎖可変領域であり、1027は、AB2の重鎖可変領域である。代替の例示的な構成では、図10では、EMの第1のドメイン(EM1) 1033は、Fcドメインのホール変異体であり、EMの第2のドメイン(EM2) 1041は、Fcドメインのノブ変異体である。代替の例示的な構成では、図10では、EM1 1033は、Fcドメインのノブ変異体であり、EM2 1041は、Fcドメインのホール変異体である。

【0069】

図11は、3つのポリペプチドを含む、別の例示的な活性化可能なタンパク質1100を示す。第1のポリペプチドは、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、MM2 1101、任意のリンカー1102、CM2 1103、任意のリンカー1104、AB2の重鎖可変領域1105、リンカー1106、AB2の軽鎖可変領域1107、リンカー1108、及びAB1の軽鎖断片1109を含む。第2のポリペプチドは、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、MM1 1121、任意のリンカー1122、CM1 1123、任意のリンカー1124、AB1の重鎖断片1125、任意のリンカー1126、第3の切断可能な部分(CM3) 1127、任意の1128、及びEMの第1のドメイン(EM1) 1129を含む。第3のポリペプチドは、EMの第2のドメイン(EM2) 1141を含む。代替の例示的な構成では、図11では、1109は、AB1の重鎖断片であり、1125は、AB1の軽鎖断片である。

代替の例示的な構成では、図 11 では、1105 は、AB2 の軽鎖可変領域であり、1107 は、AB2 の重鎖可変領域である。代替の例示的な構成では、図 11 では、EM1 1129 は、Fc ドメインのホール変異体であり、EM2 1141 は、Fc ドメインのノブ変異体である。代替の例示的な構成では、図 11 では、EM1 1129 は、Fc ドメインのノブ変異体であり、EM2 1141 は、Fc ドメインのホール変異体である。
【0070】

図 12 は、第 1 の標的に結合する Fab 構成要素 (1204) ; CM1 (破線) 及び Fab 構成要素をマスクする MM1 (三角形) を含む第 1 のプロドメイン (1203) ; 第 2 の標的に結合する scFv 構成要素 (1202) ; CM2 (破線) 及び scFv 構成要素をマスクする MM2 (三角形) を含む第 2 のプロドメイン (1201) ; ノブとホール Fc ドメインの対を含む EM (1206) ; 及び EM と Fab との間の第 3 の切断可能な部分 (CM3) (1205) ; を含む例示的な活性化可能な二重特異性抗体を示す。活性化されると、活性化二重特異性抗体から、CM1 は切断されて MM1 を放出し、CM2 は切断されて MM2 を放出し、CM3 は切断されて EM (1206) を放出する。EM を欠く活性化された二重特異性抗体は、その親の活性化可能な二重特異性抗体と比較して、比較的短い半減期を有する。

【0071】

いくつかの実施形態では、本開示の活性化可能なタンパク質の活性化より生じる活性化タンパク質は、EM に付着されない。このような活性化タンパク質は、活性化可能なタンパク質と比較して、より短い半減期を有し得る。このような活性化タンパク質は、活性化タンパク質と同じであるが EM を含む対応するタンパク質と比較して、より短い半減期を有し得る。本明細書で使用する場合、「半減期」という用語は、分子または分子複合体の濃度が、環境中でその元の濃度の 50 % に到達するのにかかる時間である。いくつかの例では、環境は、血清であってもよく、半減期は、血清半減期であり、これは、分子または分子の複合体の濃度が、血清中 (例えば、対象の循環中) のその元の濃度の 50 % に到達するのにかかる時間である。いくつかの例では、AB1 及び AB2 を含むが、MM1、MM2 または EM を含まない活性化タンパク質 (すなわち、活性化可能なタンパク質の活性化より生じるタンパク質) は、活性化タンパク質と同じであるが EM を含む対応するタンパク質と比較して、より短い半減期を有し得る。すなわち、活性化分子 (AB1-AB2) の半減期は、対応するタンパク質 (AB1-AB2-EM) の半減期より短い。

【0072】

例えば、本明細書の活性化可能なタンパク質の活性化より生じる活性化タンパク質は、15 日、14 日、13 日、12 日、11 日、10 日、9 日、8 日、7 日、6 日、5 日、4 日、3 日、2 日、1 日、23 時間、22 時間、21 時間、20 時間、19 時間、18 時間、17 時間、16 時間、15 時間、14 時間、13 時間、12 時間、11 時間、10 時間、9 時間、8 時間、7 時間、6 時間、5 時間、4 時間、または 3 時間未満の半減期 (例えば、血清半減期) を有し得る。一例では、本明細書の活性化可能なタンパク質の活性化より生じる活性化タンパク質は、5、4、3、または 2 日以下の半減期 (例えば、血清半減期) を有し得る。いくつかの例では、本明細書の活性化可能なタンパク質の活性化より生じる活性化タンパク質は、活性化タンパク質と同じであるが EM を含む対応するタンパク質の最大 90 %、80 %、70 %、60 %、50 %、40 %、30 %、20 %、10 %、または 5 % の半減期 (例えば、血清半減期) を有し得る。

【0073】

いくつかの実施形態では、本明細書の活性化可能なタンパク質の活性化より生じる活性化タンパク質 (すなわち、EM または MM に付着していない活性化タンパク質) は、活性化タンパク質と同じであるがそれに付着した EM を含む対応するタンパク質と比較して、より高い標的結合活性を有し得る。いくつかの例では、TB1 及び TB2 を含むが MM1、MM2 または EM を含まない活性化タンパク質は、活性化タンパク質と同じであるが EM を含む対応するタンパク質 (すなわち、TB1-TB2-EM) よりも大きい、標的結合活性のレベルを有する。例えば、本明細書で開示される活性化可能なタンパク質の活性

化より生じる活性化タンパク質は、活性化タンパク質と同じであるが E M を含む対応するタンパク質の標的結合活性よりも、少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、3 倍、4 倍、6 倍、8 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍、200 倍、300 倍、400 倍、または 500 倍大きい、標的結合活性を有し得る。

【0074】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質（活性化の前）は、直接的にまたは間接的にのいずれかで、M M がそれにカップリングしていない T B の標的結合活性の対照レベルよりも低い標的結合活性によって特徴付けられ得る。例えば、いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、M M がそれにカップリングしていない T B の標的結合活性の対照レベルと比較して、標的化結合活性が、少なくとも 2、4、6、8、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000、または 10000 倍低いことによって特徴付けられる。

【0075】

標的結合タンパク質

本開示による活性化可能なタンパク質は、1 つ以上の標的結合タンパク質（T B）を含み得る。いくつかの例では、活性化可能なタンパク質は、多重特異性であり得る。例えば、活性化可能なタンパク質は、それぞれが同じ標的上の異なるエピトープに対する特異性を有する、複数の T B を含み得る。いくつかの例では、本明細書の活性化可能なタンパク質の T B は、異なる標的、例えば、異なる細胞型上の標的に結合し得る。このように、本明細書に開示される活性化可能なタンパク質の活性化より生じる活性化タンパク質では、T B は、異なる細胞型を共局在させ得る。本開示の多重特異性の活性化可能なタンパク質のいくつかの例では、T B の一方は、免疫細胞上の標的に結合し、T B の他方は、疾患に関連する細胞に結合する。免疫細胞及び疾患に関連する細胞を標的とし、それらを共局在させることによって、活性化タンパク質は、疾患の標的治療を提供し得る。

【0076】

いくつかの実施形態では、標的結合タンパク質（T B）は、抗原結合タンパク質（A B）であり得る。いくつかの実施形態では、A B は、抗体またはその断片、例えば、モノクローナル抗体、単鎖抗体、F a b 断片、F (a b')₂ 断片、単鎖可変断片（s c F v）、ダイアボディ（s c F v の非共有結合二量体）、単鎖抗体（s c a b）、V H H、ドメイン抗体（d A b）、または単一ドメイン抗体（ナノボディ、例えば、単一ドメイン重鎖抗体、単一ドメイン軽鎖抗体）であり得る。単一ドメイン抗体は、単一の単量体可変抗体ドメインである、抗体断片であり得る。単一ドメイン抗体は、対応する完全長抗体と同様の抗原への親和性を有し得る。いくつかの実施形態では、A B は、完全長抗体であり得る。いくつかの実施形態では、A B は、免疫学的に活性な断片であり得る。いくつかの実施形態では、A B は、抗原結合断片（「F a b」）であり得る。一例では、活性化可能なタンパク質は、第 1 の A B として F a b、及び第 2 の A B として s c F v を含む。いくつかの実施形態では、A B は、s c F v であり得る。いくつかの実施形態では、A B は、マウス、他のげっ歯類、キメラ、ヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体であり得る。本開示は、上記のドメインのいずれかを含む 1 つ以上のポリペプチド、例えば、S D A、F v、S c F v、F a b、s c F a b、V H H、及び d A b のうちの 1 つ以上と、S D A、F v、s c F v、F a b、V H H、s c F a b、及び d A b から選択される 1 つ以上との組み合わせを有する構造を含む。

【0077】

「抗体」という用語は、本明細書ではその最も広い意味で使用され、抗原またはエピトープに特異的に結合する 1 つ以上の抗原結合ドメインを含む、特定の種類の免疫グロブリン分子を含む。「抗体」という用語には、例えば、インタクト抗体（例えば、インタクト免疫グロブリン）、抗体断片、二重特異性、及び多重特異性抗体が具体的に含まれる。抗体の一例は、V_H-V_L 二量体によって形成される抗原結合ドメインである。抗体の更な

る例は、本明細書に記載されている。抗体の更なる例は、当技術分野で既知である。

【0078】

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

【0079】

「重鎖」は、1つの可変ドメイン（V_H）及び3つの定常領域ドメイン（C_H1、C_H2、C_H3）からなる。5つの主要な重鎖クラスまたはアイソタイプがあり、そのうちのいくつかはいくつかのサブタイプを有し、これらは抗体分子の機能的活性を決定する。免疫グロブリンの5つの主要なクラスは、免疫グロブリンM（IgM）、免疫グロブリンD（IgD）、免疫グロブリンG（IgG）、免疫グロブリンA（IgA）、及び免疫グロブリンE（IgE）である。IgGは、突出して最も豊富な免疫グロブリンであり、いくつかのサブクラス（ヒトでは、IgG1、2、3及び4）を有する。

10

【0080】

「断片抗原結合」（Fab）は、重鎖のV_Hドメイン及びC_H1ドメインと対になった完全な軽鎖を含有する。AF（ab'）₂断片は、抗体がペプシンによってヒンジ領域以下で切断される場合に形成され、その場合、抗体分子の2つの断片抗原結合ドメイン（Fab）は連結されたままである。AF（ab'）₂断片は、ヒンジ領域によって互いに接合された重鎖のV_H及びC_H1の2つのドメインと対合した2つの完全な軽鎖を含有する。「断片結晶化可能」（Fc）断片（本明細書ではFcドメインとも呼ばれる）は、対になったC_H2及びC_H3ドメインに対応し、エフェクター分子及び細胞と相互作用する抗体分子の一部である。重鎖アイソタイプ間の機能的な差異は、主にFc断片にある。「単鎖F_v」（scF_v）は、一続きの合成ペプチドによって重鎖の可変ドメイン（V_H）に連結された軽鎖の可変ドメイン（V_L）のみを含有する。単鎖F_vという名称は、断片可変に由来する。「ヒンジ領域」または「ドメイン間」は、Fab断片をFcドメインに接合または連結する可撓性なアミノ酸の伸長である。「合成ヒンジ領域」は、Fab断片をFcドメインに接合または連結するアミノ酸配列である。

20

【0081】

「プロドメイン」は、マスキング部分（MM）と呼ばれる抗原結合を阻害する部分と、切断可能ペプチド（CM）と呼ばれるプロテアーゼ切断可能基質を含む部分とを有し、標的結合タンパク質（TB）（例えば、抗体またはその抗原結合断片などの抗原結合タンパク質（AB））に連結されると、TBまたはABによる抗原結合を阻害するように機能する。プロドメインは、MMとCMとの間にリンカーペプチド（L1）を含み得る。プロドメインはまた、抗体へのプロドメインの結合を容易にするために、プロドメインのカルボキシル末端にリンカーペプチド（L2）を含んでもよい。特定の実施形態では、プロドメインは、以下の式（下記の式は、N末端からC末端方向のアミノ酸配列を表す）、すなわち、（MM）－（CM）、（MM）－L1－（CM）、（MM）－（CM）－L2、または（MM）－L1－（CM）－L2のうちの1つを含む。

30

【0082】

TB（例えば、AB）は、標的に特異的に結合する。本明細書で使用する場合、「特異的結合」、「免疫学的結合」及び「免疫学的結合特性」という用語は、免疫グロブリン分子とその免疫グロブリンが特異的である抗原との間に生じる、その種類の非共有結合的相互作用を指す。免疫学的結合相互作用の強度または親和性は、相互作用の解離定数（K_d）の観点から表すことができ、より小さなK_dはより大きな親和性を表す。選択されるポリペプチドの免疫学的結合特性は、当技術分野において周知である方法を使用して定量化することができる。1つのそのような方法は、抗原結合部位／抗原複合体形成及び解離の速度の測定を伴い、それらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、及び両方向において速度に等しく影響する幾何的パラメータに依存する。したがって、「オン速度定数」（K_{on}）及び「オフ速度定数」（K_{off}）の両方は、濃度ならびに会合及び解離の実際の速度を計算することによって決定することができる（Nature 361：186－87（1993）を参照されたい）。K_{off}／K_{on}の比率は、親和性に

40

50

関連しない全てのパラメータの解除を可能にし、解離定数 K_d に等しい（一般に、Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473 を参照されたい）。本開示の T B または抗体結合ドメイン (A B) は、放射性リガンド結合アッセイまたは当業者に既知の同様のアッセイなどのアッセイによって測定されるように、解離定数 (K_d) が $100 \mu M$ 以下、いくつかの実施形態では $1 \mu M$ 以下、いくつかの実施形態では $100 nM$ 以下、いくつかの実施形態では $10 nM$ 以下、及びいくつかの実施形態では $100 pM$ 以下～約 $1 pM$ の場合、標的に「特異的に結合する」または「免疫特異的に結合する」と言われる。

【0083】

T B (例えば A B) の標的は、タンパク質または他のタイプの分子であり得る。T B の例示的な標的には、細胞表面受容体及び分泌結合タンパク質 (例えば、増殖因子)、可溶性酵素、構造タンパク質 (例えば、コラーゲン、フィブロネクチン) などが含まれる。いくつかの例では、T B の標的は、対象における疾患 (例えば、がん) に関連するタンパク質であり得る。

【0084】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質中の T B は、疾患に関連する細胞上または細胞内の分子である標的に結合し得る。例えば、活性化可能なタンパク質中の T B は、腫瘍細胞に結合し得る。このような場合、T B は、腫瘍関連抗原に結合し得る。本明細書で使用する場合、「腫瘍関連抗原」という用語は、がんに関連するタンパク質、糖タンパク質、ガングリオシド、炭水化物、脂質を含む任意の抗原を意味する。このような抗原は、腫瘍細胞 (例えば、悪性細胞) 上で、または腫瘍微小環境において、例えば、腫瘍関連血管、細胞外マトリックス、間葉系間質、もしくは免疫浸潤物上に発現し得る。いくつかの実施形態では、A B の標的である腫瘍関連抗原は、ヒト上皮増殖因子受容体 2 (HER2) であり得る。例えば、A B は、トラスツズマブまたはその断片、例えば、トラスツズマブの Fab であり得る。

【0085】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質中の A B は、免疫細胞上の分子であり、及び／または免疫細胞を活性化することができる、標的に結合し得る。いくつかの例では、A B の標的は、共刺激分子でもよく、これは、高効率の免疫応答に必要とされる抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。A B の標的であり得る共刺激分子の例としては、T 細胞受容体 (TCR)、CD3ゼータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、及びCD3イプシロンの構成要素が挙げられる。

【0086】

いくつかの例では、A B は、抗原結合分子と相互作用して T 細胞の活性化を誘導することができる、T リンパ球、例えば、細胞毒性 T リンパ球の表面に発現する共刺激分子に結合し得る。抗原結合分子と活性化 T 細胞抗原との相互作用は、T 細胞受容体複合体のシグナル伝達カスケードを誘発することによって T 細胞の活性化を誘導し得る。活性化されると、A B は、このような共刺激分子に結合して T 細胞を活性化し得る。本明細書で使用する場合、「T 細胞活性化」とは、増殖、分化、サイトカイン分泌、細胞毒性エフェクター分子の放出、細胞毒性活性、及び活性化マーカーの発現から選択される、T リンパ球、特に、細胞毒性 T リンパ球のうちの 1 つ以上の細胞応答を指す。本発明の T 細胞活性化二重特異性抗原結合分子は、T 細胞の活性化を誘導することができる。

【0087】

いくつかの例では、A B は、CD3 に結合し得る。例えば、CD3 は、CD3 のイプシロンサブユニット、例えば、NCBI RefSeq 番号 NP_000724.1 であり得る。いくつかの例では、A B は、抗 CD3 scFv であり得る。抗 CD3 scFv は、米国特許第 20190135943 号 (これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) の配列番号 1～9、143～145、149、及び 150 のうちの 1 つ以上の配列を含み得る。このような配列としては、例えば、以下が挙げられる：

10

20

30

40

50

【表 6 - 1】

抗CD3バリエントv12
軽鎖可変ドメインLV12 <u>QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSS</u> <u>TGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDR</u> <u>FSGSILGNKAALTITGAQADDES DY YC</u> <u>ALWYSNLWVFG</u> GGTKLTVL (配列番号47)
重鎖可変ドメインHV12、
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAY WGQGTLVTVSS (配列番号48)
LV12-L3-HV12、L3は、GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号28) である
QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSSTGAVTTSNYANWV QQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALT ITGAQADDES DY YC <u>ALWYSNLWVFGGGTKLTVL</u> [<u>GGGG</u> <u>SGGGGSGGGGS</u>] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGN NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS (配列番号49)

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

抗CD3バリエントv16	
軽鎖可変ドメインLV12	
上記に提供される配列	
重鎖可変ドメインHV20	
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVR QASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHNFGNSYVSWFAY WGQGTTLVTVSS (配列番号50)	10
LV12-L3-HV20	
QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALT ITGAQADDES DY YCALWYSNLWVFGGGTKLTVL [GGGG SGGGGSGGGGS] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHN NFGNSYVSWFAYWGQGTTLVTVSS (配列番号51)	20
抗CD3バリエントv19	
軽鎖可変ドメインLV19 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPAR FSGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVL (配列番号52)	
重鎖可変ドメインHV20	
上記に提供される配列	30
LV19-L3-HV20	
QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALT LSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL [GGGG SGGGGSGGGGS] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHN NFGNSYVSWFAYWGQGTTLVTVSS (配列番号53)	40

【表 6 - 3】

抗CD3バリアントv26
軽鎖可変ドメインLV19
上記に提供される配列
重鎖可変ドメインHV12
上記に提供される配列
LV19-L3-HV12
QAVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALT LSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL [GGGG SGGGGSGGGGS] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS (配列番号54)

10

20

【0088】

CD3結合抗体の例示的なCDR配列としては、以下が挙げられる：

【表 7】

名称	CD3 Ab CDR配列	配列番号
SP34L1	RSSTGAVTTSNYAN	配列番号7
SP34L2	GTNKRAP	配列番号8
SP34L3	ALWYSNLWV	配列番号9
SP34H1	TYAMN	配列番号10
SP34H2	RIRSKYNNYATYYADSVKD	配列番号11
SP34H3	HGNFGNSYVSWFAY	配列番号12

30

【0089】

抗CD3 ABの追加の例としては、以下が挙げられる：

40

50

【表 8 - 1】

v 6 1 9 _ H L c

VH CD R 1	配列番号 1 0	TYAMN
VH CD R 2	配列番号 1 1	R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D
VH CD R 3	配列番号 1 3	H G N F G N S Y V S W W A Y
VL CD R 1	配列番号 1 4	R S S T G A V T T S N Y P N
VL CD R 2	配列番号 8	G T N K R A P
VL CD R 3	配列番号 1 5	V L W Y S N R W V
重鎖可変ド メイン	配列番号 3 0	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S T Y A M N W V R Q A S G K G L E W V G R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y V S W W A Y W G Q G T L V T V S S
軽鎖可変ド メイン	配列番号 1 6	Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C R S S T G A V T T S N Y P N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L
s c F v	配列番号 1 9	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S T Y A M N W V R Q A S G K G L E W V G R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y V S W W A Y W G Q G T L V T V S S <u>S G G G G S G G</u> <u>G G S G G G G S</u> Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C R S S T G A V T T S N Y P N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

v 6 1 9 __H L h

VH CD R 1	配列番号 1 0	TYAMN
VH CD R 2	配列番号 1 1	R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D
VH CD R 3	配列番号 1 3	H G N F G N S Y V S W W A Y
VL CD R 1	配列番号 2 0	G S S T G A V T T S N Y V N
VL CD R 2	配列番号 8	G T N K R A P
VL CD R 3	配列番号 1 5	V L W Y S N R W V
重鎖可変ド メイン	配列番号 3 0	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S T Y A M N W V R Q A S G K G L E W V G R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y V S W W A Y W G Q G T L V T V S S
軽鎖可変ド メイン	配列番号 2 5	Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T T S N Y V N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L I G G K A A L T L S G A Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L
s c F v	配列番号 2 6	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S T Y A M N W V R Q A S G K G L E W V G R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y V S W W A Y W G Q G T L V T V S S G G G G S G G <u>G G S G G G G S</u> Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T T S N Y V N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L I G G K A A L T L S G A Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

v 6 1 9 - H L h - C C 4

VH CD R 1	配列番号 1 0	TYAMN
VH CD R 2	配列番号 1 1	R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D
VH CD R 3	配列番号 1 2	H G N F G N S Y V S W F A Y
VL CD R 1	配列番号 2 0	G S S T G A V T T S N Y V N
VL CD R 2	配列番号 8	G T N K R A P
VL CD R 3	配列番号 1 5	V L W Y S N R W V
重鎖可変ド メイン	配列番号 5 5	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTTFSTYAMNWVRQASGK GLEWVGRI RSKYNNYATYYADSV KDRFTI SRDDSKNTAYLQMNSL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGCGLTVTVSS
軽鎖可変ド メイン	配列番号 5 6	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC GSSTGAVTTSNYVNWVQQKPGC APRGLIGGTNKRAPGTPARFSG SLIGGKAALTLSGAQPEDEAEY YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
s c F v	配列番号 5 7	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTTFSTYAMNWVRQASGK GLEWVGRI RSKYNNYATYYADSV KDRFTI SRDDSKNTAYLQMNSL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGCGLTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTTSNYVN WVQQKPGCAPRGLIGGTNKRAP GTPARFSGSLIGGKAALTLSGA QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGG GTKLTVL

10

20

30

40

50

【表 8 - 4】

v 6 1 9 _ H h 8

VH CD R 1	配列番号 1 0	TYAMN
VH CD R 2	配列番号 1 1	R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D
VH CD R 3	配列番号 1 3	H G N F G N S Y V S W W A Y
VL CD R 1	配列番号 2 0	G S S T G A V T T S N Y V N
VL CD R 2	配列番号 8	G T N K R A P
VL CD R 3	配列番号 3 9	V L W Y S N L W V
重鎖可変ド メイン	配列番号 3 0	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S T Y A M N W V R Q A S G K G L E W V G R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y V S W W A Y W G Q G T L V T V S S
軽鎖可変ド メイン	配列番号 5 8	Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T T S N Y V N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L I G G K A A L T L S G A Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N L W V F G G G T K L T V L
s c F v	配列番号 5 9	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S T Y A M N W V R Q A S G K G L E W V G R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y V S W W A Y W G Q G T L V T V S S <u>G G G G S G G</u> <u>G G S G G G S</u> Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T T S N Y V N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L I G G K A A L T L S G A Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N L W V F G G G T K L T V L

10

20

30

40

50

【表 8 - 5】

v 6 1 9 __HL p 2

VH CD R 1	配列番号 1 0	TYAMN
VH CD R 2	配列番号 1 1	R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D
VH CD R 3	配列番号 1 3	H G N F G N S Y V S W W A Y
VL CD R 1	配列番号 6 0	R S S T G A V T T S N Y V N
VL CD R 2	配列番号 8	G T N K R A P
VL CD R 3	配列番号 6 1	I L W Y S N R W V
重鎖可変ド メイン	配列番号 3 0	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S T Y A M N W V R Q A S G K G L E W V G R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y V S W W A Y W G Q G T L V T V S S
軽鎖可変ド メイン	配列番号 6 2	Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C R S S T G A V T T S N Y V N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L I G G K A A L T L S G A Q P E D E A E Y Y C I L W Y S N R W V F G G G T K L T V L
s c F v	配列番号 6 3	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S T Y A M N W V R Q A S G K G L E W V G R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y V S W W A Y W G Q G T L V T V S S <u>G G G G S G G</u> <u>G G S G G G G S</u> Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C R S S T G A V T T S N Y V N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L I G G K A A L T L S G A Q P E D E A E Y Y C I L W Y S N R W V F G G G T K L T V L

10

20

30

40

50

【表 8 - 6】

v 6 1 9 _ H h 1 3

VH CD R 1	配列番号 1 0	TYAMN
VH CD R 2	配列番号 1 1	R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D
VH CD R 3	配列番号 1 3	H G N F G N S Y V S W W A Y
VL CD R 1	配列番号 6 0	R S S T G A V T T S N Y V N
VL CD R 2	配列番号 8	G T N K R A P
VL CD R 3	配列番号 1 5	V L W Y S N R W V
重鎖可変ド メイン	配列番号 3 0	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S T Y A M N W V R Q A S G K G L E W V G R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y V S W W A Y W G Q G T L V T V S S
軽鎖可変ド メイン	配列番号 6 4	Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C R S S T G A V T T S N Y V N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L I G G K A A L T L S G A Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L
s c F v	配列番号 6 5	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S T Y A M N W V R Q A S G K G L E W V G R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y V S W W A Y W G Q G T L V T V S S <u>G G G G S G G</u> <u>G G S G G G S</u> Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C R S S T G A V T T S N Y V N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L I G G K A A L T L S G A Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L

【0090】

いくつかの実施形態では、本明細書の活性化可能なタンパク質は、腫瘍関連抗原に結合する A B 1、及び共刺激分子に結合する A B 2 を含み得る。一例では、活性化可能なタンパク質は、H E R 2 に結合する A B 1、及び C D 3 に結合する A B 2 を含み得る。特定の例では、活性化可能なタンパク質は、抗 H E R 2 F a b（例えば、トラスツズマブの F a b）である A B 1、及び抗 C D 3 s c F v である A B 2 を含み得る。

【0091】

いくつかの実施形態では、A B 2 は、任意の免疫エフェクター細胞上の抗原である標的に結合し得る。免疫エフェクター細胞の例としては、白血球、T 細胞、ナチュラルキラー

(NK)細胞、マクロファージ、単核細胞、及び骨髓性単核細胞が挙げられる。いくつかの例では、活性化可能なタンパク質は、免疫エフェクター細胞を別の細胞（例えば、がんまたは感染症などの疾患に関連する細胞）と架橋する二重特異性の活性化可能な抗体に会合する免疫エフェクター細胞を含み得る。

【0092】

活性化可能なタンパク質は、白血球細胞に会合する二重特異性の活性化可能な抗体、T細胞に会合する二重特異性の活性化可能な抗体、NK細胞に会合する二重特異性の活性化可能な抗体、マクロファージ細胞に会合する二重特異性の活性化可能な抗体、単核細胞に会合する二重特異性の活性化可能な抗体、または骨髓性単核細胞に会合する二重特異性の活性化可能な抗体を含み得る。一例では、活性化可能な抗体は、T細胞に会合する二重特異性抗体を含み得る。

10

【0093】

半減期延長部分

活性化可能なタンパク質は、半減期延長部分（EM）を含み得る。活性化可能なタンパク質では、EMは、CMを介して活性化可能なタンパク質中のTBまたはその構成要素にカップリングされ得る。活性化可能なタンパク質の活性化の際に、EMは、TBから切断され得る。いくつかの実施形態では、例えば、CMは、TBのC末端とEMのN末端との間の位置に配置される。これらの実施形態の特定では、CMは、TBのC末端とEMのN末端との間の位置に配置され、MMは、CMに対してC末端、及びEMに対してN末端またはC末端のいずれかである位置に配置される（例えば、N末端からC末端へ、TB-CM-EM、TB-CM-MM、TB-CM-MM-EMなどであり、各「-」は、独立して、直接または間接（例えば、リンカーを介した）カップリングを示す）（例えば、図1及び図2を参照されたい）。いくつかの実施形態では、EMは、二量体、例えば、免疫グロブリンのFcドメインの対であってもよい。このような実施形態では、第1のポリペプチドは、TB、CM、及び第1のFcドメインを含み得、第2のポリペプチドは、MM及び第2のFcドメインを含み得、2つのポリペプチドは、第1のFcドメインと第2のFcドメインとの間で1つ以上のジスルフィド結合を介して共有結合している。このような実施形態では、MMは、第2のFcドメインのN末端またはC末端のいずれかに配置され得（例えば、図3及び図4を参照のこと）、第1のポリペプチド上のCMが切断されると、活性化タンパク質からのMM及びEM（例えば、Fcドメインの両方）が放出される。したがって、いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質の活性化より生じる活性化タンパク質は、EMを含まない。いくつかの例では、半減期延長部分は、血清半減期延長部分であってもよく、すなわち、血清中のEMに結合した分子の半減期を延長することができる。

20

30

【0094】

いくつかの例では、EMは、抗体の断片結晶化可能領域（Fcドメイン）を含み得る。例えば、EMは、IgG（例えば、IgG1、IgG2、またはIgG4）のFcドメインであり得る。いくつかの例では、EMは、2つのFcドメインによって形成される二量体を含み得る。Fcドメインは、野生型Fcドメイン、またはその変異体であり得る。例えば、EMは、2つのFcドメイン変異体によって形成される二量体を含み得る。このような場合、2つのFcドメイン変異体は、Fcドメインのホール変異体、及びFcドメインのノブ変異体を含み得る。ノブ及びホール変異体は、互いに相互作用して、2つのFcドメインの二量体化を促進してよい。いくつかの実施形態では、ノブ及びホール変異体は、2つのFcドメイン間の境界面内に（例えば、CH3ドメインに）、1つ以上のアミノ酸修飾を含んでよい。一例では、修飾には、抗体重鎖の一方におけるアミノ酸置換T366W、及び所望によりアミノ酸置換S354C、ならびに抗体重鎖のもう一方におけるアミノ酸置換T366S、L368A、Y407V、及び所望によりY349Cが含まれる（EU番号付けシステムに準拠して番号付け）。Fcドメインのノブ変異体の例は、配列番号1の配列を含む。Fcドメインのホール変異体の例は、配列番号2の配列を含む。

40

【0095】

50

F cドメイン変異体の例は、米国特許第7,695,936号（これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるものも含む。一例では、修飾は、一方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換T366Y、及び他方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換Y407Tを含む。一例では、修飾は、一方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換T366W、及び他方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換Y407Aを含む。一例では、修飾は、一方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換F405A、及び他方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換T394Wを含む。一例では、修飾は、一方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換T366Y及びF405A、及び他方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換T394W及びY407Tを含む。一例では、修飾は、一方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換T366W及びF405W、及び他方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換T394S及びY407Aを含む。一例では、修飾は、一方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換F405W及びY407A、及び他方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換T366W及びT394Sを含む。一例では、修飾は、一方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換F405W、及び他方のI g G F cドメインにおけるアミノ酸置換T394Sを含む。F cドメイン内の変異位置は、E U番号付けシステムに従って番号付けされる。I g G F cドメインは、配列番号3～6の配列（I g G 1、I g G 2、I g G 3またはI g G 4）を含み得る。これらの配列では、アミノ酸1～107は、E U番号付け341～447に対応する。

10

20

30

40

50

【0096】

いくつかの例では、F cドメイン変異体は、エフェクター機能が低減している場合がある。このようなF cドメインの例としては、米国特許第20190135943号で開示されているものが挙げられ、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0097】

E Mの更なる例としては、免疫グロブリン（例えば、I g G）、血清アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、ヘキサ-*h a t* GST（グルタチオンSトランスフェラーゼ）グルタチオンアフィニティー、カルモジュリン結合ペプチド（CBP）、ストレプトタグ、セルロース結合ドメイン、マルトース結合タンパク質、S-ペプチドタグ、キチン結合タグ、免疫反応性エピトープ、エピトープタグ、E2Tag、HAエピトープタグ、My cエピトープ、FLAGエピトープ、AU1及びAU5エピトープ、Glu-Gluエピトープ、KT3エピトープ、IRSエピトープ、Btagエピトープ、プロテインキナーゼ-Cエピトープ、ならびにVSVエピトープが挙げられる。

【0098】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質の血清半減期は、活性化可能なタンパク質と同じであるが半減期延長部分を有しない対応するタンパク質のものよりも長くてもよい。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質の血清半減期は、活性化タンパク質の血清半減期よりも長くてもよい。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質の血清半減期は、生物に投与された場合、少なくとも15日、12日、11日、10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日、3日、2日、1日、20時間、18時間、16時間、14時間、12時間、10時間、8時間、6時間、4時間、3時間、2時間、または1時間である。

【0099】

マスキング部分（MM）

本明細書の活性化可能なタンパク質は、標的へのTBの結合を妨害することができる1つ以上のマスキング部分（MM）を含み得る。活性化可能な分子内のマスキング部分は、活性化可能な高分子のその標的及び／またはエピトープへの結合を「マスクする」もしくは低減するか、または別の方法で阻害する。いくつかの実施形態では、標的結合タンパク質（TB）（例えば、ABまたは他の治療用もしくは診断用タンパク質）のMMとのカップリングまたは修飾は、当技術分野で既知の阻害（例えば、構造変化、抗原結合ドメインの競合など）により、TBがその標的及び／またはエピトープに特異的に結合する能力を

阻害し得る。いくつかの実施形態では、TBのMMとのカップリングまたは修飾は、TBがその標的及び／またはエピトープに特異的に結合する能力を低減または阻害する構造変化をもたらし得る。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインを含むタンパク質のMMとのカップリングまたは修飾は、抗原結合ドメインがその標的及び／またはエピトープに特異的に結合する能力を立体的に遮断、低減または阻害する。MMは、CMによって、直接的にまたは間接的に（例えば、本明細書に記載の1つ以上のリンカーを介して）のいずれかで、TB（例えば、AB）にカップリングされることができる。

【0100】

あるいは、TBの標的結合を妨害するMMは、TBではない活性化可能なタンパク質の構成要素にカップリングされ得る。例えば、図2に例示されているように、活性化可能なタンパク質は、TB1及びTB2を含んでもよく、TB2を妨害するMMは、TB1にカップリングされ得る。別の例では、図3及び図4に例示するように、活性化可能なタンパク質は、TB1、TB2、及びEMを含み得、TB2を妨害するMMは、EMにカップリングされ得る。いずれの場合も、活性化可能な構造の三次構造または四次構造では、MMは、MMがTBをマスクすることを可能にする位置（例えば、マスクされるTBの近位）にあり得る。

【0101】

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

【0102】

いくつかの実施形態では、MMは、天然に存在しないアミノ酸配列、または天然に存在する結合パートナーもしくは標的タンパク質のアミノ酸配列を含有しないアミノ酸配列を含み得る。特定の実施形態では、MMは、TBの天然の結合パートナーではない。いくつかの実施形態では、MMは、TBの天然結合パートナーの4、5、6、7、8、9、または10つを超える連続したアミノ酸残基の部分配列を含まない。MMは、TBへの結合親和性及び／または結合活性が低下しているアミノ酸の変化を含有する、TBの修飾された結合パートナーであってよい。いくつかの実施形態では、MMは、TBの天然の結合パートナーとの核酸またはアミノ酸相同性を含有しない場合がある、または実質的に含有しない場合がある。他の実施形態では、MMは、TBの天然の結合パートナーに、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%または80%以下類似している。

【0103】

いくつかの実施形態では、MMは、TB（または他の活性化可能なタンパク質）に特異的に結合しない場合があるが、非特異的相互作用、例えば、立体障害を介してその結合パートナーへの標的結合タンパク質（例えば、AB）の結合を妨げる。例えば、活性化可能なタンパク質の三次構造または四次構造により、MMが電荷ベースの相互作用を介してABをマスクし、それによって、MMを適切な位置に保持して、結合パートナーがTBに近づくことを妨げることが可能となるように、MMは、活性化可能なタンパク質中に配置され得る。

【0104】

いくつかの実施形態では、MMは、標的に対するTBの解離定数以下である、標的結合タンパク質（例えば、AB）への結合についての解離定数を有し得る。いくつかの実施形態では、MMは、切断状態にある標的への結合についてTBを妨害しないか、またはTBと競合しない場合がある。

【0105】

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

【0106】

いくつかの実施形態では、MMは、カップリングされたTBに固有であり得る。MMの例としては、TB、例えば、AB、またはその断片（例えば、親和性マスク）の結合ドメインに結合することに特異的にスクリーニングされたMMが挙げられる。TBに固有であり、結合パートナー／標的の結合ドメインに特異的に及び／または選択的に結合するMMを得るための、MMをスクリーニングする方法が本明細書で提供され、タンパク質ディスプレイ法を含むことができる。

【0107】

本明細書で使用する場合、「マスキング効率」または「ME」という用語は、対照標的結合タンパク質（例えば、抗体）の活性で割った活性化可能なタンパク質の活性（例えば、EC50）を指し、対照標的結合タンパク質（例えば、抗体）は、活性化可能なタンパク質の切断生成物（すなわち、活性化タンパク質）か、または活性化可能なタンパク質のTBとして使用される標的結合タンパク質（例えば、抗体またはその断片）のいずれかであり得る。標的結合活性のレベルが低減している活性化可能なタンパク質は、10を超えるマスキング効率を有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なタンパク質は、10、100、1000、または5000を超えるマスキング効率を有し得る。

【0108】

いくつかの実施形態では、MMは、約2～50アミノ酸長のペプチドであり得る。例えば、MMは、2～40、2～30、2～20、2～10、5～15、10～20、15～25、20～30、25～35、30～40、35～45、40～50アミノ酸長のペプチドであり得る。例えば、MMは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸長のペプチドであり得る。いくつかの例では、MMは、50アミノ酸長より長いポリペプチド、例えば、100、200、300、400、500、600、700、800、またはそれ以上のアミノ酸のポリペプチドであり得る。

【0109】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質が、TBの標的の存在下で、TB及び妨害するMMを有している場合、例えば、米国特許第20200308243A1号に記載されているように、*in vivo*で測定した場合、またはマスキング効率アッセイで測定した場合、または*in vitro*免疫吸着アッセイで測定した場合、少なくとも0.1、0.5、1、2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96時間、または5、10、15、30、45、60、90、120、150、180日間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11もしくは12カ月間、妨害するMMのない対応する抗体の結合と比較して、標的に対するTBの結合がないか、またはそれが実質的にないか、またはその標的に対するTBの結合が0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%もしくは50%以下である。例えば、治療上関連する濃度及び時間で、活性化可能なタンパク質のその結合パートナーへ

10

20

30

40

50

の結合を阻害するMMの能力を、測定することができる。この測定では、活性化可能なタンパク質のその結合パートナーへの時間依存的結合を測定するための免疫吸収アッセイ（MEA、マスク効率アッセイ）が開発されて、米国特許第20200308243A1号に記載されており、その全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0110】

妨害するMMを有する、標的または結合パートナーに対するTBの結合親和性は、妨害するMMがない、その結合パートナーに対するTBの結合親和性よりも、少なくとも5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、250倍、500倍、1,000倍、2,500倍、5,000倍、10,000倍、50,000倍、100,000倍、500,000倍、1,000,000倍、5,000,000倍、10,000,000倍、50,000,000倍、100,000,000倍低く、または妨害するMMがないときの、その結合パートナーに対するTBの結合親和性よりも、5~10倍、10~100倍、10~1,000倍、10~10,000倍、10~100,000倍、10~1,000,000倍、10~5,000,000倍、10~10,000,000倍、10~50,000,000倍、10~100,000,000倍、100~1,000倍、100~10,000倍、100~100,000倍、100~1,000,000倍、100~5,000,000倍、100~10,000,000倍、100~50,000,000倍、100~100,000,000倍、1,000~10,000倍、1,000~100,000倍、1,000~1,000,000倍、1,000~5,000,000倍、1,000~10,000,000倍、1,000~50,000,000倍、1,000~100,000,000倍、10,000~100,000倍、10,000~1,000,000倍、10,000~5,000,000倍、10,000~10,000,000倍、10,000~50,000,000倍、10,000~100,000,000倍、100,000~1,000,000倍、100,000~5,000,000倍、100,000~10,000,000倍、100,000~50,000,000倍、100,000~100,000,000倍、または100,000~1,000,000,000倍低くなり得る。

10

【0111】

それがマスクするTB（例えば、AB）に対するMMの解離定数（ K_d ）は、標的に対するTB（例えば、AB）の K_d よりも大きい場合がある。マスクされたTBに対するMMの K_d は、標的に対するTBの K_d よりも、少なくとも5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000、1,000,000倍または更には10,000,000倍大きくてもよい。逆に、マスクされたTBに対するMMの結合親和性は、標的に対するTBの結合親和性よりも低くなり得る。TBに対するMMの結合親和性は、標的に対するTBの結合親和性よりも、少なくとも5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000倍または更には10,000,000倍低くてよい。

20

30

【0112】

いくつかの実施形態では、MMは、遺伝的にコードされた、または遺伝的にコードされていないアミノ酸を含有してよい。遺伝的にコードされていないアミノ酸の例は、D-アミノ酸、 β -アミノ酸及び γ -アミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、MMは、50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%または1%以下の遺伝的にコードされていないアミノ酸を含有する。

【0113】

いくつかの実施形態では、MMは、活性化可能なタンパク質から放出されて遊離状態になると、生物活性または治療効果、例えば、結合能力を有してよい。例えば、遊離MMは、同一または異なる結合パートナーと結合し得る。特定の実施形態では、遊離MMは、治療効果を発揮して、本明細書で開示される組成物に二次機能を提供することができる。いくつかの実施形態では、MMは、活性化可能なタンパク質から切り離されて遊離状態になると、有利には生物活性を示さない可能性がある。例えば、いくつかの実施形態では、遊離状態のMMは、対象において免疫応答を誘発しない。

40

【0114】

適切なMMは、スクリーニング手順を介して、様々なMMを有する候補活性化可能なタンパク質のライブラリから、特定及び／または更に最適化され得る。例えば、TB及びCMは、所望の酵素／標的の組み合わせを提供するように選択されることができ、MMのアミノ酸配列は、活性可能な表現型を提供するMMを特定するための、以下に記載されるスクリーニング手順によって特定できる。例えば、ランダムなペプチドライブラリ（例えば

50

、2～40個以上のアミノ酸を含むペプチドライブラリ)を、本明細書にて開示されるスクリーニング法で使用して、好適なMMを特定してよい。

【0115】

いくつかの実施形態では、TB(例えば、AB)に対する特定の結合親和性を有するMMを、候補MMを含むペプチドスキャフォールドのライブラリを提供することを含むスクリーニング手順を介して特定でき、各スキャフォールドは、膜貫通タンパク質及び候補MMによって構成される。続いて、ライブラリを、タンパク質の全体または一部、例えば完全長のタンパク質、天然に存在するタンパク質フラグメント、またはタンパク質を含有する非天然のフラグメント(対象である結合パートナーに結合できる)と接触させて、検出可能に結合したタンパク質を有する1種以上の候補MMを特定してよい。スクリーニングは、1回以上の磁気活性化ソーティング(MACS)または蛍光活性化ソーティング(FACS)、ならびに、例えば、WO2009025846及び米国特許第20200308243A1号(これらは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されているような、ABに対するMMの結合親和性の決定、及びその後のマスキング効率の決定によって行われてもよい。

10

【0116】

いくつかの実施形態では、MMは、特定のタンパク質、抗体、または抗体断片と共に使用するために選択され得る。例えば、エピトープに結合するABと共に使用するために適切なMMは、エピトープの配列を含み得る。一例では、活性化可能が抗HER2 FabであるAB1及び抗CD3 scFvであるAB2を含む場合、MM1(AB1をマスクするため)は、AB1が結合するHER2の配列を含み得、及びMM2(AB2をマスクするため)は、AB2が結合するCD3の配列を含み得る。他の実施形態では、MMは、TBの自然結合パートナーの配列を含まない場合がある。いくつかの例では、抗HER2 Fabをマスクするための好適なMM1は、ALICCS D V S G L C R W C(配列番号40)の配列を含む。いくつかの例では、抗CD3 scFvをマスクするための好適なMM2としては、GYLWGCEWNCGGIT T(配列番号34)、NAFRCWWDPPCQPM T(配列番号35)、ARGLCWWDPPCTHDL(配列番号36)、またはNHSLCYWDPPCEPST(配列番号37)の配列を含む、MMが挙げられる。いくつかの例では、抗CD3 scFvをマスクするための好適なMM2としては、MMYCGGNEVL CGPRV(配列番号66)、GYRWGCEWNCGGIT T(配列番号67)、MMYCGGNEIFCEPRG(配列番号68)、GYGWGCEWNCGGSSP(配列番号69)、またはMMYCGGNEIFCGPRG(配列番号70)の配列を含む、MMが挙げられる。

20

30

【0117】

更なる好適なMMは、WO2021207657、WO2021142029、WO2021061867、WO2020252349、WO2020252358、WO2020236679、WO2020176672、WO2020118109、WO2020092881、WO2020086665、WO2019213444、WO2019183218、WO2019173771、WO2019165143、WO2019075405、WO2019046652、WO2019018828、WO2019014586、WO2018222949、WO2018165619、WO2018085555、WO2017011580、WO2016179335、WO2016179285、WO2016179257、WO2016149201、及びWO2016014974に開示されており、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0118】

切断可能な部分(CM)

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

【0119】

50

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、TB（例えば、AB）とMMとの間にCMを含み得る。活性化可能なタンパク質は、TBとEMとの間にCMを更に含み得る。いくつかの例では、TBとMMとの間のCMはまた、TBとEMとの間にある（例えば、図1を参照のこと。ここでは、CM127はTB123／125とMM129との間にあり、CM127もTB123／125とMM131／141との間にあり）。そのような場合、CMの切断は、TBからMMとEMの両方を放出させ得る。いくつかの例では、CMは、第1のTB（TB1）と、第2のTB（TB2）に結合するMM（MM2）との間に配置される（例えば、図2を参照のこと。ここでは、CM223は、第1のTB（TB221）とMM225との間にあり、MM225は、第2のTB（TB207／209）の結合を阻害するマスキング部分である。図3も参照されたい。ここでは、CM323は、第1のTB（TB321）とMM343との間に配置されており、MM343は、第2のTB（TB307／309）のその標的への結合を阻害するマスキング部分である）。特定の例では、TBとMMとの間のCMは、TBとEMとの間ではない。このような場合、活性化可能なタンパク質は、TBとMMとの間の第1のCM、及びTBとEMとの間の第2のCMを含み得る。いくつかの例では、活性化可能なタンパク質は、3つのCM、すなわち、第1のTBと第1のMMとの間の第1のCM、第2のTBと第2のMMとの間の第2のCM、及びEMと第1または第2のTBとの間の第3のCMを有し得る（例えば、図10及び図11を参照されたい）。活性化可能なタンパク質の活性化は、両方のCMを切断し得るため、MM及びEMの両方がEMから放出される。

10

20

【0120】

活性化可能なタンパク質のCM及びTBは、TBが所与の標的に対する結合部分を含み、CMが1つ以上のプロテアーゼの基質を含み、1つ以上のプロテアーゼが組織内の（例えば、対象の治療部位または診断部位での）標的と共局在するように、選択され得る。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、例えば、CMの部位を切断することができる1つ以上のプロテアーゼが、非治療部位の組織（例えば、健康な組織）内よりも、治療部位または診断部位の標的含有組織内に比較的高いレベルで存在する（または、より活性が高い）場合に、特に使用を見出し得る。

【0121】

いくつかの実施形態では、本明細書のCMは、がんまたはいくつかのがんにおいて報告されているプロテアーゼの基質を含み得る。例えば、La Roca et al., British J. Cancer 90 (7): 1414-1421, 2004を参照されたい。本明細書で用いられるCM構成要素での使用に好適な基質としては、がん細胞及び組織中により広く見出される基質が挙げられる。したがって、特定の実施形態では、CMは、がんに関連する疾患組織中でより広く見出されるプロテアーゼの基質を含み得る。がんの例としては、胃癌、乳癌、骨肉腫、食道癌、乳癌、HER2陽性癌がん、カポジ肉腫、毛様細胞性白血病、慢性骨髄性白血病（CML）、濾胞性リンパ腫、腎細胞癌（RCC）、黒色腫、神経芽細胞腫、基底細胞癌、悪性皮膚T細胞リンパ腫、鼻咽頭腺癌、卵巣癌、膀胱癌、BCG耐性筋層非浸潤性膀胱癌（NMIBC）、子宮内膜癌、膵臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、大腸癌、食道癌、胆嚢癌、神経膠腫、頭頸部癌、子宮癌、子宮頸癌、または精巣癌などが挙げられる。いくつかの実施形態では、CM構成要素は、腫瘍組織中により行き渡っているプロテアーゼ（複数可）の基質を含む。例えば、プロテアーゼ（複数可）は、対象における腫瘍によって産生され得る。

30

40

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、MMとTB（例えば、AB）との間の第1のCM、及びEMと同じまたは異なるTBとの間の第2のCMを含み得る。活性化状態では、両方のCMは切断され得、その結果、MM及びEMは、TB（複数可）から放出される。いくつかの例では、第1及び第2のCMは、同じプロテアーゼの基質を含み得る。いくつかの例では、第1及び第2のCMは、異なるプロテアーゼの基質を含み得る。いくつかの例では、第1及び第2のCMは、同じ配列を含み得るか、またはそれからなり得る。いくつかの例では、第1及び第2のCMは、異なる配列を含み得るか、またはそれからなり得る。

50

【0122】

第2のCMは、その切断がTBからのEMの解離を促進する、活性化可能タンパク質内の位置にあり得る。いくつかの例では、第2のCMは、TBのC末端（または、TBが複数のポリペプチドを含む場合にはその構成要素）とMMのN末端との間にあり得、MMのC末端は、EMのN末端（または、EMが複数のポリペプチドを含む場合にはその構成要素）にカップリングされている。いくつかの例では、第2のCMは、TBのN末端（または、TBが複数のポリペプチドを含む場合にはその構成要素）とMMのC末端との間にあり得、MMのN末端は、EMのC末端（または、EMが複数のポリペプチドを含む場合にはその構成要素）にカップリングされている。いくつかの例では、第2のCMは、TBのC末端（または、TBが複数のポリペプチドを含む場合にはその構成要素）とEMのN末端（または、EMが複数のポリペプチドを含む場合にはその構成要素）との間にあり得、EMのC末端（または、EMが複数のポリペプチドを含む場合にはその構成要素）は、MMのN末端にカップリングされている。いくつかの例では、第2のCMは、TBのN末端（または、TBが複数のポリペプチドを含む場合にはその構成要素）とEMのC末端（または、EMが複数のポリペプチドを含む場合にはその構成要素）との間にあり得、EMのN末端（または、EMが複数のポリペプチドを含む場合にはその構成要素）は、MMのC末端にカップリングされている。これらの例では、MMは、活性化可能タンパク質中のTBまたは異なるTB（例えば、同じまたは別のポリペプチド上）のマスキング部分であり得る。

10

【0123】

本明細書の活性化可能なタンパク質に使用するために適切なCMには、当技術分野で既知のプロテアーゼ基質のうちのいずれかが含まれる。いくつかの例では、CMは、セリンプロテアーゼの基質（例えば、u型プラスミノゲン活性化因子（uPA、ウロキナーゼとも呼ばれる）、マトリプターゼ（本明細書では、MT-SP1またはMTSP1とも呼ばれる）を含み得る。いくつかの例では、CMは、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の基質を含み得る。いくつかの例では、CMは、システインプロテアーゼ（CP）の基質（例えば、レグマイン）を含み得る。

20

【0124】

いくつかの実施形態では、CMは、ジスインテグリン及びメタロプロテアーゼ（ADAM）、またはトロンボスポンジンモチーフ（ADAMTS）（例えば、ADAM8、ADAM9、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17／TACE、ADEMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5）を有するジスインテグリン及びメタロプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ（例えば、BACE、レニン）、アスパラギン酸カテプシン（例えば、カテプシンD、カテプシンE）、カスパーゼ（例えば、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ14）、システインカテプシン（例えば、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンG、カテプシンK、カテプシンL、カテプシンS、カテプシンV／L2、カテプシンX／Z／P）、システインプロテアーゼ（例えば、クルジパイン、レグマイン、オツバイン（Otbain）-2）、キマーゼ、DESC1、DPP-4、FAP、エラスターゼ、FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa、グランザイムB、グアニジノベンゾアターゼ、ヘプシン、HtrA1、ヒト好中球エラスターゼ、KLK（例えば、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14）、メタロプロテイナーゼ（例えば、メプリン、ネプリライシン、PSMA、BMP-1）、ラクトフェリン、マラプシン（Marapsin）、マトリプターゼ-2、MT-SP1／マトリプターゼ、NS3／4A、PACE4、プラスミン、PSA、MMP（例えば、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、MMP27）、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、tPA、トロンビ

30

40

50

ン、トリプターゼ、及びuPAの基質を含んでもよい。

【0125】

いくつかの実施形態では、CMのプロテアーゼ基質は、同じプロテアーゼによって天然に切断される任意のポリペプチド配列と実質的に同一でない（例えば、90%、80%、70%、60%、または50%以下同一の）ポリペプチド配列を含み得る。

【0126】

いくつかの実施形態では、CMは、LSGRSDDH（配列番号33）の配列またはISSGLLSGRSDNH（配列番号41）の配列であるか、またはそれを含み得る。いくつかの実施形態では、CMは、以下の表の配列のいずれか1つの配列であり得るか、またはその配列を含み得るか、または配列のコンセンサスに包含され得る：

10

【表9-1】

配列	配列 番号	配列	配列 番号
AANALAHGLF	99	HMMQYARH	350
AANL	100	HTGRSGAL	351

20

30

40

50

【表 9 - 2】

AANLGSGGSS	101	HVPRQ	352
AAPRS	102	HVPRQV	353
AAPRSF	103	HVPRQVAPRSF	354
AARGPAIH	104	HVPRQVLSGRS	355
AAYHLVSQ	105	HVPRQVLSGRSAN	356
AFPDMSVRS	106	HWHLGPPT	357
AFQALRM	107	IANLLSMV	358
AFRHLR	108	IDGR	359
AGLGISST	109	IEGR	360
AGLGVVER	110	ILNLLSMV	361
AGPR	111	ILPRSPAF	362
AHGL	112	IPFSWSRF	363
AHGLF	113	IQNLLSMV	364
AHQALRM	114	ISSGL	365
AIPRVRLFDV	115	ISSGLL	366
ALAHG	116	ISSGLLS	367
ALAHGL	117	ISSGLLSGRSANI	368
ALAHGLF	118	ISSGLLSGRSANP	369
ALAHGLFAPRSF	119	ISSGLLSGRSANPRG	370
ALAHGLFSGRSAN	120	ISSGLLSGRSDDH	371
ALAHGLPTFVHL	121	ISSGLLSGRSDIH	372
ALGLLRLP	122	ISSGLLSGRSDNH	41
ALPSVKMVSE	123	ISSGLLSGRSDNI	373
ALRAP	124	ISSGLLSGRSDNP	374
ANQALRM	125	ISSGLLSGRSDQH	375
ANQALRMA	126	ISSGLLSGRSDTH	376
APPLVKSMVV	127	ISSGLLSGRSDYH	377
APPSFKLVNA	128	ISSGLLSGRSGNH	378
APRS	129	ISSGLLSGRSNI	379
APRSALAHGLF	130	ISSGLLSGRSNIG	380
APRSF	131	ISSGLLSGRSNIGS	381
AQFVLTEG	132	ISSGLLSS	382
AQNLLGMV	133	ISSGLLSSGGSGGSLS GRSDNH	383
ARGP	134	ISSGLLSSGGSGGSLS GRSGNH	384

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

ARGPS	1 3 5	ISSGLSS	3 8 5
ARGPSF	1 3 6	IVSRSA	3 8 6
ARGPSFK	1 3 7	KGLTGRSDRHQA	3 8 7
ASGLLRFP	1 3 8	KGPKVKVVTL	3 8 8
ASPTMKTVGL	1 3 9	KNLYGRSENNGN	3 8 9
AVGLLAPP	1 4 0	KRMPVQFL	3 9 0
AVGLLAPPGGLSGR SANI	1 4 1	LAAPLGLL	3 9 1
AVGLLAPPGGLSGR SANP	1 4 2	LAHG	3 9 2
AVGLLAPPGGLSGR SDDH	1 4 3	LAHGL	3 9 3
AVGLLAPPGGLSGR SDIH	1 4 4	LAHGLF	3 9 4
AVGLLAPPGGLSGR SDNH	1 4 5	LAPLGLQRR	3 9 5
AVGLLAPPGGLSGR SDNI	1 4 6	LARAG	3 9 6
AVGLLAPPGGLSGR SDNP	1 4 7	LARAGI	3 9 7
AVGLLAPPGGLSGR SDQH	1 4 8	LARAGL	3 9 8
AVGLLAPPGGLSGR SDTH	1 4 9	LKAAPRWA	3 9 9
AVGLLAPPGGLSGR SDYH	1 5 0	LKAAPRWF	4 0 0
AVGLLAPPGGLSGR SNI	1 5 1	LKAAPVWA	4 0 1
AVGLLAPPGGLSGR SNIG	1 5 2	LKAAPVWF	4 0 2
AVGLLAPPGGLSGR SNIGS	1 5 3	LKGRSYYY	4 0 3
AVGLLAPPGGTSTS GRSANPRG	1 5 4	LLAPSHRA	4 0 4
AVGLLAPPSGRSAN PRG	1 5 5	LLEALRAL	4 0 5

10

20

30

40

50

【表 9 - 4】

AVGLLAPPTSGRSA NPRG	1 5 6	LLESLRAL	4 0 6
AVPKVRVVPE	1 5 7	LLLP AHGG	4 0 7
CGPPLGR	1 5 8	LLLP LLGS	4 0 8
CSPPLGR	1 5 9	LLNALRAL	4 0 9
DEV DGS GGSS	1 6 0	LLNSLRAL	4 1 0
DEXXXC (A/S)		LLQALRAL	4 1 1
DISHWRRS	1 6 1	LLQSLRAL	4 1 2
DLAHPLL	1 6 2	LLSALRAL	4 1 3
DLPLVKSLPS	1 6 3	LLSSLRAL	4 1 4
DLXXT (A/S)		LNGRSDNH	4 1 5
DRLSGRSANHKK	1 6 4	LPAGLLL	4 1 6
DRLSGRSDNHKK	1 6 5	LPAGLLLR	4 1 7
DRPEMKSLSG	1 6 6	LPAHLVLL	4 1 8
DRPKVKTMDF	1 6 7	LPAHLVLV	4 1 9
DVAQFVLT	1 6 8	LPGGLSPW	4 2 0
DVPPMKTLRP	1 6 9	LPSHLVLL	4 2 1
DWLYWMGI	1 7 0	LPSHLVLV	4 2 2
DWLYWMSI	1 7 1	LPTFV	4 2 3
DWLYWPGI	1 7 2	LPTFVH	4 2 4
DWLYWPSI	1 7 3	LPTFVHL	4 2 5
EAPKVKALPK	1 7 4	LRSGW	4 2 6
EHPRVKVVSE	1 7 5	LSGR	4 2 7
EKPRMKLFQG	1 7 6	LSGRS	4 2 8
EPQALAMS	1 7 7	LSGRSA	4 2 9
EQPEVKMVKG	1 7 8	LSGRSALAHGLF	4 3 0
ERPGVKSLVL	1 7 9	LSGRSAN	4 3 1
ESLPVVAV	1 8 0	LSGRSANI	4 3 2
ESPVMKSMAL	1 8 1	LSGRSANP	4 3 3
ESRRW	1 8 2	LSGRSD	4 3 4
ESRRWM	1 8 3	LSGRSDD	4 3 5
ESRRWMP	1 8 4	LSGRSDDH	3 3
ETPSVKTMGR	1 8 5	LSGRSDI	4 3 6
ETPSVKTMGRSS	1 8 6	LSGRSDIH	4 3 7
FPRPLGITGL	1 8 7	LSGRSDN	4 3 8

10

20

30

40

50

【表 9 - 5】

FRLLDWQW	188	LSGRSDNH	439
GCGPPLGR	189	LSGRSDNHGGAVGLLA PP	440
GCSPPPLGR	190	LSGRSDNHGGSGGSIS SGLLSS	441
GFPHMKTFFQH	191	LSGRSDNHGGSGGSQN QALRMA	442
GFPHMKTFFQHSS	192	LSGRSDNHGGVHMPLG FLGP	443
GGGPPLGR	193	LSGRSDNI	444
GGPPLGR	194	LSGRSDNP	445
GGQPSGMWGW	195	LSGRSDQ	446
GGSIDGR	196	LSGRSDQH	447
GGSPPLGR	197	LSGRSDT	448
GGWHTGRN	198	LSGRSDTH	449
GIAGQ	199	LSGRSDY	450
GLGTPRGLFA	200	LSGRSDYH	451
GLPTFV	201	LSGRSENH	452
GLPTFVH	202	LSGRSG	453
GLPTFVHL	203	LSGRSGN	454
GLPTFVHLPRQV	204	LSGRSGNH	455
GLSGRSDNHGSS	205	LSGRSGNHGGSGGSIS SGLLSS	456
GPEGLRVG	206	LSGRSGNHGGSGGSQN QALRMA	457
GPLGIAGI	207	LSGRSGNP	458
GPLNGRSDNHKA	208	LSGRSVTQ	459
GPLNGRSDNHKK	209	LSQARWRK	460
GPLNGRSDNHKR	210	LTFTPTYIF	461
GPLNGRSDNHQA	211	LTFTPTYWF	462
GPLNGRSDNHQK	212	LTGRSDRH	463
GPLNGRSDNHQR	213	LTGRSGA	464
GPLNGRSDNHRA	214	LTGRSGA	465
GPLNGRSDNHRK	215	LYAAPRWA	466
GPLNGRSDNHRR	216	LYAAPRWF	467
GPLSGRSDNHKA	217	LYAAPVWA	468
GPLSGRSDNHKK	218	LYAAPVWF	469

10

20

30

40

50

【表 9 - 6】

G P L S G R S D N H K R	2 1 9	L Y G R S E N N	4 7 0
G P L S G R S D N H Q A	2 2 0	M D A F L E S S	4 7 1
G P L S G R S D N H Q K	2 2 1	M G L F S E A G	4 7 2
G P L S G R S D N H Q R	2 2 2	M G P W F M	4 7 3
G P L S G R S D N H R A	2 2 3	M I A P V A Y R	4 7 4
G P L S G R S D N H R K	2 2 4	M L R S G W	4 7 5
G P L S G R S D N H R R	2 2 5	M L R S G W R	4 7 6
G P P L G R	2 2 6	M L R S G W R G	4 7 7
G P Q G I A G Q	2 2 7	M L R S G W R L	4 7 8
G P Q G L L G A	2 2 8	M L R S G W R S	4 7 9
G P R S F G	2 2 9	M T F P T Y I F	4 8 0
G P R S F G L	2 3 0	M T F P T Y W F	4 8 1
G P S H L V L T	2 3 1	N H R I G R S D N H R R	4 8 2
G P T N	2 3 2	N M P S F K L V T G	4 8 3
G P T N A L A H G L F	2 3 3	N T L S G R S E N H S G	4 8 4
G R S M L	2 3 4	N T L S G R S G N H G S	4 8 5
G R S M L L	2 3 5	N Z P R V R L V L P	4 8 6
G R S M L L G	2 3 6	P A G L W L D P	4 8 7
G R S M L L G G	2 3 7	P A G R R	4 8 8
G R S M L L G P	2 3 8	P A G R R S	4 8 9
G R S M L L G S	2 3 9	P A G R R S L	4 9 0
G R S M L L P	2 4 0	P A S L W Y T Q	4 9 1
G R S M L L P G	2 4 1	P E S R R W M P	4 9 2
G R S M L L P P	2 4 2	P F H L S R	4 9 3
G R S M L L P S	2 4 3	P H G F F Q	4 9 4
G R S M L L S	2 4 4	P L A R A G I	4 9 5
G R S M L L S G	2 4 5	P L A R A G L	4 9 6
G R S M L L S P	2 4 6	P L G L	4 9 7
G R S M L L S S	2 4 7	P L G L A G	4 9 8
G R S M L M	2 4 8	P L G L W A	4 9 9
G R S M L M G	2 4 9	P L G V R G K	5 0 0
G R S M L M G G	2 5 0	P L T G R S G G	5 0 1
G R S M L M G P	2 5 1	P L T G R S G G G G S S	5 0 2
G R S M L M G S	2 5 2	P P L G R	5 0 3
G R S M L M P	2 5 3	P P P D M K L F P G	5 0 4
G R S M L M P G	2 5 4	P P P E V R S F S V	5 0 5

10

20

30

40

50

【表 9 - 7】

GRSMLMPP	2 5 5	PPPVLKLEW	5 0 6
GRSMLMPS	2 5 6	PPSIARSDNLAN	5 0 7
GRSMLMS	2 5 7	PQHRIVSF	5 0 8
GRSMLMSG	2 5 8	PRFKIIGG	5 0 9
GRSMLMSP	2 5 9	PRFRIIGG	5 1 0
GRSMLMSS	2 6 0	PRPFVKSDQ	5 1 1
GSGPPLGR	2 6 1	PRQV	5 1 2
GSPPLGR	2 6 2	PRSF	5 1 3
GSSPPLGR	2 6 3	PSPPVKMMPE	5 1 4
GTGRGPSWVGSS	2 6 4	PTNGGSGGSS	5 1 5
PTNL	2 6 5	RVPKVKVMLD	5 1 6
PTNLGSGGSS	2 6 6	SAGFSLPA	5 1 7
PVGYTSSL	2 6 7	SAPAVESE	5 1 8
PVPRLKLIKD	2 6 8	SAPYFRMMDM	5 1 9
PVQPIGPQ	2 6 9	SARGPSRW	5 2 0
QALAMSAI	2 7 0	SCGPPLGR	5 2 1
QFQALRM	2 7 1	SCSPPLGR	5 2 2
QGPMFKSLWD	2 7 2	SGGPLGVR	5 2 3
QGRAITFI	2 7 3	SGGPPLGR	5 2 4
QHQALRM	2 7 4	SGPPLGR	5 2 5
QNQALRIA	2 7 5	SGRS	5 2 6
QNQALRM	2 7 6	SGRSA	5 2 7
QNQALRMA	2 7 7	SGRSAN	5 2 8
QNQALRMAGGSGGSL SGRSDNH	2 7 8	SGRSANI	5 2 9
QNQALRMAGGSGGSL SGRSGNH	2 7 9	SGRSANP	5 3 0
QSRRVP	2 8 0	SGRSANPRG	5 3 1
QSRRVPL	2 8 1	SGRSD	5 3 2
QSRRVPV	2 8 2	SGRSDD	5 3 3
QTRRVP	2 8 3	SGRSDDH	5 3 4
QTRRVPL	2 8 4	SGRSDI	5 3 5
QTRRVPV	2 8 5	SGRSDIH	5 3 6
QYIVSRSA	2 8 6	SGRSDN	5 3 7
RALRAP	2 8 7	SGRSDNI	5 3 8
REPFMKSLPW	2 8 8	SGRSDNP	5 3 9

10

20

30

40

50

【表 9 - 8】

RFPLKV	289	SGRSDQ	540
RFPSLKSFPL	290	SGRSDQH	541
RFPYGVW	291	SGRSDT	542
RFYRNQFF	292	SGRSDTH	543
RGPA	293	SGRSDY	544
RGPAFNPM	294	SGRSDYH	545
RGPATPIM	295	SGRSG	546
RGPPLYW	296	SGRSGN	547
RHLAKL	297	SGRSGNH	548
RIGRSDNH	298	SGSPPLGR	549
RKMPNITV	299	SIARSDNL	550
RKSSIIIRMRDVVL	300	SISSGLLSGRSDNI	551
RKTVQHW	301	SNPFKY	552
RLGRSDNN	302	SPLPLRVP	553
RMHLRSLG	303		
RPLARAGI	304	SPLTGRSG	554
RPLARAGL	305	SPPLGR	555
RPLNGRSDNHKA	306	SRRVP	556
RPLNGRSDNHKK	307	SRRVPL	557
RPLNGRSDNHKR	308	SRRVPV	558
RPLNGRSDNHQA	309	SSGPPLGR	559
RPLNGRSDNHQK	310	SSPPLGR	560
RPLNGRSDNHQR	311	SSRGPAYL	561
RPLNGRSDNHRA	312	SSRHRRALD	562
RPLNGRSDNHRK	313	SSSFDKGKYKKGDDA	563
RPLNGRSDNHRR	314	SSSFDKGKYKRGDDA	564
RPLSGRSDNHKA	315	SSSPPLGR	565
RPLSGRSDNHKK	316	STFPFGMF	566
RPLSGRSDNHKR	317	STVFHM	567
RPLSGRSDNHQA	318	SVHHLI	568
RPLSGRSDNHQK	319	SVSGLLSH	569
RPLSGRSDNHQR	320	SVSGLLSS	570
RPLSGRSDNHRA	321	SVSGLRSH	571
RPLSGRSDNHRK	322	SVSGLRSS	572
RPLSGRSDNHRR	323	TARG	573
RPSPMWAY	324	TARGP	574

10

20

30

40

50

【表 9 - 9】

RRHDGLRA	3 2 5	TARGPALAHGLF	5 7 5
RRHDGLRS	3 2 6	TARGPS	5 7 6
RSLVFAPI	3 2 7	TARGPSF	5 7 7
RSPSRLKC	3 2 8	TARGPSFK	5 7 8
VAGRSMRP	3 2 9	TARGPSW	5 7 9
VAPQLKSLVP	3 3 0	TARGPSW	5 8 0
VAQFVLTE	3 3 1	TARGPVPRQV	5 8 1
VHMPLGFLGP	3 3 2	TFVH	5 8 2
VHMPLGFLGPGGLS GRSDNH	3 3 3	TGLSGRSVTQTS	5 8 3
VHMPLGFLGPGGTS TSGRSANPRG	3 3 4	TGRGPSWV	5 8 4
VLPELRSVFS	3 3 5	TLRLGRSDNNKN	5 8 5
VLSKQMSF	3 3 6	TLSGLRSP	5 8 6
VPAGRRS	3 3 7	TSGRSANP	5 8 7
VPAGRRL	3 3 8	TSGRSGNP	5 8 8
VPRQ	3 3 9	TSLSGRSANPRG	5 8 9
VPRQV	3 4 0	TSLSGRSGNPRG	5 9 0
VSRSA	3 4 1	TSSGLRSP	5 9 1
VVPEGRRS	3 4 2	TSTSGRSANPRG	5 9 2
WATPRPMR	3 4 3	TSTSGRSANPRGGGA VGLLAPP	5 9 3
WDHPISLL	3 4 4	TSTSGRSANPRGGGV HMPLGFLGP	5 9 4
XXQAR (A/V) X		TSTSGRSGNPRG	5 9 5
YDPZVKVLA	3 4 5	TVSGLRSP	5 9 6
YGAGLGVV	3 4 6		
YIVSRSA	3 4 7		
YKKFVGSL	3 4 8		
YVPRVKALEM	3 4 9		

10

20

30

【0127】

CMの例はまた、WO2010/081173、WO2021207669、WO2021207657、WO2021142029、WO2021061867、WO2020252349、WO2020252358、WO2020236679、WO2020176672、WO2020118109、WO2020092881、WO2020086665、WO2019213444、WO2019183218、WO2019173771、WO2019165143、WO2019075405、WO2019046652、WO2019018828、WO2019014586、WO2018222949、WO2018165619、WO2018085555、WO2017011580、WO2016179335、WO2016179285、WO2016179257、WO2016149201、WO2016014974に記載されているものを含み、これらは、全ての目的のために参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

40

50

【0128】

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

10

【0129】

いくつかの実施形態では、CMは、3個のアミノ酸～25個のアミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態では、CMは、合計3～25、3～20、3～15、3～10、3～5、5～25、5～20、5～15、5～10、10～25、10～20、10～15、15～25、15～20、または20～25個のアミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態では、CMは、約 $0.001 \sim 1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ 、または少なくとも 0.001 、 0.005 、 0.01 、 0.05 、 0.1 、 0.5 、 1 、 2 、 5 、 7.5 、 10 、 15 、 20 、 25 、 50 、 75 、 100 、 125 、 150 、 200 、 250 、 500 、 750 、 1000 、 1250 、または $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ の速度で少なくともプロテアーゼによって特異的に切断され得る。速度は、WO2016118629に開示されているように、基質切断の反応速度(k_{cat}/K_m)として測定することができる。

20

30

【0130】

リンカー

活性化可能なタンパク質は、1つ以上のリンカーを含んでもよい。リンカーは、活性化可能なタンパク質中の2つの構成要素を連結する一続きのアミノ酸配列を含み得る。リンカーは、いかなるプロテアーゼによっても切断され得ない。いくつかの実施形態では、1つ以上のリンカー（例えば、可撓性リンカー）を活性化可能なタンパク質に導入して、ドメイン間の、部分間の、部分とドメインとの間の接合点の1個以上において、またはリンカーが有益であろう任意のその他の接合点において、可撓性を提供することができる。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質が立体構造的に拘束される構成体として提供される場合、可撓性リンカーを挿入して、切断されていない活性化可能なタンパク質における構造の構成及び維持を促進することができる。本明細書に記載されるリンカーは、いずれも、所望の可撓性を提供して、標的の結合の阻害を促進する、またはプロテアーゼによるCMの切断を促進することができる。いくつかの実施形態では、リンカーが、可撓性リンカーに加えて、より可撓性でない構造を付与する1個以上の部分を含有して、所望の活性化可能なタンパク質を提供できるように、活性化可能なタンパク質中に含有されるリンカーは、完全にまたは部分的に可撓性であり得る。一部のリンカーはシステイン残基を含有してもよく、このシステイン残基は、ジスルフィド結合を形成し、構成体の可撓性を低減させてよい。

40

【0131】

いくつかの実施形態では、MMにカップリングされたリンカーは、MMがTBを効果的

50

にマスクする3次または4次の位置、例えば、マスクングされるTBの近位の位置にあることを可能にする長さを有し得る。

【0132】

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

【0133】

いくつかの実施形態では、リンカーは、合計で1~50、1~40、1~30、1~25（例えば、1~24、1~22、1~20、1~18、1~16、1~15、1~14、1~12、1~10、1~8、1~6、1~5、1~4、1~3、1~2、2~25、2~24、2~22、2~20、2~18、2~16、2~15、2~14、2~12、2~10、2~8、2~6、2~5、2~4、2~3、4~25、4~24、4~22、4~20、4~18、4~16、4~15、4~14、4~12、4~10、4~8、4~6、4~5、5~25、5~24、5~22、5~20、5~18、5~16、5~15、5~14、5~12、5~10、5~8、5~6、6~25、6~24、6~22、6~20、6~18、6~16、6~15、6~14、6~12、6~10、6~8、8~25、8~24、8~22、8~20、8~18、8~16、8~15、8~14、8~12、8~10、10~25、10~24、10~22、10~20、10~18、10~16、10~15、10~14、10~12、12~25、12~24、12~22、12~20、12~18、12~16、12~15、12~14、14~25、14~24、14~22、14~20、14~18、14~16、14~15、15~25、15~24、15~22、15~20、15~18、15~16、16~25、16~24、16~22、16~20、16~18、18~25、18~24、18~22、18~20、20~25、20~24、20~22、22~25、22~24、または24~25個のアミノ酸）を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、合計1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個のアミノ酸を含み得る。

【0134】

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

【0135】

いくつかの実施形態では、リンカーは、1個以上のGly-Gly-Gly-Ser（GGGS）配列（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個以上のGGGS配列）を有し得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、1個以上のGly-Gly-Gly-Ser（GGGS）配列（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個以上のGGGS配列）を有し得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、1個以上のGly-Gly-Ser-Gly（GGSG）配列（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個以上のGGSG配列）を有し得る。可撓性リンカーの例としては、グリシンポリマー（G）_n、グリシン-セリンポリマー（例えば、（GS）_n、（GGS）_n、（GSGGS）_n、及び（GGGS）_nを含み得、_nは、少なくとも1の整数である）、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び当技術分野で既知の他の可撓性リンカーが挙げられる。グリシン及びグリシン-セリンポリマーは比較的構造化されていない可能性があるため、構成要素間の中立的なリンクとして機能することができ得る。グリシンは、アラニンよりも更にフィープシースペ

ースに有意にアクセスし、より長い側鎖を有する残基ほど制限がない (Schraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)) を参照されたい)。例示的な可撓性リンカーには、G G S G (配列番号 71)、G G S G G (配列番号 72)、G S G S G (配列番号 73)、G S G G G (配列番号 74)、G G G S G (配列番号 75)、G S S S G (配列番号 76)、G S S G G S G G S G G (配列番号 77)、G G G S (配列番号 78)、G G G S G G G S (配列番号 79)、G G G S G G S G G G S (配列番号 80)、G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 81)、G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 82)、G G G G S G G G S (配列番号 83)、G G G G S (配列番号 84)、G S, G G G G S G S (配列番号 85)、G G G G S G G G G S G G G G S G S (配列番号 86)、G G S L D P K G G G S (配列番号 87)、P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G (配列番号 88)、S K Y G P P C P P C P A P E F L G (配列番号 89)、G K S S G S G S E S K S (配列番号 90)、G S T S G S G K S S E G K G (配列番号 91)、G S T S G S G K S S E G S G S T K G (配列番号 92)、G S T S G S G K P G S G E G S T K G (配列番号 93)、G S T S G S G K P G S S E G S T (配列番号 94)、G G G G S G G S (配列番号 95)、G G G G S G G G G S S (配列番号 96)、G G G G S S G G S G G S S G G S (配列番号 97)、及び G S T S G S G K P G S E G S T (配列番号 98) のうちの 1 つまたは 1 つ以上の組み合わせが含まれる。

10

【0136】

リンカーの例は、本明細書に記載の例示的なリンカーと少なくとも 70 % 同一 (例えば、少なくとも 72 %、少なくとも 74 %、少なくとも 75 %、少なくとも 76 %、少なくとも 78 %、少なくとも 80 %、少なくとも 82 %、少なくとも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 88 %、少なくとも 90 %、少なくとも 92 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 96 %、97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % 同一) である配列を更に含み得る。当業者であれば、活性化可能なタンパク質の設計が、所望の活性化可能なタンパク質構造を提供するために、リンカーが、可撓性リンカーだけでなく、より可撓性の低い構造を付与する 1 つ以上の部分を含むことができるように、全てまたは部分的に可撓性であるリンカーを含むことができることを認識するであろう。

20

【0137】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のリンカー配列 (複数可) を含有できる (例えば、本明細書に記載される、または当技術分野において既知の、例示的なリンカー配列のいずれかと同一または異なるリンカー配列)。いくつかの実施形態では、リンカーは、スルホ S I A B、S M P B 及びスルホ S M P B を含み得、リンカーは一級アミノスルフィドリルと反応する。

30

【0138】

コンジュゲート剤

いくつかの態様では、活性化可能な分子 (例えば、活性化可能な抗体などの活性化可能なタンパク質) は、1 つ以上の追加の薬剤、例えば、目的の細胞または組織への送達を容易にするためのターゲティング部分、治療剤 (例えば、化学療法剤または抗腫瘍剤などの抗悪性腫瘍薬)、毒素、またはその断片を更に含むことができる。追加の薬剤は、活性化可能な抗体にコンジュゲートされ得る。「薬剤」という用語は、本明細書では、化学化合物、化学化合物の混合物、生物学的巨大分子、または生物学的材料から抽出された抽出物を示すために使用される。

40

【0139】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、細胞毒性剤、例えば、毒素 (例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、またはこれらの断片) または放射性同位体にコンジュゲートすることができる。

【0140】

活性化可能なタンパク質にコンジュゲートすることができる、細胞毒性剤の例としては

50

、ドラスタチン及びそれらの誘導体（例えば、アウリスタチンE、AFP、モノメチルアウリスタチンD（MMAD）、モノメチルアウリスタチンF（MMAF）、モノメチルアウリスタチンE（MMAE）、デスメチルアウリスタチンE（DMAE）、アウリスタチンF、デスメチルアウリスタチンF（DMAF）、ドラスタチン16（DmJ）、ドラスタチン16（Dpv）、アウリスタチン誘導体（例えば、アウリスタチンチラミン、アウリスタチンキノロン）、メイタンシノイド（例えば、DM-1、DM-4）、メイタンシノイド誘導体、デュオカルマイシン、 α -アマニチン、ツルボスタチン、フェンスタチン、ヒドロキシフェンスタチン、スポンギスタチン5、スポンギスタチン7、ハリスタチン1、ハリスタチン2、ハリスタチン3、ハロコンプスタチン、ピロロベンズイミダゾール（PBI）、シブロスタチン6、ドクサリフォーム（doxaliform）、セマドチン類似体（CemCH₂-SH）、シュードモナス毒素A（PES8）変異体、シュードモナス毒素A（ZZ-PE38）変異体、ZJ-101、アンスラサイクリン、ドキソルピシン、ダウノルピシン、プリオスタチン、カンプトセシン、7-置換カンプトテシン、10, 11-ジフルオロメチレンジオキシカンプトセシン、コンプレタスタチン、デプロモアプリシアトキシシン、KahaMide-F、ディスコデルモライド、及びエクティナシジンが挙げられる。

10

【0141】

活性化可能なタンパク質にコンジュゲートすることができる酵素的に活性な毒素の例としては、ジフテリア毒素、*Pseudomonas aeruginosa*からの外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデッシンA鎖、 α -サルシン、*Aleurii esfordii*タンパク質、ジアンシン（dianfhin）タンパク質、*Phytoica Americana*タンパク質（例えば、PAPI、PAPII及びPAP-8）、*momordica charantia*阻害剤、クルシン、クロティーズ（crotirs）、*sapaonaria officinalis*阻害剤、ゲイオニン（geionin）、ミトゲリン（mitogelilin）、レストリクトシン、フェノマイシン、ネオマイシン、及びトリコテセンが挙げられる。

20

【0142】

活性化可能なタンパク質にコンジュゲートすることができる抗悪性腫瘍薬の例としては、アドリアマイシン、セルビジン、ブレオマイシン、アルケラン、ベルバン、オンコビン、フルオロウラシル、メトトレキサート、チオテパ、ビスアントレン、ノバントロン、チオグアニン、プロカルバジン、及びシタラビンが挙げられる。

30

【0143】

活性化可能なタンパク質にコンジュゲートされ得る抗ウイルス薬の例としては、アシクロビル、ウイルスA、及びシンメレルが挙げられる。活性化可能なタンパク質にコンジュゲートされ得る抗真菌剤の例としては、ニスタチンが挙げられる。活性化可能なタンパク質にコンジュゲートすることができる検出試薬の例としては、フルオレセイン及びその誘導体、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）が挙げられる。活性化可能なタンパク質にコンジュゲートすることができる抗菌薬の例としては、アミノグリコシド、ストレプトマイシン、ネオマイシン、カナマイシン、アミカシン、ゲンタマイシン及びトブラマイシンが挙げられる。活性化可能なタンパク質にコンジュゲートすることができる 3β , 16β , 17α -トリヒドロキシコレステ-5-エン-22-オン16-O-（2-O-4-メトキシベンゾイル- β -D-キシロピラノシル）-（1-→3）-（2-O-アセチル- α -L-アラビノピラノシド）（OSW-1）の例としては、O6-ベンジルグアニンのs-ニトロベンジロキシカルボニル誘導体、トポシソメラーゼ（toposomerase）阻害剤、ヘミアステルリン、セファロタキシシン、ホモハリントニン（homoharringtonine）、ピロロベンゾジアゼピンダイマー（PBD）、官能化ピロロベンゾジアゼピン、カリケアミシン（calcicheamicins）、ポドフィロトキシシン（podophyllitoxins）、タキサン、及びピンカアルカロイドが挙げられる。活性化可能なタンパク質にコンジュゲートすることができる放射性医薬品の例としては、 ^{123}I 、 ^{89}Zr 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{201}Tl 、

40

50

^{62}Cu 、 ^{18}F 、 ^{68}Ga 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{38}K 、 ^{82}Rb 、 ^{111}In 、 ^{133}Xe 、 ^{11}C 、及び $^{99\text{m}}\text{Tc}$ （テクネチウム）が挙げられる。活性化可能タンパク質にコンジュゲートされ得る重金属の例としては、バリウム、金、及び白金が挙げられる。活性化可能なタンパク質にコンジュゲートすることができる抗マイコプラズマ剤の例としては、タイロシン、スペクチノマイシン、ストレプトマイシンB、アンピシリン、スルファニルアミド、ポリミキシン及びクロラムフェニコールが挙げられる。

【0144】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、シグナルペプチドを含み得る。複数のポリペプチドを含む場合、活性化可能なタンパク質は、複数のシグナルペプチド、例えば、複数のポリペプチドのそれぞれに対して1つのシグナルペプチドを含み得る。シグナルペプチドは、分泌経路に向けて方向付けられる新たに合成されたタンパク質の末端（例えば、N末端またはC末端）に存在するペプチド（例えば、10～30アミノ酸長）であり得る。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、スパーサーを介して活性化可能なタンパク質にコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、スパーサーは、シグナルペプチドが存在しない場合、活性化可能なタンパク質にコンジュゲートされ得る。

10

【0145】

当業者であれば、多種多様な可能性がある薬剤を、本明細書に記載の活性化可能なタンパク質のいずれかにコンジュゲートできることを理解するであろう。薬剤は、コンジュゲーション部分によって活性化可能なタンパク質の別の構成要素にコンジュゲートされ得る。コンジュゲートには、活性化可能なタンパク質及び他の部分がそれぞれの活性を保持する限り、2個の分子を結合する、任意の化学反応が含まれ得る。コンジュゲートには、多くの化学的反応機構、例えば共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合及び錯化が含まれ得る。いくつかの実施形態では、結合は、共有結合であり得る。共有結合は、既存の側鎖の直接的な縮合によって、または外部の架橋分子の組み込みによってのいずれかで達成できる。多くの二価または多価の連結剤は、本明細書に記載の活性化可能なタンパク質のいずれかのコンジュゲートに有用であり得る。例えば、コンジュゲートは、有機化合物、例えばチオエステル、カルボジイミド、琥珀酸イミドエステル、グルタルアルデヒド、ジアゾベンゼン及びヘキサメチレンジアミンを含有できる。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、1個以上の非天然アミノ酸残基を含有して、またはそれ以外の場合には導入して、コンジュゲートに好適な部位を提供することができる。

20

30

【0146】

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

【0147】

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

40

【0148】

いくつかの実施形態では、コンジュゲート部分は、補体系の酵素によって切断可能ではない。例えば、コンジュゲート及び／または薬剤は、補体活性化によって標的細胞が最終的に溶解されるため、補体活性化なしで放出される。そのような実施形態では、コンジュゲート及び／または薬剤は、標的細胞に送達されることになる（例えば、ホルモン、酵素

50

、コルチコステロイド、神経伝達物質または遺伝子)。更に、コンジュゲート部分は、血清プロテアーゼによって穏やかに切断しやすくなり、コンジュゲート及び／または薬剤は、標的部位でゆっくりと放出される。

【0149】

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

【0150】

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

【0151】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、薬剤に対する少なくとも1つのコンジュゲーション点を含み得る。いくつかの実施形態では、全ての可能なコンジュゲーション点は、薬剤へのコンジュゲーションに利用可能である。いくつかの実施形態では、1つ以上のコンジュゲーション点には、ジスルフィド結合に関与する硫黄原子、鎖間ジスルフィド結合に関与する硫黄原子、鎖間スルフィド結合に関与する硫黄原子であるが鎖内ジスルフィド結合に関与する硫黄原子ではない硫黄原子、及び／またはシステイン、もしくは硫黄原子を含有する他のアミノ酸残基の硫黄原子が挙げられ得る。このような場合、残基は、タンパク質構成体構造中に天然に存在してよく、または部位特異的変異誘発、化学変換、もしくは非天然のアミノ酸の誤取込などの方法を用いて、タンパク質構成体に組み込まれてもよい。

【0152】

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

【0153】

本開示はまた、治療薬を活性化可能なタンパク質の特定の位置にコンジュゲートする方法及び材料を提供する。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、治療薬が活性化可能なタンパク質上の特定の位置で活性化可能なタンパク質にコンジュゲートされ得るように修飾され得る。例えば、活性化可能なタンパク質は、活性化可能なタンパク質へのコンジュゲートを促進するように、部分的に還元され得る。そのような場合、活性化可能なタンパク質の部分的な還元は、活性化可能なタンパク質のコンジュゲーション部位が還元されないように、起こり得る。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質上のコンジュゲート部位（複数可）は、タンパク質コンストラクト上の特定の位置における薬剤のコンジュゲートを促進するように選択され得る。還元剤を用いた処置において、様々な要因が、活性化可能なタンパク質の「還元レベル」に影響し得る。例えば、本明細

書に記載される方法及び材料を用いて活性化可能なタンパク質の部分的還元を達成するためには、限定されないが、活性化可能なタンパク質に対する還元剤の比、インキュベートの長さ、インキュベート温度、及び／または還元反応溶液のpHの最適化が必要となり得る。任意の適切な要因の組み合わせ（例えば、活性化可能なタンパク質に対する還元剤の比、還元剤とのインキュベートの長さ及び温度、及び／または還元剤のpH）を用いて、活性化可能なタンパク質の部分的還元を達成できる（例えば、利用可能なコンジュゲート部位の全体的な還元、または特定のコンジュゲート部位の還元）。

【0154】

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

10

【0155】

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

20

【0156】

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

30

【0157】

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

40

【0158】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、いかなる鎖内ジスルフィド結合の還元も回避する様式で、還元剤によって還元され得る。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、いかなる鎖内ジスルフィド結合の還元も回避し、少なくとも1つの鎖間ジスルフィド結合を還元する様式で、還元剤によって還元される。

【0159】

いくつかの実施形態では、薬剤（例えば、活性化可能なタンパク質にコンジュゲートされる薬剤）は、検出可能部分、例えば、標識またはその他のマーカーなどであり得る。例

50

例えば、薬剤は、放射性標識したアミノ酸、標識したアビジン（例えば、光学的または熱量測定法によって検出され得る、蛍光マーカーまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出され得る１種以上のビオチニル部分、１種以上の放射性同位元素もしくは放射性核種、１種以上の蛍光標識、１種以上の酵素標識、及び／または１種以上の化学発光剤であり得るか、またはこれらを含み得る。いくつかの実施形態では、検出可能部分は、スパーサー分子によって付着され得る。いくつかの実施形態では、検出可能な標識は、造影剤、コントラスト剤、酵素、蛍光標識、発色団、色素、１つ以上の金属イオン、またはリガンドベースの標識を含み得る。いくつかの実施形態では、造影剤は、放射性同位体を含み得る。いくつかの実施形態では、放射性同位体は、インジウムまたはテクネチウムであり得る。いくつかの実施形態では、コントラスト剤は、ヨウ素、ガドリニウム、または酸化鉄を含み得る。いくつかの実施形態において、酵素は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはβ-ガラクトシダーゼを含み得る。いくつかの実施形態では、蛍光標識は、黄色蛍光タンパク質（YFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、改変赤色蛍光タンパク質（mRFP）、赤色蛍光タンパク質tdimer2（RFPtdimer2）、HCREED、またはユーロピウム誘導体を含み得る。いくつかの実施形態では、発光標識は、N-メチルアクリジウム誘導体を含み得る。いくつかの実施形態では、標識は、Alexa Fluor（登録商標）680またはAlexa Fluor（登録商標）750などのAlexa Fluor（登録商標）標識を含み得る。いくつかの実施形態では、リガンドベースの標識は、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、または１つ以上のハプテンを含み得る。検出可能な標識の更なる例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、及び放射性物質も挙げられる。好適な酵素の例としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。好適な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチン及びアビジン／ビオチンが挙げられる。好適な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリトリンが挙げられる。発光物質の例としては、ルミノールが挙げられる。生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられる。適切な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H が挙げられる。

10

20

30

【0160】

いくつかの実施形態では、薬剤は、炭水化物部分、スルフヒドリル基、アミノ基またはカルボキシレート基を用いて、活性化可能なタンパク質にコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、薬剤は、本明細書に記載のリンカー及び／またはCMを介して活性化可能なタンパク質にコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、薬剤は、活性化可能なタンパク質中のシステインまたはリシンにコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、薬剤は、活性化可能なタンパク質の残基、例えば、本明細書にて開示した残基にコンジュゲートされ得る。

【0161】

いくつかの実施形態では、様々な二官能性タンパク質カップリング剤を用いて、活性化可能なタンパク質に薬剤をコンジュゲートすることができ、N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオール）プロピオネート（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、アジプイミド酸ジメチルHCL）、活性エステル（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えば、ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン2，6-ジイソシアネート）、及びビス-活性フッ素化合物（例えば、1，5-ジフルオロ-2，4-ジニトロベンゼン）などが挙げられる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)に記載されるように調製することができる。いくつ

40

50

かの実施形態では、炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)キレート剤を用いて、活性化可能なタンパク質に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートできる(例えば、WO94/11026を参照されたい)。

【0162】

適切なコンジュゲーション部分としては、文献に記載されているものが挙げられる(例えば、MBS(M-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)の使用について記載している、Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208(1984)参照)。オリゴペプチドを経由して活性化可能なタンパク質にカップリングされたハロゲン化アセチルヒドラジド誘導体の使用について記載している、米国特許第5,030,719号も参照されたい。いくつかの実施形態では、好適なコンジュゲーション部分としては、(i)EDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ-プロピル)カルボジイミドヒドロクロリド)、(ii)SMPT(4-スクシンイミジルオキシカルボニル-アルファ-メチル-アルファ-(2-プリジルジチオ)-トルエン(Pierce Chem. Co., カタログ(21558G))、(iii)SPDP(スクシンイミジル-6[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノエート(Pierce Chem. Co., カタログ番号21651G))、(iv)スルホ-LC-SPDP(スルホスクシンイミジル6[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート(Pierce Chem. Co., カタログ#2165-G))、及び(v)EDCにコンジュゲートされたスルホ-NHS(N-ヒドロキシスルホスクシンイミド:Pierce Chem. Co., カタログ番号24510)が挙げられる。追加の例示的なコンジュゲーション部分としては、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB、及びスルホ-SPDBが挙げられる。

10

20

【0163】

上記のコンジュゲーション部分は、異なる属性を有する構成要素を含有し得、したがって、異なる生理化学的特性を有するコンジュゲートがもたらされる。例えば、アルキルカルボキシレートのスルホ-NHSエステルは、芳香族カルボキシレートのスルホ-NHSエステルよりも、より安定している。NHSエステル含有のリンカーは、スルホ-NHSエステルよりも可溶性が低い。更に、SMPTは、立体障害型のジスルフィド結合を含有し、安定性の高いコンジュゲートを形成することができる。ジスルフィド結合は、ジスルフィド結合が*in vitro*で切断されるため、一般的に他の結合より安定性が低く、利用可能なコンジュゲートが得られることが少ない。スルホ-NHSは、特に、カルボジイミドカップリングの安定性を高めることができる。カルボイミジドカップリング(例えば、EDC)をスルホ-NHSとコンジュゲートさせて用いる場合、カルボイミジドカップリング反応単独よりも、加水分解により抵抗性のあるエステルを形成する。

30

【0164】

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

40

【0165】

核酸及びベクター

いくつかの態様では、本開示は、本明細書の活性化可能な分子(例えば、活性化可能な抗体)、またはその構成要素もしくは断片をコードする配列を含む、核酸を更に提供する。核酸は、活性化可能なタンパク質中のTB、CM、MM、EM、及びリンカー(複数可

50

）のコード配列を含み得る。活性化可能なタンパク質が複数のポリペプチド（例えば、異なるポリペプチド上の複数のTB、または1つのTBが複数のポリペプチドを含む）を含む場合、核酸は、複数のポリペプチドのコード配列を含み得る。いくつかの例では、ポリペプチドの1つのコード配列は核酸に含まれ、ポリペプチドの別の1つのコード配列は別の核酸に含まれる。いくつかの例では、複数のポリペプチドのうちの2つ以上のコード配列は、同じ核酸に含まれる。本開示は、本明細書に記載のタンパク質またはその一部をコードするポリヌクレオチド、ならびにタンパク質を生成するための及び／または治療目的のためのこのようなポリヌクレオチドの使用を含む。このようなポリヌクレオチドは、本明細書で定義されるタンパク質をコードするDNA及びRNA分子（例えば、mRNA、自己複製RNA、自己増幅mRNAなど）を含み得る。本開示は、このようなポリヌクレオチドを含む組成物を含む。いくつかの態様では、このような組成物は、治療的または予防的に使用され得る。

10

【0166】

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

20

【0167】

「N末端に位置する」という用語は、ポリペプチドの一次アミノ酸配列における第2のドメインまたは配列に対する第1のドメインまたは配列の位置について言及する場合、第1のドメインがポリペプチドの一次アミノ酸配列のN末端寄りに位置することを意味する。いくつかの実施形態では、第1のドメインまたは配列と第2のドメインまたは配列との間に、更なる配列及び／またはドメインがあってもよい。「C末端に位置する」という用語は、ポリペプチドの一次アミノ酸配列における第2のドメインまたは配列に対する第1のドメインまたは配列の位置について言及する場合、第1のドメインがポリペプチドの一次アミノ酸配列のC末端寄りに位置することを意味する。いくつかの実施形態では、第1のドメインまたは配列と第2のドメインまたは配列との間に、更なる配列及び／またはドメインがあってもよい。

30

【0168】

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

40

50

。

【0169】

本開示は、本明細書に記載の核酸のいずれかを含むベクター及びベクターのセットを更に提供し、当業者であれば、本明細書に記載される活性化可能なタンパク質のいずれかを作製するために、好適なベクターまたはベクターのセット（例えば、発現ベクター）を選択すること、及びベクターまたはベクターのセットを使用して、本明細書に記載される活性化可能なタンパク質のいずれかを発現させることができるであろう。例えば、ベクターまたはベクターのセットの選択では、ベクター（複数可）は、細胞の染色体に組み込まれ、及び／またはそこで複製できる必要があり得るように、細胞の種類は選択され得る。活性化可能なタンパク質を生成するために使用することができる例示的なベクターも、本明細書に記載する。本明細書で使用する場合、「ベクター」という用語は、細胞内（例えば、本明細書に記載される細胞のいずれか）で、組換えタンパク質（例えば、第1のまたは第2のモノマー）の発現を誘導できるポリヌクレオチドを意味する。「ベクター」は、宿主細胞内に核酸及びそれらの断片を送達することができ、制御配列（例えば、プロモータ、エンハンサ、ポリ（A）シグナル）を含む。外因性ポリヌクレオチドは、発現させるために発現ベクターに挿入され得る。「ベクター」という用語はまた、人工染色体、プラスミド、レトロウイルス及びバキュロウイルスベクターも含む。

10

【0170】

本明細書に記載される核酸のいずれか1つを含有し、細胞（例えば、哺乳動物細胞）を形質転換するのに好適なベクターを作成する方法は、当技術分野で周知である。例えば、Sambrook et al., Eds., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, 1989及びAusubel et., Eds., "Current Protocols in Molecular Biology," Current Protocols, 1993を参照されたい。

20

【0171】

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

30

【0172】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、組換えDNA技術及び真核生物または原核生物の種における発現を使用して、生合成的に作製されてもよい。

【0173】

細胞

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載のベクターまたは核酸のいずれかを含む組換え宿主細胞を提供する。細胞は、本明細書に記載の活性化可能な分子（例えば、活性化可能な抗体）を生成するために使用され得る。いくつかの実施形態では、細胞は、動物細胞、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）、げっ歯動物細胞（例えば、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞もしくはモルモット細胞）、非ヒト霊長類細胞、昆虫細胞、細菌細胞、真菌細胞、または植物細胞であり得る。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞であり得る。本明細書で使用する場合、「真核細胞」という用語は、異なる膜結合性の核を有する細胞を意味する。このような細胞としては、例えば、哺乳動物（例えば、げっ歯動物、非ヒト霊長類またはヒト）、昆虫、真菌または植物細胞が挙げられ得る。いくつかの実施形態では、真核細胞は、酵母細胞、例えば、Saccharomyces cerevisiaeである。いくつかの実施形態では、真核細胞は、より高等な真核細胞

40

50

、例えば、哺乳動物、トリ、植物または昆虫細胞である。哺乳動物細胞の非限定例としては、チャイニーズハムスター卵巢（CHO）細胞及びヒト胎児腎細胞（例えば、HEK293細胞）が挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞は、原核生物細胞であり得る。

【0174】

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

10

【0175】

いくつかの実施形態では、導入ステップは、本明細書に記載される任意の活性化可能なタンパク質を構成するモノマーをコードする核酸を含有するベクター（例えば、本明細書に記載されるベクターまたはベクターのセットのいずれか）を細胞内に導入することを含む。

【0176】

組成物及びキット

本開示はまた、本明細書に記載の活性化可能な分子（例えば、活性化可能な抗体）を含む、組成物及びキットを提供する。組成物及びキットは、1つ以上の賦形剤、担体、試薬、活性化可能なタンパク質の使用に必要な説明書を更に含み得る。

20

【0177】

いくつかの実施形態では、組成物は、活性化可能なタンパク質、その誘導体、断片、類似体、及び相同体を含む医薬組成物であり得る。医薬組成物は、活性化可能なタンパク質及び薬学的に許容される担体を含み得る。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される担体」という用語とは、医薬品の投与と適合する、あらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び真菌剤、等張剤、及び吸収遅延剤などを含むことを意図する。適切な担体は、当分野の標準的な参照テキストであるRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に記載されており、これは、参照により本明細書に組み込まれる。このような担体または希釈剤の好適な例としては、水、生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液、及び5%ヒト血清アルブミンが挙げられる。リポソーム及び不揮発性油などの非水性媒体が、用いられてもよい。薬学的な活性物質のためのこのような媒体及び薬剤の使用は、当技術分野では周知である。任意の従来媒体または薬剤が活性化化合物と不適合性である限りを除いて、組成物におけるその使用が企図される。補足的活性成分を、組成物に組み込むこともできる。

30

【0178】

医薬組成物は、その意図される投与経路に適合するように製剤化され得る。投与経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（例えば、局所）、経粘膜、及び直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下投与に使用される溶液または懸濁液は、以下の成分：注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩などの緩衝液；ならびに塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの等張性調節のための薬剤；のうちの1つ以上を含み得る。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整することができる。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、またはガラスもしくはプラスチックから作製された複数用量バイアルに封入され得る。いくつかでは、本明細書に記載される活性化可能なタンパク質のいずれかは、身体からの急速な排除に対して保護する担体、例えば、インプラント及びマイクロカプセル化送達システムなどの徐放性製剤及び制御放出製剤と共に調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエ

40

50

ステル、ポリ乳酸－グリコール酸共重合体、及びポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。このような医薬組成物及び製剤の調製方法は、当業者には明らかである。例えば、活性化可能なタンパク質は、例えば、コアセルベーション技法によって、または界面重合によって調製されるマイクロカプセル中に、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン－マイクロカプセル及びポリ－（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ乳濁液、ナノ粒子、及びナノカプセル）中またはマイクロ乳濁液中に取り込まれてもよい。

【0179】

徐放性調製物が調製されてもよい。徐放性放出調製物の好適な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、これらのマトリックスは、成形物品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド、Ｌ－グルタミン酸及びエチル－Ｌ－グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン－酢酸ビニル、分解性乳酸－グリコール酸コポリマー（例えば、乳酸－グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なマイクロスフェア）、及びポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン－酢酸ビニル及び乳酸－グリコール酸などのポリマーが１００日間にわたる分子の放出を可能にする一方で、特定のヒドロゲルは、より短い期間にわたってタンパク質を放出する。

【0180】

いくつかの実施形態では、注射用途に好適な医薬組成物には、注入可能な滅菌溶液または分散液を即時調製するための滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液、及び滅菌粉末が含まれる。静脈内投与の場合、適切な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, N.J.）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が含まれる。組成物は滅菌されていてもよく、流体であり、容易に注射できる粘度でなければならない。これは、製造及び保管の条件下で安定していてもよく、細菌及び真菌などの微生物の混入作用から保護されていてもよい。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）を含有する溶媒または分散媒質、及びその適切な混合物であり得る。分散粒子組成物の場合、適切な流動性は、例えば、レシチンなど粒子上のコーティングの使用によって、及び分散の場合には必要とされる粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、１つ以上の抗菌剤及び／または抗菌抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどを更に含み得る。いくつかの実施形態では、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、及び例えば塩化ナトリウムなどの塩が組成物に含まれ得る。注射用組成物の持続的吸収は、組成物中に、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含むことによってもたすことができる。

【0181】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、滅菌注射液を含み得る。滅菌注射液は、必要な量の活性化化合物を、必要に応じて、上に列挙された成分のうちの１つまたはその組み合わせを有する適切な溶媒中に組み込み、続いて、濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散液は、活性化化合物を、基本的な分散媒及び上で列挙されたものからの必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことによって調製され得る。滅菌注射液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法は、事前に滅菌濾過されたその溶液から活性成分プラス任意の追加の所望の成分の粉末を得る、真空乾燥及び凍結乾燥法である。

【0182】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、経口組成物を含み得る。経口組成物は、不活

性希釈剤または食用担体を含み得る。それらは、ゼラチンカプセルに封入されてもよい、または錠剤に圧縮されてもよい。経口治療投与の目的で、活性化合物は、賦形剤と共に組み込まれ得、錠剤、トローチ剤、またはカプセル剤の形態で使用され得る。経口組成物はまた、口内洗浄剤として使用するための流体担体を使用して調製してもよく、流体担体中の化合物は、経口で用いられ、すすいで吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合する結合剤及び／またはアジュバント材を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル、トローチ剤などは、以下の成分または類似の性質の化合物：結合剤（微結晶性セルロース、トラガカントガムまたはゼラチンなど）、賦形剤（デンプンまたはラクトースなど）、崩壊剤（アルギン酸、Primogelまたはコーンスターチなど）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウムまたはSterotesなど）、流動化剤（コロイド状二酸化ケイ素など）、甘味剤（スクロースまたはサッカリンなど）、または香味剤（ペパーミント、サリチル酸メチルまたはオレンジフレーバーなど）のうちのいずれかを含むことができる。

10

【0183】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、吸入による投与用に製剤化され得る。例えば、化合物は、適切な噴霧剤、例えば、二酸化炭素などのガスを含む加圧容器またはディスペンサー、またはネブライザーからエアロゾルスプレーの形態で送達されてもよい。

【0184】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、全身投与用に製剤化され得る。例えば、全身投与は、静脈内、及び経粘膜または経皮手段によるものであり得る。経粘膜または経皮投与のために、浸透すべき障壁に適切な浸透剤が製剤に使用され得る。そのような浸透剤は一般に、当技術分野で既知であり、例えば、経粘膜投与用に、界面活性剤、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、鼻腔スプレーまたは坐剤の使用を通じて達成され得る。経皮投与のために、活性化合物は、当技術分野で一般的に既知であるように、軟膏（ointment）、軟膏（salve）、ゲル、またはクリームに製剤化され得る。

20

【0185】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、直腸送達のために、坐剤の形態（例えば、カカオ脂及び他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤と共に）、または停留浣腸の形態で調製され得る。

30

【0186】

一実施形態では、医薬組成物は、身体からの急速な排除に対して組成物を保護する担体、例えば、インプラント及びマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤と共に調製され得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸-コ-グリコール酸、及びポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤の調製方法は、当業者には明らかである。

【0187】

投与の容易性及び投薬量の均一性のために、経口または非経口組成物を単位剤形で製剤化することが、とりわけ有利であり得る。本明細書で使用される単位剤形は、対象を治療するための単位の投薬（unitary dosages）として適した、物理的に別々の単位を指し、各単位は、必要とされる医薬担体に関連して所望の治療効果をもたらすように算出された、既定量の活性化合物を含む。本開示の単位剤形の仕様は、活性化合物の固有の特徴及び達成されるべき特定の治療効果、ならびに個体の治療のためにかかる活性化合物を調合する技術分野の本質的な制限によって決定付けられ得、またそれに直接依存し得る。

40

【0188】

いくつかの実施形態では、組成物（例えば、医薬組成物）は、容器、バイアル、シリンジ、注射ペン、パック、またはディスペンサーに、任意選択で、投与に関する説明書と一緒に含まれてもよい。

【0189】

50

本明細書では、本明細書に記載される活性化可能なタンパク質のいずれか、本明細書に記載される活性化可能なタンパク質のいずれかを含有する組成物のいずれか、または本明細書に記載される活性化可能なタンパク質のいずれかを含有する医薬組成物のいずれか、を含有するキットもまた提供される。本明細書に記載される活性化可能なタンパク質に加えて、1種以上の第2の治療薬（複数可）を含有するキットもまた提供される。第2の治療薬（複数可）は、活性化可能なタンパク質とは別の投与形態で提供されてもよい。あるいは、第2の治療薬（複数可）は、活性化可能なタンパク質と一緒に製剤化されてもよい。

【0190】

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

10

【0191】

本明細書では、本明細書に記載の方法のいずれかによって生成される活性化可能なタンパク質も提供される。本明細書に記載の方法のいずれかによって生成される活性化可能なタンパク質のいずれかを含有する組成物（例えば、医薬組成物）も提供される。本明細書では、本明細書に記載される組成物（例えば、医薬組成物）のいずれかの少なくとも1回の用量を含有するキットもまた提供される。

20

【0192】

活性化可能な分子を生成する方法

本明細書では、本明細書に記載される活性化可能な分子（例えば、活性化可能なタンパク質）のいずれかを生成する方法であって、（a）本明細書に記載される組換え宿主細胞のいずれかを、液体培地中で、活性化可能なタンパク質を生成するのに十分な条件下にて培養することと、（b）宿主細胞及び／または液体培地から活性化可能なタンパク質を回収することと、を含む、方法が提供される。

【0193】

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

30

【0194】

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

40

【0195】

本明細書に記載される組成物及び方法は、活性化可能なタンパク質のMMとTBとの間のジスルフィド結合の形成を可能にする、非還元または部分的な還元条件の使用を伴ってもよい。

【0196】

いくつかの実施形態では、方法は、単離した活性化可能なタンパク質を医薬組成物に配

50

合することを更に含む。様々な製剤が、当技術分野において既知であり、本明細書に記載される。本明細書に記載される任意の単離した活性化可能なタンパク質は、任意の投与経路用（例えば、静脈内、腫瘍内、皮下、皮内、経口（例えば、吸入）、経皮（例えば、局所用）、経粘膜、または筋肉内）に調製できる。

【0197】

活性化可能な分子を使用する方法

いくつかの態様では、本開示は、本明細書の活性化可能な分子（例えば、活性化可能な抗体）を使用する方法を更に提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、対象の疾患（例えば、がん（例えば、本明細書に記載されるがんのいずれか））を治療する方法であって、本明細書に記載の治療上有効な量の活性化可能なタンパク質のいずれかを対象に投与することを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の治療上有効な量の活性化可能なタンパク質をそれを必要とする対象に投与することによって、対象における疾患を予防する、その進行を遅延させる、治療する、その症状を緩和する、または改善する方法を提供する。「治療」という用語は、疾患の少なくとも1つの症状を改善することを意味する。いくつかの実施形態では、治療される疾患はがんまたは自己免疫疾患であり得、がんまたは自己免疫疾患の少なくとも1つの症状を緩和するためのものであり得る。本明細書で使用する場合、「対象」という用語は、任意の哺乳動物を意味する。いくつかの実施形態では、対象は、ネコ科動物（例えば、ネコ）、イヌ科動物（例えば、イヌ）、ウマ科動物（例えば、ウマ）、ウサギ、ブタ、げっ歯動物（例えば、マウス、ラット、ハムスターまたはモルモット）、非ヒト霊長類（例えば、シミアン（例えば、サル（例えば、ヒヒ、マーモセット）、または類人猿（例えば、チンパンジー、ゴリラ、オランウータンもしくはテナガザル））、またはヒトである。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。対象及び患者という用語は、互換的に使用される。いくつかの実施形態では、対象は、疾患（例えば、がん（例えば、本明細書に記載のがんのいずれか））を有すると、予め特定または診断されている。

10

20

【0198】

いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物細胞（例えば、本明細書に記載の哺乳動物細胞のいずれか）におけるHER2の発現及び／または活性を増加させるHER2遺伝子の変異を有するとして同定され得る。例えば、哺乳動物細胞におけるHER2の発現及び／または活性を増加させるHER2遺伝子の変異は、遺伝子重複、1つ以上のアミノ酸置換（例えば、G309A、G309E、S310F、R678Q、L755S、L755W、I767M、D769H、D769Y、V777L、Y835F、V842I、R896C、及びG1201Vからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸置換）を有するHER2の発現をもたらす変異であり得る（野生型タンパク質と比較して）。例えば、Weigel et al. and Reis-Filho, Cancer Discov. 2013, 3(2):145-147を参照のこと。

30

【0199】

対象におけるHER2関連疾患を検出する方法の非限定的な例としては、免疫組織化学、蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）、発色in situハイブリダイゼーション（CISH）が挙げられる。例えば、Yan et al., Cancer Metastasis Rev. 2015, 34:157-164を参照のこと。

40

【0200】

本開示の活性化可能なタンパク質の治療上有効な量は、一般に、治療目的を達成するのに必要な量に関する。上述したように、これは、抗体とその標的抗原との間の結合相互作用であり得、特定の場合には、標的の機能を妨げる。投与されるのに必要な量は更に、その特定の標的に対する活性化可能タンパク質の結合親和性に依存し、投与された活性化可能タンパク質が、それが投与される自由堆積の他の対象から枯渇する速度にも依存する。本開示の活性化可能なタンパク質の治療上有効な投与量の一般的な範囲は、非限定的な例として、約0.001、0.01、0.1、0.3、0.5、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、4

50

5、50mg/kg体重、またはそれ以上であり得る。本開示の活性化可能なタンパク質の構造は、従来の活性化可能な抗体と比較して、及び従来の抗体と比較して、対象に投与される活性化可能なタンパク質の用量を減少させることを可能にする。例えば、単位剤形に基づく投与用量、または投与レジメン期間にわたる総投与量は、対応する従来の活性化可能なタンパク質または対応する従来の抗体の対応する用量と比較して、10、20、30、40、または50%低減され得る。

【0201】

一般的な投与頻度は、例えば、1日1回もしくは2回、週に1回もしくは2回、2週間に1回もしくは2回、または月に1回もしくは2回の範囲であってもよい。

【0202】

治療の有効性は、特定の障害を診断または治療するための任意の既知の方法に関連して判定される。所望の特異性を保有する活性化可能タンパク質のスクリーニング方法としては、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、及び当技術分野内で既知の他の免疫学的介入技術が挙げられるが、これらに限定されない。

【0203】

別の実施形態では、2つ以上の標的に向けられた活性化可能なタンパク質は、標的の局在化及び／または定量化に関する当技術分野で既知の方法で使用される（例えば、適切な生理学的試料内の標的のうちの1つ以上のレベルを測定における使用、診断方法における使用、タンパク質の撮像における使用など）。所与の実施形態では、2つ以上の標的に対する活性化可能なタンパク質、または抗体由来の抗原結合ドメインを含むその誘導体、断片、類似体もしくは相同体は、薬理活性化合物（以下、「治療薬」と呼ばれる）として利用される。

【0204】

これらの方法及び使用の実施形態のいずれかで使用される活性化可能なタンパク質は、疾患の任意の段階で投与することができる。例えば、このような活性化可能なタンパク質は、早期から転移性までの任意の段階のがんを患っている患者に投与され得る。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質及びその製剤は、異常な標的発現及び／または活性に関連する疾患もしくは障害に罹患しているか、またはその影響を受けやすい対象に投与され得る。

【0205】

異常な標的発現及び／または活性に関連する疾患もしくは障害に罹患しているか、またはそれに罹患しやすい対象は、当技術分野で既知の様々な方法のいずれかを使用して同定され得る。例えば、がんまたは他の腫瘍性状態に罹患している対象は、健康状態を評価するための身体検査及び血液、尿及び／または糞便分析などの様々な臨床検査及び／またはラボ検査のいずれかを使用して特定され得る。例えば、炎症及び／または炎症性障害に罹患している対象は、健康状態を評価するための身体検査及び体液分析、例えば、血液、尿及び／または糞便分析などの様々な臨床検査及び／またはラボ検査のいずれかを使用して特定され得る。

【0206】

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

【0207】

本明細書で使用する場合、「治療する」という用語は、対象（例えば、本明細書に記載

10

20

30

40

50

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

【0208】

いくつかの実施形態では、疾患は、がんであり得る。いくつかの実施形態では、対象は、がんを有すると特定または診断されていてもよい。がんの例としては、固形腫瘍、血液腫瘍、肉腫、骨肉腫、グリア芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、B細胞新生物、多発性骨髄腫、リンパ腫(例えば、B細胞リンパ腫、B細胞非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、悪性皮膚T細胞リンパ腫)、白血病(例えば、毛様細胞性白血病、慢性リンパ性白血病(CLL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、急性リンパ性白血病(ALL))、脊髄形成異常性症候群(MDS)、カポジ肉腫、網膜芽細胞腫、胃癌、尿路上皮性癌、肺癌、腎細胞癌、胃及び食道癌、膵臓癌、前立腺癌、脳の癌、大腸癌、骨癌、肺癌、乳癌、結腸直腸癌、卵巣癌、鼻咽頭腺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、扁平上皮細胞頭頸部癌、子宮体癌、膀胱癌、子宮頸癌、肝臓癌、及び肝細胞癌が挙げられる。いくつかの実施形態では、がんはリンパ腫である。いくつかの実施形態では、リンパ腫はバーキットリンパ腫である。いくつかの態様では、対象は、家族性癌症候群、例えばリフラウメニ症候群、家族性乳癌・卵巣癌(BRCA1またはBRAC2の変異)症候群などを有すると特定または診断されている。開示される方法は、非固形癌の治療にも有用である。例示的な固形腫瘍としては、各種の臓器系、例えば肺、乳房、リンパ系、消化管(例えば、結腸)、泌尿生殖器(例えば、腎臓、尿路上皮、または精巣の腫瘍)、咽頭、前立腺及び卵巣などの悪性腫瘍(例えば、肉腫、腺癌及び癌腫)が挙げられる。例示的な腺癌としては、結腸直腸癌、腎細胞腫、肝臓癌、肺の非小細胞癌、及び小腸の癌が挙げられる。本明細書の組成物及び方法によって治療され得るがんの更なる例としては、急性リンパ芽球性白血病(成人)；急性リンパ芽球性白血病(小児)；急性骨髄性白血病(成人)；副腎皮質癌；副腎皮質癌(小児)；AIDS関連リンパ腫；AIDS関連悪性腫瘍；肛門癌；小児小脳星細胞腫；小児大脳星細胞腫；肝外胆管癌；膀胱癌；膀胱癌(小児)；骨癌、骨肉腫／悪性線維性組織球腫；脳幹神経膠腫(小児)；脳腫瘍(成人)；脳腫瘍、脳幹神経膠腫(小児)；脳腫瘍、小脳星細胞腫(小児)；脳腫瘍、大脳星細胞腫／悪性神経膠腫(小児)；脳腫瘍、上衣腫(小児)；脳腫瘍、髄芽腫(小児)；脳腫瘍、テント上原始神経外胚葉腫瘍(小児)；脳腫瘍、視覚路及び視床下部神経膠腫(小児)；その他の脳腫瘍(小児)；乳癌；乳癌及び妊娠；乳癌(小児)；乳癌(男性)；気管支腺腫／カルチノイド(小児)；カルチノイド腫瘍(小児)；消化管カルチノイド腫瘍；副腎皮質癌；膵島細胞癌；原発不明癌；原発性中枢神経系リンパ腫；小脳星細胞腫(小児)；脳星細胞腫／悪性神経膠腫(小児)；子宮頸癌；小児癌；慢性リンパ性白血病；慢性骨髄性白血病；慢性骨髄増殖性疾患；腱鞘明細胞肉腫；大腸癌；大腸癌(小児)；皮膚T細胞リンパ腫；子宮内膜癌；上衣腫(小児)；卵巣上皮癌；食道癌；食道癌(小児)；ユーイング肉腫ファミリー腫瘍；頭蓋外胚細胞腫瘍(小児)；性腺外胚細胞腫瘍；肝外胆管癌；眼癌(眼内黒色腫)；眼癌(網膜芽細胞腫)；胆嚢癌；胃(Gastric)(胃(Stomach))癌；胃(Gastric)(胃(Stomach))癌(小児)；消化管カルチノイド腫瘍；頭蓋外胚細胞腫瘍(小児)；頭蓋外胚細胞腫瘍；卵巣胚細胞腫瘍；妊娠性絨毛腫瘍；小児脳幹神経膠腫；小児視覚路及び視床下部神経膠腫；毛様細胞白血病；頭頸部癌；原発性肝細胞(肝)癌(成人)；原発性肝細胞(肝)癌(小児)；ホジキンリンパ腫(成人)；ホジキンリンパ腫(小児)；妊娠中のホジキンリンパ腫；下咽頭癌；視床下部及び視覚路神経膠腫(小児)；眼内黒色腫；膵島細胞癌(内分泌膵臓)；カポジ肉腫；腎臓癌；喉頭癌；喉頭癌(小児)；急性リンパ芽球性白血病(成人)；急性リンパ芽球性白血病(小児)；急性骨髄性白血病(成人)；急性骨髄性白血病(小児)；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性白血病；毛様細胞白血病；口唇及び口腔癌；原発性肝癌(成人)；原発性肝癌(小児)；非小細胞肺癌；小細胞肺癌

10

20

30

40

50

；急性リンパ芽球性白血病（成人）；急性リンパ芽球性白血病（小児）；慢性リンパ球性白血病；AIDS関連リンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；皮膚T細胞リンパ腫；ホジキンリンパ腫（成人）；ホジキンリンパ腫（小児）；妊娠中のホジキンリンパ腫；非ホジキンリンパ腫（成人）；非ホジキンリンパ腫（小児）；妊娠中の非ホジキンリンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症；男性乳癌；悪性中皮腫（成人）；悪性中皮腫（小児）；悪性胸腺腫；髄芽腫（小児）；黒色腫；眼内黒色腫；メルケル細胞癌；悪性中皮腫；原発不明転移性扁平上皮癌；多発性内分泌腫瘍症候群（小児）；多発性骨髄腫／形質細胞腫瘍；菌状息肉症；骨髄異形成症候群；骨髄性白血病（慢性）；急性骨髄性白血病（小児）；多発性骨髄腫；慢性骨髄増殖性疾患；鼻腔及び副鼻腔癌；上咽頭癌；上咽頭癌（小児）；神経芽細胞腫；非ホジキンリンパ腫（成人）；非ホジキンリンパ腫（小児）；妊娠中の非ホジキンリンパ腫；非小細胞肺癌；口腔癌（小児）；口腔及び口唇癌；口腔咽頭癌；骨肉腫／骨の悪性線維性組織球腫；卵巣癌（小児）；卵巣上皮癌；卵巣胚細胞腫瘍；卵巣低悪性度腫瘍；脾臓癌；脾臓癌（小児）；脾臓細胞癌；副鼻腔及び鼻腔癌；副甲状腺癌；陰茎癌；褐色細胞腫；松果体及び脳室上部の原発性神経外胚葉腫瘍（小児）；下垂体腫瘍；形質細胞腫瘍／多発性骨髄腫；胸膜肺芽腫；妊娠及び乳癌；妊娠及びホジキンリンパ腫；妊娠及び非ホジキンリンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；原発性肝癌（成人）；原発性肝癌（小児）；前立腺癌；直腸癌；腎細胞癌；腎細胞癌（小児）；腎骨盤及び尿管移行上皮癌；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫（小児）；唾液腺癌；唾液腺癌（小児）；ユーイング肉腫ファミリー腫瘍；カポジ肉腫；肉腫（骨肉腫）／悪性線維性骨組織球腫；横紋筋肉腫（小児）；軟部組織肉腫（成人）；軟部組織肉腫（小児）；セザリー症候群；皮膚癌；皮膚癌（小児）；皮膚癌（黒色腫）；メルケル細胞皮膚癌；小細胞肺癌；小腸癌；軟部肉腫（成人）；軟部肉腫（小児）；原発性及び転移性扁平上皮癌；胃（Stomach）（胃（Gastric））癌；胃（Stomach）（胃（Gastric））癌（小児）；脳室上性原発性神経外胚葉腫瘍（小児）；皮膚T細胞リンパ腫；精巣癌；胸腺腫（小児）；悪性胸腺腫；甲状腺癌；甲状腺癌（小児）；腎盂尿管移行上皮癌；妊娠中の絨毛腫瘍；原発部位不明癌（小児）；小児期の異常な癌；尿管及び腎盂移行上皮癌；尿道癌；子宮肉腫；膣癌；視覚路及び視床下部神経膠腫（小児）；外陰癌；ワルデンシュトレーム巨細胞グロブリン血症；ウィルムス腫瘍；びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）；ならびにマントル細胞リンパ腫（MCL）が挙げられる。上記のがんの転移もまた、本明細書に記載される方法に従って治療または予防できる。

10

20

30

【0209】

いくつかの実施形態では、疾患は、自己免疫疾患または状態であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、自己免疫疾患もしくは状態を有すると特定または診断されている可能性があるか、または自己免疫疾患もしくは状態を発症するリスクが高い。自己免疫疾患の例としては、1型糖尿病、関節リウマチ（RA）、乾癬／乾癬性関節炎、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎）、アジソン病、バセドウ病、シェーグレン症候群、橋本甲状腺炎、重症筋無力症、自己免疫性血管炎、悪性貧血、セリアック病）、感染症（例えば、水痘、感冒、ジフテリア、大腸菌、ジアルジア症、HIV／AIDS、感染性単核球症、インフルエンザ、ライム病、マラリア、はしか、髄膜炎、おたふくかぜ、ポリオ、肺炎、ロッキー山紅斑熱、風疹（三日はしか）、サルモネラ感染症、重症急性呼吸器症候群（SARS）、性感染症、带状疱疹、破傷風、中毒性ショック症候群、結核、ウイルス性肝炎、西ナイルウイルス、百日咳）、慢性炎症、移植拒絶反応（例えば、腎移植、肝移植、または心臓移植において）、自己免疫疾患、感染症、慢性炎症、または移植拒絶反応が挙げられる。

40

【0210】

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

【0211】

50

本方法は更に、対象に1つ以上の追加の薬剤を投与することを含み得る。

【0212】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、1つ以上の追加の薬剤と組み合わせて治療中及び／または治療後に投与され得る。いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、単一の治療用組成物中に製剤化され得、活性化可能なタンパク質及び追加の薬剤（複数可）は、同時に投与され得る。あるいは、活性化可能なタンパク質及び追加の薬剤（複数可）は互いに別々であってもよく、例えば、それぞれが別の治療組成物に配合され、活性化可能なタンパク質及び追加の薬剤は同時に投与されるか、または活性化可能なタンパク質及び追加の薬剤は治療レジメン中の異なる時点で投与される。例えば、活性化可能なタンパク質は、追加の薬剤の投与前に、追加の薬剤の投与に続いて、または交互に投与されてもよい。活性化可能なタンパク質及び追加の薬剤（複数可）は、単回用量または複数回用量で投与されてもよい。

10

【0213】

本明細書の活性化可能なタンパク質のうちの1つ以上は、1つ以上の抗炎症薬、免疫抑制剤、または代謝もしくは酵素阻害剤と共製剤化され得、及び／または同時投与され得る。いくつかの実施形態では、本明細書の1つ以上の活性化可能なタンパク質は、1つ以上の他のタイプの活性化可能なタンパク質（例えば、EMを有しない活性化可能なタンパク質、または活性化形態がEMを含む活性化可能なタンパク質）と組み合わせられ得る。

【0214】

本開示はまた、対象または試料における切断剤及び／または標的の有無を検出する方法を提供する。このような方法は、(i) 対象または生体試料を活性化可能タンパク質と接触させることであって、活性化可能タンパク質は、CMの切断後に放出される活性化可能タンパク質の一部に配置される検出可能な標識を含む、接触させることと、(ii) 対象または生体試料中の活性化タンパク質のレベルを測定することと、を含み得、対象または生体試料中の活性化タンパク質の検出可能なレベルは、切断剤、標的、または切断剤と標的の両方が、対象または生体試料中に存在しない及び／または十分に存在しないことを示し、したがって、活性化可能なタンパク質の標的結合及び／またはプロテアーゼ切断は、対象または生体試料中で検出することができず、対象または生体試料中の活性化タンパク質の検出可能なレベルの低下は、切断剤及び標的が対象または生体試料中に存在することを示す。

20

30

【0215】

検出可能な標識のレベルの低下は、例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%もしくは95%、または実質的に100%の低下であり得る。いくつかの実施形態では、検出可能な標識は、活性化可能なタンパク質の構成要素、例えば、TBにコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、対象または試料中の活性化可能なタンパク質のレベルを測定することは、活性化タンパク質に特異的に結合する二次試薬を使用して達成され得、試薬は検出可能な標識を含む。二次試薬は、検出可能な標識を含む抗体であり得る。

【0216】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質はまた、患者試料中の標的の検出にも有用であり得、したがって、診断薬として有用である。例えば、活性化可能なタンパク質は、患者試料中の標的レベルを検出するために、*in vitro*アッセイ、例えば、ELISAに使用され得る。例えば、活性化可能なタンパク質は、固体支持体（例えば、マイクロタイタープレートのウェル（複数可））上に固定化されてもよい。固定化された活性化可能なタンパク質は、試験試料中に存在し得る任意の標的の捕捉タンパク質として機能し得る。固定化された活性化可能なタンパク質を患者試料と接触させる前に、分析物の非特異的吸着を防止するために、固体支持体をすすぎ、乳タンパク質またはアルブミンなどのブロッキング剤で処理してもよい。

40

【0217】

50

いくつかの実施形態では、*in vitro* 診断アッセイにおいて活性化可能なタンパク質を使用して得られた結果に基づいて、対象における疾患の病期は、標的タンパク質（例えば、抗原）の発現レベルに基づいて決定され得る。所与の疾患に関して、血液試料は、疾患の進行の様々な段階にあると診断された対象から、及び／または疾患の治療的処置の様々な時点で採取され得る。進行または治療の各段階について統計的に有意な結果を提供する試料の集団を使用して、各段階に特有と考えられ得る標的タンパク質（例えば、抗原）の濃度範囲を指定する。

【0218】

本明細書の活性化可能なタンパク質は、診断方法及び／またはイメージング方法にも使用され得る。いくつかの実施形態では、そのような方法は、*in vitro* 方法であり得る。いくつかの実施形態では、そのような方法は、*in vivo* 方法であり得る。いくつかの実施形態では、そのような方法は、*in situ* 方法であり得る。いくつかの実施形態では、そのような方法は、*ex vivo* 方法であり得る。例えば、CMを有する活性化可能なタンパク質を使用して、CMを切断することができる酵素の有無を検出することができる。このような活性化可能なタンパク質は、診断に使用することができ、これは、所与の宿主生物の所与の細胞または組織における活性化抗体（すなわち、活性化可能なタンパク質の切断から生じる抗体）の測定された蓄積による酵素活性（または、いくつかの実施形態では、ジスルフィド結合の還元を提供できるような、還元電位が上昇した環境）の *in vivo* 検出（例えば、定性的または定量的）を含むことができる。活性化タンパク質のそのような蓄積は、組織が酵素活性を発現すること（または、CMの性質に依拠して還元電位の増加）だけでなく、組織が活性化タンパク質が結合する標的を発現することも示す。

【0219】

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

【0220】

いくつかの実施形態では、活性化可能なタンパク質は、対象、例えば、ヒトを含む哺乳動物における蛍光信号の検出によって、疾患部位に標的が含まれており、活性化可能なタンパク質のCMに特異的なプロテアーゼが含まれていることが示される、*in vivo* イメージングに有用であり得る。*in vivo* イメージングは、本開示の活性化可能なタンパク質による治療に適した患者集団を特定するか、または精選するために使用され得る。例えば、試験されている標的と活性化可能なタンパク質のCM内の基質を切断するプロテアーゼとの両方に対して試験で陽性を示した患者（例えば、疾患部位に活性化タンパク質を蓄積する）は、そのようなCMを含むそのような活性化可能なタンパク質による治療に適した候補者として特定される。同様に、試験で陰性であった患者は、別の形態の治療の好適な候補として特定され得る（すなわち、試験される活性化可能なタンパク質による治療に適していない）。いくつかの実施形態では、第1の活性化可能タンパク質に関し

て試験で陰性である、そのような患者は、治療に適した活性化可能タンパク質（例えば、疾患部位で患者によって切断されるCMを含む活性化可能なタンパク質）が特定されるまで、異なるCMを含む他の活性化可能なタンパク質で試験され得る。

【0221】

いくつかの実施形態では、*in situ*イメージングは、どの患者を治療するかを特定する方法に有用であり得る。例えば、*in situ*イメージングでは、活性化可能なタンパク質を使用して、患者試料をスクリーニングし、適切な位置、例えば、腫瘍部位に適切なプロテアーゼ（複数可）及び標的（複数可）を有する患者を特定することができる。いくつかの実施形態では、*in situ*イメージングを使用して、本開示の活性化可能なタンパク質による治療に適した患者集団を特定するか、または精選する。例えば、試験されている標的と活性化可能なタンパク質のCM内の基質を切断するプロテアーゼとの両方に対して試験で陽性であった患者（例えば、疾患部位に活性化抗体を蓄積する）は、そのようなCMを含むそのような活性化可能なタンパク質による治療に適した候補者として特定される。同様に、これらの方法を使用して試験されている活性化可能タンパク質で

使用されるCMを切断する標的及びプロテアーゼのいずれかまたは両方について試験で陰性であった患者は、別の形態の治療の適切な候補として特定される（すなわち、試験される活性化可能なタンパク質による治療に適していない）。いくつかの実施形態では、第1の活性化可能タンパク質に関して試験で陰性である、そのような患者は、治療に適した活性化可能タンパク質（例えば、疾患部位で患者によって切断されるCMを含む活性化可能なタンパク質）が特定されるまで、異なるCMを含む他の活性化可能なタンパク質で試験され得る。

10

20

【実施例】

【0222】

本発明を以下の実施例において更に説明するが、実施例は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定するものではなく、本開示に記載される活性化可能な高分子の有利な構造に対する概念実証を提供するものである。

【0223】

実施例1：活性化可能な二重特異性分子の生成

この実施例は、活性化タンパク質が半減期延長部分（例えば、Fcドメイン）を含まない、例示的な活性化可能な二重特異性タンパク質の生成を示す。二重にマスクされた活性化可能な二重特異性分子を、組換え方法によって調製した。タンパク質は、宿主細胞を3つのポリヌクレオチド：配列番号21（ProC1446の場合）、22（ProC1447の場合）、または23（ProC1448の場合）の配列を有するもの；配列番号1の配列を有するもの；及び配列番号18の配列を有するもの；で形質転換することによって、その後、得られた組換え宿主細胞を培養することによって、調製した。これらのタンパク質は、活性化状態でHER2に特異的に結合するマスクされたFab（AB1）、活性化状態でCD3に特異的に結合するマスクされたscFv（AB2）、及びノブ及びホール変異Fcドメインの対（EM）を含む。これらの活性化可能なタンパク質の構造を図6Aに示す。

30

【0224】

参照分子ProC306及びProC531（上記の例示的な活性化可能二重特異性分子とは異なる配置の、HER2に特異的に結合するFab；CD3に特異的に結合するscFv；ならびにノブ及びホールFcドメインの対；を含む非マスク二重特異性分子）も、組換え方法によって調製した。

40

【0225】

実施例2．活性化可能な二重特異性分子のプロテアーゼ処理

マスキングペプチドを放出するために、実施例1で調製した二重にマスクされた活性化可能な二重特異性結合分子を、マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）またはuPAなどの組換えヒトプロテアーゼを用いて37℃で一晩処理した。SDS-PAGEを減らすことにより、完全なプロテアーゼ処理を試験した。タンパク質アリコート（2 µg）

50

を試料緩衝液（必要に応じて、還元剤を添加）中で75℃にて10分間変性させ、MOP S緩衝液中の4～12% NuPAGE（商標） Bis-Trisゲル（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MAカタログ番号NP0321）にて175Vで1時間分離し、Instant Blue（商標）で1時間染色し、続いて水中で少なくとも4時間脱染色してから可視化した。

【0226】

未処理タンパク質が、還元ゲル中で3つの鎖全てを有することが確認された（図7A及び図7B）。一晚のプロテアーゼ処理後、活性化は不完全であったが、プロテアーゼ生成物の大部分は予想された分子量であった。

【0227】

実施例3：CD3抗原結合ELISA

実施例1で調製した二重マスクされた活性化可能な二重特異性分子がCD3抗原に結合する能力を、CD3結合ELISAを用いて試験した。0.05Mの炭酸-重炭酸塩緩衝液中に溶解させた100μgのCD3e-his抗原（ACRO Biosystems）を、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルに4℃で一晩吸着させた。プレートを洗浄し、ブロッキング緩衝液（1X PBS、pH7.4、0.05% Tween（登録商標）-20、1% BSA）でブロックした。二重マスクされた活性化可能な二重特異性分子を、非マスク参照タンパク質（ProC531）と共にプロテアーゼ処理なしまたはプロテアーゼ処理ありで4倍連続希釈し、抗原コーティングしたプレートに適用した。ペプチドに結合したタンパク質の程度を、抗ヒトIgG（Fab特異的）免疫検出によって測定した。A450の吸光度をプレートリーダーで測定した。Graph Pad Prismソフトウェアを用いたS字状フィットの非線形回帰によって、用量反応曲線を作成し、EC50値を得た。結果を図8に示す。これらの結果は、3つの二重にマスクされた活性化可能な二重特異性分子（ProC1446、ProC1447、及びProC1448）のそれぞれが、マスクを有さない参照二重特異性分子（ProC531）と比較して、及び対応するプロテアーゼ処理された活性化分子と比較して、CD3への結合が減少していることを示すことを実証する。二重にマスクされた活性化可能な二重特異性分子の活性は、uPAでの処理時に、対応する参照二重特異性分子（ProC531）と同じまたはほぼ同じレベルまで回復した。

【0228】

実施例4：二重にマスクされた活性化可能な二重特異性分子のHER2依存性細胞毒性

実施例1で調製した二重マスクされた活性化可能な二重特異性分子のin vitroでの効力を、細胞毒性アッセイで判定した。SKOV3-luc2標的細胞及びヒトPBMCEフェクター細胞（Stemcell technologies）を、1:10の標的対エフェクター細胞比で5%ヒト血清（MP Bioカタログ番号2930949）を添加したRPMI培地（Gibcoカタログ番号22400071）中の共培養物において、一緒にプレーティングした。この共培養物に、インタクトProC1446、ProC1447、及びProC1448、ならびにそれらのプロテアーゼ活性化型（uPA処理したProC1446、uPA処理したProC1447、uPA処理したProC1448）のタイトレーション、ならびに非マスク参照ProC306を添加した。プレートを、37℃及び5%CO₂にて約48時間インキュベートした。インキュベーション後、ONE-Glo（商標）ルシフェラーゼアッセイ系（Promegaカタログ番号E6130）を使用して細胞毒性を評価し、発光をプレートリーダー（TECAN）で測定した。細胞毒性パーセントを以下のように計算した：（1 - （実験RLU / 未処理の平均RLU）） * 100。Graph Pad PRISMを使用して、細胞毒性パーセントデータをプロットし、EC50値を計算した。結果を図9A～図9Cに示す。これらの結果は、3つの二重にマスクされた活性化可能な二重特異性分子（ProC1446、ProC1447、及びProC1448）のそれぞれが、マスクを有さない参照二重特異性分子（ProC306）と比較して、及び対応するプロテアーゼ処理された活性化分子と比較して、細胞毒性が減少していることを示すことを実証する。uPAでの処理後の活性

10

20

30

40

50

化分子の細胞毒性活性は、マスクを有さない参照二重特異性分子（ProC306）よりも強力であった。

【0229】

実施例5：二重マスクされた二重特異性抗体のHer2+NCI-N87、SKOV3及びCD3ε+Jurkat細胞への結合

記載されているHer2及びCD3εマスキングペプチドが二重にマスクされた二重特異性抗体との関連で結合を阻害できるか否かを判定するために、フローサイトメトリーベースの結合アッセイを行った。

【0230】

NCI-N87（ATCC）、SKOV3（ATCC）及びJurkat（クローンE6-1、ATCC、TIB-152）細胞を、RPMI-1640+glutamax（Life Technologies、カタログ72400-047）、10%熱不活性化胎児ウシ血清（HI-FBS、Life Technologies、カタログ10438-026）及びNCI-N87細胞の場合にはピューロマイシン（Gibco、カタログA11138-03、@2ug/ml）中で培養した。以下の二重特異性抗体を試験した：組換えにより生成された活性化SHL1-ProC1963、SHL2-ProC1965、1/2TCB ProC306、ならびにそれらのそれぞれの二重マスクされた活性化可能な二重特異性抗体、ProC1446（SHL1）、ProC3007（SHL2）、ProC3008（SHL2）及びProC1441（1/2TCB）。EM（半減期延長部分）とC末端との間に存在する切断可能な部分（CM）の2つのバージョン、すなわち、ProC3007のCM1対ProC3008のCM2を利用した。

【0231】

NCI-N87及びSKOV3細胞をVersene（商標）（Life Technologies、カタログ15040-066）で分離させ、洗浄し、96ウェルプレートに150,000細胞/ウェルでプレーティングし、50μLの一次抗体（二重特異性抗体）に再懸濁した。Jurkat細胞を計数し、NCI-N87及びSKOV3について説明したようにプレーティングした。図13A～図13Bに示す濃度で開始する一次抗体のタイトレーション、続いて、FACS染色緩衝液+2%FBS（BD Pharmingen、カタログ554656）中の3倍連続希釈のタイトレーションを、細胞に添加した。細胞を振盪しながら4℃で約1時間インキュベートし、回収し、2x200μLのFACS染色緩衝液で洗浄した。細胞を50μLのAlexa Fluor（登録商標）647コンジュゲート抗ヒトIgG、F(ab')₂断片特異的抗体（1.5μg/ml、Jackson ImmunoResearch、カタログ109-605-097）に再懸濁し、約1時間振盪しながら4℃でインキュベートした。細胞を採取し、洗浄し、2.5μg/mlの7-AAD（BD Biosciences、カタログ559925）を含有する最終体積200μLのFACS染色緩衝液中に再懸濁した。二次抗体単独で染色した細胞を、陰性対照として使用した。データをAttun（商標）NxTフローサイトメーターで取得し、生細胞の中央値蛍光強度（MFI）をFlowJo（登録商標）V10.8.1を使用して計算した。生のMFIデータを、GraphPad Prismで曲線フィット分析を用いてグラフ化した。

【0232】

図13A～図13Bは、NCI-N87及びSKOV3細胞への、それぞれ、マスクされた活性化可能な短い半減期抗体、ProC1446（SHL1）、ProC3007（SHL2）、ProC3008（SHL2）、及びマスクされた抗体、ProC1441（1/2TCB、活性化可能ではない、短い半減期抗体）、及び非マスク（ProC1963（SHL1、非マスク、Fcなし）、ProC1965、及びProC306）抗CD3、抗HER2二重特異性抗体、ならびに二次抗体（「Secのみ」、陰性対照）の結合（すなわち、HER2結合）を示す。図13Cは、Jurkat細胞への同じ分子の結合（すなわち、CD3結合）を示す。結果は、マスクされた分子の結合曲線の右シフト（最高濃度でも非常に低い/結合なし）によって表されるように、マスクされた分子の全て

が、それらの対応する非マスク形態と比較して、HER2及びCD3の両方への結合の低減を示したことを示す。EC50値を反復実験から特定した。平均EC50値を以下の表1に示す。

【表1】

表1. 平均EC50

分子ID	分子形態	N87 EC50 (pM)	SKOV3 EC50 (pM)	Jurkat EC50 (pM)
ProC1965	SHL2、非マスク、Fcなし	9396.00	5369.50	2664.67
ProC1963	SHL1、非マスク、Fcなし	4524.50	3678.50	4401.00
ProC3007	SHL2	>1500000	>1500000	>1500000
ProC3008	SHL2	>1500000	>1500000	>1500000
ProC1446	SHL1	>1500000	>1500000	>1500000
ProC306	1/2TCB、非マスク	36755.50	16478.50	9317.67
ProC1441	1/2TCB	>1500000	>1500000	>1500000

10

20

【0233】

結果は、活性化可能な短い半減期形態（SHL1及びSHL2）の非マスク抗HER2、抗CD3 TCBが、対応する非マスク1/2TCB形態と同程度に、CD3及びHER2の結合を示したことを示す。活性化可能な短い半減期形態は、1/2TCB形態と比較して、HER2結合が増加する適度な傾向が観察された。マスクされた活性化可能な短い半減期分子は、マスクされた1/2TCB分子で観察されたものと同程度に、高度に減弱されたHER2及びCD3結合を示した。マスクされた1/2TCB分子（ProC1441）は、図12の左側に示されている分子であるが、EMとFabとの間の第3の切断可能な部分（CM3）（1205）を欠いており、この分子がEMを放出するように切断可能でないことを意味する。

30

【0234】

実施例6：二重にマスクされた活性化可能な二重特異性抗体の生物活性

インタクトの活性化可能な二重特異性抗体、及び組換えにより生成された活性化二重特異性抗体の生物活性を、細胞毒性アッセイを使用してアッセイした。ヒトPBMCをHemaCare Inc (Van Nuys, CA) から購入し、Her2を発現するがん細胞株NCI-N87 (ATCC) またはSKOV3 (ATCC) と、5%熱不活性化ヒト血清 (Sigma、カタログH3667) を添加したRPMI-1640+glutamaxにて10:1の比で共培養した。インタクトProC1446 (SHL1)、ProC3007 (SHL2)、ProC3008 (SHL2)、ProC1441 (1/2TCB) と組換え的に生成された活性化二重特異性抗体ProC1963 (SHL1)、ProC1965 (SHL2)、及びProC306 (1/2TCB) との共培養培地中の図14A～図14B及び図15A～図15Bに示した開始濃度における用量反応、その後、3倍連続希釈を試験した。48時間後、ONE-Glo (商標) ルシフェラーゼアッ

40

50

セイ系（Promega，Madison，WIカタログE6130）を使用して、細胞毒性を評価した。発光は、Infinite（登録商標）M200 Pro（Tecan tting AG、Switzerland）で測定した。細胞毒性パーセントを計算し、GraphPad PRISMで曲線フィット分析を用いてプロットした。

【0235】

図14A及び図14Bは、組換え的に生成された活性化二重特異性タンパク質Proc1963（SHL1）及びProc1965（SHL2）が、用量反応曲線の左シフトによって示されるように、Proc306と比較して、効力が増大している（それぞれ、EC50が1200倍超、及び50倍低い）ことを示す。

【0236】

図15A及び図15Bは、これらのアッセイにおいて、インタクトな二重特異性Proc1446、Proc3007、Proc3008、及びProc1446が、それらの組換え的に生成された活性化バージョンProc1963、及びProc1965と比較して、右にシフトした用量反応曲線によって示されるように、強力にマスクされることを示す。

【0237】

図16A及び図16Dは、これらのアッセイにおいて、インタクトな二重特異性Proc1446、Proc3007、Proc3008及びProc1441が、それぞれ、それらの組換え的に生成された活性化バージョンProc1963、Proc1965、及びProc306と比較して、右にシフトした用量反応曲線によって示されるように、強力にマスクされることを示す。

【0238】

EC50値及びマスクング効率（ME）を反復実験から決定した。結果が以下の表2A及び表2Bに提供される。

【表2A】

表2A. 平均EC50及びマスクング効率

分子ID	分子形態	N87		SKOV3	
		EC50 (pM)	ME	EC50 (pM)	ME
Proc1965	SHL2、 非マスク、 Fcなし	14.46	N/A	1.16	N/A
Proc1963	SHL1、 非マスク、 Fcなし	0.26	N/A	0.03	N/A
Proc3007	SHL2	10487 5.75	6859. 73	>100, 000	ND
Proc3008	SHL2	8729 2.25	8742. 55	>100, 000	ND
Proc1446	SHL1	1104. 05	1893 5.31	291.0 3	1214 7.86

N/A=該当なし

ND=決定されず

【0239】

Proc1963のEC50は、Proc306のEC50よりも約1200～300

0 倍低かった。ProC1965のEC50は、ProC306のEC50よりも50倍低かった。これらの結果は、非マスクの活性化可能な短寿命のTCB形態が、半減期に関して活性化可能ではない、すなわち、EMを放出するように切断可能でない対照（ProC306）と比較して、より高い効力を示すことを示唆している。

【表2B】

表2B. 平均EC50及びマスクング効率

分子ID	分子形態	N87		SKOV3	
		EC50 (pM)	ME	EC50 (pM)	ME
ProC1965	SHL2、 非マスク、 Fcなし	14.46	N/A	1.16	N/A
ProC1963	SHL1、 非マスク、 Fcなし	0.26	N/A	0.03	N/A
ProC3007	SHL2	10487 5.75	6859. 73	>100, 000	ND
ProC3008	SHL2	8729 2.25	8742. 55	>100, 000	ND
ProC1446	SHL1	1104. 05	1893 5.31	291.0 3	1214 7.86
ProC306	1/2TCB 非マスク	736.8 7	N/A	38.4	N/A
ProC1441	1/2TCB	>2,00 0,000	ND	>100, 000	ND

N/A=該当なし

ND=決定されず

【0240】

これらの結果は、マスクングにより、SHL1、SHL2、及び1/2TCBの3つ全ての形態の活性が減弱されたことを示している。

【0241】

実施例7：二重マスクされた二重特異性の活性化可能な抗体ProC3007及びその対応する活性化型ProC1965は、マウスにおける確立されたNCI-N87腫瘍の退縮を誘導した

【0242】

この実施例では、インタクトな活性化可能な二重特異性抗体ProC3007（SHL2TCB）、ProC3008（SHL2TCB）、ProC1441、ならびにHer2及びCD3εを標的とする、組換え的に生成された活性化二重特異性ProC1965を、ヒトPBMCを移植したNOD scidガンマ（NSG）マウスにおける確立されたNCI-N87異種移植片腫瘍の退縮を誘導する能力または増殖を低減する能力について分析した。

【0243】

ヒト胃癌細胞株NCI-N87をATCCから入手し、確立された手順に従って、RPMI+Glutamax+10%FBS中で培養した。精製し、凍結したヒトPBMCを

、Hemacare Inc (Van Nuys, CA) (ドナーID番号D163477;ロット番号22077550)から入手した。NSG (商標) (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) マウスを、The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) から入手した。

【0244】

0日目に、Matrigel (登録商標) を含む100 μ LのRPMI+Glutamax無血清培地中 1×10^6 のNCI-N87細胞を、各マウスの右側腹部に皮下接種した。単一のドナー由来の予め凍結したPBMCを解凍し、7日目にCD3+T細胞と腫瘍細胞の比を1:1で投与(ip)した。腫瘍体積が約125mm³に達した時点で、マウスをランダム化し、処置群に割り当て、表3に従ってi.v.投与した。組換え二重特異性ProC1965 (SHL2形態、非マスク及びFcドメインなし)を週3回投与して、半減期延長(Fc)ドメインの欠如によるクリアランス速度の予想される増加を補った。ProC1965の用量レベルは、分子量の差を考慮するように調整した。腫瘍体積を週2回測定した。0.5mpkのコホートからのマウス1匹は、早期に安楽死させた。その後、21日目及び25日目の時点でのそのコホートはn=7であった。

10

【表3】

表3. NCI-N87異種移植片実験C23-005の群及び用量

群	数	処置	用量 (mg/kg)	投与スケジュール
1	8	PBS+6%スクロース	N/A	QW
2	8	ProC1965	0.15	3回/週
3	8	ProC1965	0.5	3回/週
4	8	ProC3007	0.3	QW
5	8	ProC3007	1.0	QW
6	8	ProC3008	0.3	QW
7	8	ProC3008	1	QW
8	8	ProC1441	1	QW

20

30

【0245】

図17は、初回処置投与後の日数に対する腫瘍体積のプロットである。結果は、インタクトの活性化可能な二重特異性抗体ProC3007及び組換え的に生成産生された活性化二重特異性抗体ProC1965の両方が、それぞれ、1及び0.5mpkでNCI-N87異種移植片腫瘍の退縮を誘導したことを実証する。結果は、本試験では、ProC1965及びProC3007がProC1441よりも効果的であることを示した。ProC3008は、同等用量レベルでProC1441と同様の有効性を有した。

【0246】

第2のin vivo実験を上記のとおりに行ったが、異なるドナー(Hemacare、ドナーID番号D327579、ロット番号21070049)からのPBMCを使用した。本試験では、組換え的に生成された活性化可能な短い半減期の二重特異性抗体(ProC1446)、及びこの活性化型分子(ProC1963、すなわち、ProC1446の構造を有するが、マスク及びFcドメインを欠くもの)の対応する組換え的に生成された活性化バージョンを含む、二重特異性活性化抗体のパネル。ProC1446及びProC1963を表4に記載されるように投与し、ヒトPBMC移植NSGマウスにおける確立されたNCI-N87異種移植腫瘍の退縮を誘導するか、またはその増殖を低減させる能力について評価した。ProC1963及びProC1446は両方とも、本実験で抗腫瘍活性を有するよう見え、したがって、ProC1963は、腫瘍退縮を誘導する能力を保持している。

40

50

【表 4】

表 4：NCI-N87 異種移植実験 C22-014 の用量レベル

群	数	処置	用量 (mg/kg)	投与スケジュール
1	8	PBS+6%スクロース	N/A	QW
2	8	ProC1963	0.2	3回/週
3	8	ProC1963	0.6	3回/週
4	8	ProC1446	0.3	QW
5	8	ProC1446	1.0	QW

N/A=該当なし

【0247】

実施例の分子の配列及び本明細書で開示される他の配列を以下の表 5 に列挙する。

10

20

30

40

50

【表 5 - 1】

表 5

配列番号	名称／注釈	配列
1	HC179 HC_FcK_IgG4_EN (Fcドメインのノブ変異体)	SKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGLGX*
2	Fcドメインのホール変異体	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQV CTLPPS QEEMTKNQVSLSCAVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD DGSFFLVSRRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGLGX*
3	ヒトIgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGX

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

4	ヒト IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ER KCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFP PK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVS VLT TVVHQDWLNGKEYKC KVS NKGLPAPI EKTISKTKGQPREP QVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDI SVEWESNGQPENNYKTTPP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG X
5	ヒト IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVEL KTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPP CPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSC DTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTFRVVS VLT TVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPI EKTISKTKGQPRE PQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDI AVEWESSGQPENNYNTTP PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSP GX

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

6	ヒト IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVES KYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GX*
17	LC149 LC_T ras	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIT SSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
18	LC150 LC_T ras5.17	QGGSGQGALICCSQDVSGLCRWCGGG SSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQD VNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTITSS LPEDFATYYCQQHYTTPPTFGGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

21	HC707 HC_ T r a s - 2 5 - v 6 1 9 h - 2 0 G G - 2 4 - H 4 H E N (P r o C 1 4 4 6 中)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIIYPTNGYTRYADSVKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFSTYAMNWVRQASGK GLEWVGRIRSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARF SGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAE YYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLG GSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGT GSGLSGRSDDHGGGSQGGSGSGY LWGCEWNCGGITTGSSGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGSESKYGPPCP PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT LMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQ PREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK
----	---	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

22	HC708 HC_ T r a s - 2 5 - v 6 1 9 h - M N 1 5 a - 2 4 - H 4 H E N (P r o C 1 4 4 7 の重鎖 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIIYPTNGYTRYADSVKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTTFSTYAMNWVRQASGK GLEWVGRIRSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWW AYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARF SGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAE YYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLG GSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGT GSGLSGRSDDHGGGSQGGSGSNA FRCWWDPQCQPMTGSSGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGSESKYGPPCP PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQ PREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK
----	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

23	HC709 HC_ T r a s - 2 5 - v 6 1 9 h - M N 1 5 b - 2 4 - H 4 H E N (P r o C 1 4 4 8 中)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARITYPTNGYTRYADSVKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVGGGGSGGGG SGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTTFSTYAMNWVRQASGK GLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWW AYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARF SGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAE YYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLG GSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGT GSGLSGRSDDHGGGSQGQSGSAR GLCWWDPPCTHDLGSSGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGSESKYGPPCP PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQ PREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK
----	---	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 7】

24	HC710 HC _T r a s - 25 - v 6 1 9 h - M N 1 5 c - 2 4 - H 4 H E N (P r o C 1 4 4 9 中)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIIYPTNGYTRYADSVKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTCTYTCNV DHKPSNTKVDKRVGGGGSGGGG SGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTTFSTYAMNWVRQASGK GLEWVGRIRSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWW AYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQK PGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARF SGSLIGGKAALTLSGAQPEDEAE YYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVLG GSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGT GSGLSGRSDDHGGGSQGGSGSNH SLCYWDPPCEPSTGSSGGSGGGG SGGGGSGGGGSGGGSESKYGP PCPAPPEFEGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQ PREPQVCTLPSSQEEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK
----	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 8】

27	トラスツズマブFabの重鎖断片	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNV D HKPSNTKVDKRV
28	15個のアミノ酸を有するリンカー	GGGGSGGGGSGGGGS
29	抗CD3 scFv (ProCs 531中、1446~1449)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGTQTVVTQE PSLTVSPGGT VTLTCSRSTGAVTTS NYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLIGGKAALTLSGAQ PEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTK LTVL
30	抗CD3 scFvの重鎖可変領域 (ProCs 531中、1446~1449)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWWAYWGQGTLVTVSS
31	抗CD3 scFvの軽鎖可変領域 (ProCs 531中、1446~1449)	QTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCSR STGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGL IGGTNKRAPGTPARFSGSLIGGKAAL TLSGAQPEDEAEYYCVLWYSNLWV FGGGTKLTVL
32	27個のアミノ酸を有するリンカー	GGSGGSSGASGTGTAGGTGSGSGTG SG

10

20

30

40

50

【表 5 - 9】

33	切断可能な部分 (1204DDH)	LSGRSDDH
34	CD3マスキング部分 (20GG、ProC1466中)	GYLWGCEWNCGGITT
35	CD3マスキング部分 (MN15a、ProC1447中)	NAFRCWWDPPCQPMT
36	CD3マスキング部分 (MN15b、ProC1448中)	ARGLCWWDPPCTHDL
37	CD3マスキング部分 (MN15c、ProC1449中)	NHSLCYWDPPCEPST
38	24個のアミノ酸を有するリンカー	GSSGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGS
40	F5.17マスキング部分 (トラスツブマブFabのマスク)	ALICCSDVSGLCRWC
41	切断可能な部分 (1490)	ISSGLLSGRSDNH
42	hIgG4 S228P及びL235E CH1-Fc	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP VTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYT LPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGX*

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 0】

4 3	I g G 4 - E N K i H S S - H 鎖 F c のみ	SKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSQEE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSRLLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLGX*
4 4	I g G 4 - E N K i H S S - K 鎖 - F c のみ	GPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLGX*
4 5	I g G 1 K i H S S - H 鎖 F c のみ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPSPRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGX

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 1】

46	I g G 1 K i H S S -K鎖-F cのみ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GX
597	P r o C 3 0 6 : v 6 19_HLh_Tra s 1/2 TCB	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWWAYWGQGT LVT VSS GGGGSGGGGSGGGGSGT VVT QEP SL TVSPGGT VTL TCGSSTGAVTTSNYV NWVQQKPGQAPRGL IGGTNKRAPGT PARFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGT LVT VSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPCPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVK

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 2】

		GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSRLLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGLX
598	ProC306:v 619_HLh_T ras1/2TCB (HC_FcK_I gG4_EN)	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLX
599	ProC306:v 619_HLh_T ras1/2TCB (LC_Tras)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQHY TTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
600	ProC531:v 619_hh9_T ras1/2TCB (HC_v619 _hh9_Tras 1/2TCB)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLE WVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNSLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYW GQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGG GSQTVVTQEPSLTVSPGG

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 3】

		TVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPA RFSGSLIGGKAALTLSGAQPEDE AEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTV LGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARITYPTNGYTRYADS VKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFEFGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKA KGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLG X
601	Proc531: v 619_hh9_T ras1/2TCB (HC_FcK_I gG4_EN)	GSSKYGPCCPPCPAPEFEFGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG X

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 4】

602	Pr oC531 : v6 19_hh9_Tra s1/2TCB (LC_Tra s)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLT SSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
603	Pr oC1965 : v 619h-5-Tra s-noFc (SHL 2の非マスク、Fcな し形態) (PP_v619h- 5-Tra s-noF c)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWWAYWGQGT LVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSGQTVVTQEPSL TVSPGGTVTLTLCGSSTGAVTTSNYV NWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGT PARFSGSLIGGKAALTLGAQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARITYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
604	Pr oC1965 : v 619h-5-Tra s-noFc (SHL 2の非マスク、Fcな し形態) (LC_Tr a s)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLT SSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQS

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 5】

		GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
605	ProC1963:Tras-25-v619h-noFc (SHL1の非マスク/Fcなしの形態) (PP_Tras-25-v619h-noFc)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTKT YTCNVDHKPSNTKVDKRVGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LKLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQASG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTG AVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGG GTKLTVL
606	ProC1963:Tras-25-v619h-noFc (SHL1の非マスク/Fcなしの形態) (LC_Tras)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS SSLQPEDFATYYCQQHYTTPTEFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 6】

607	Proc3007: 20GG-GL12 04DDH-v61 9h-5mr-F 5.17-Tras -1490DNI- SHL2-TCB (HC_20GG- GL1204DDH -v619h-5m r-Tras-14 90DNI-FcH 4EN)	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSS SGGSGGSGGLSGRSDDHGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVG RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIG GKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSEV QLVESSGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTLV VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPPSSSLGTKTYTCNVDPK SNTKVDKRVESKYGGGSSGGSSIS SGLLSGRSDNIGGGSGPPCPCPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPRE PQVCTLPSPQEEMTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLVSRLLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGX
-----	--	--

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 7】

608	Proc3007 : 20GG-GL12 04DDH-v61 9h-5mr-F 5.17-Trans -1490DNI- SHL2-TCB (HC_FcK_I gG4_EN)	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLX
609	Proc3007 : 20GG-GL12 04DDH-v61 9h-5mr-F 5.17-Trans -1490DNI- SHL2-TCB (LC_Trans 5.17)	QGQSGQGALICCSDVSGLCRWCG GGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQH YTPPTFTGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 8】

610	Proc3008 : 20GG-GL12 04DDH-v61 9h-5mr-F 5.17-Tras -1406-SHL 2-TCB (HC_20GG- GL1204DDH -v619h-5m r-Tras-14 06-FcH4E N)	QGQSGSGYLWGCEWNCGGIT TGS SGGSGGSGGLSGRSDDHGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASG FTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVG RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQG TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGGSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTTSNYVNWVQQKPGQAPR GLIGGTNKRAPGTPARFSGSLIG GKAALTLSGAQPEDEAEYYCVLW YSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTIS ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSSLGTKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGGGSSGGGAP RSALAHGLFGGGSGPPCPPCPAP EFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQ VCTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSRLLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGX
-----	---	--

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 9】

6 1 1	Pr o C 3 0 0 8 : 2 0 G G - G L 1 2 0 4 D D H - v 6 1 9 h - 5 m r - F 5 . 1 7 - T r a s - 1 4 0 6 - S H L 2 - T C B (H C _ F c K _ I g G 4 _ E N)	G S S K Y G P P C P P C P A P E F E G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P C Q E E M T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G X
6 1 2	Pr o C 3 0 0 8 : 2 0 G G - G L 1 2 0 4 D D H - v 6 1 9 h - 5 m r - F 5 . 1 7 - T r a s - 1 4 0 6 - S H L 2 - T C B (L C _ T r a s 5 . 1 7)	Q G Q S G Q G A L I C C S D V S G L C R W C G G G S S G G S I S S G L L S G R S D N H G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
6 1 3	Pr o C 1 4 4 1 : 2 0 G G - v 6 1 9 h - F 5 . 1 7 - T r a s - H a l f T C B	Q G Q S G S G Y L W G C E W N C G G I T T G S S G G S G G S G G L S G R S D D H G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S T Y A M N W V R Q A S G K G L E W V G R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T A Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y V S W W A Y W G Q G T L V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T T S N Y V N W V Q Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L I G G K A A L T L S G A Q P E D E A E Y Y C V L W Y S N R W V F G G G T K L T V L G G G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 0】

		GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAM DYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSQEEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLGX	10
614	Proc1441: 20GG-v619 h-F5.17-T ras-Half TCB (HC_FcK_I gG4_EN)	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGX	30

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 1】

615	ProC1441:2 0GG-v619h- F5.17-Trans -Half TCB (LC_Trans. 17)	QQQSGQGALICCSDVSGLCRWCGGG SSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQD VNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
616	ProC1446:F 5.17-Trans- 25-v619h-2 0GG-24-Hal f TCB (HC_Trans-2 5-v619h-20 GG-24-H4HE N)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTTLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCT YTCNVDHKPSNTKVDKRVGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LKLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQASG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTG AVTTSNYVNWVQQKPGQAPRGLIGG TNKRAPGTPARFSGSLIGGKAALTL SGAQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGG GTKLTVLGGSGGSSGASGTGTAGGT GSGSGTGSGLSGRSDDHGGGSQGQS GSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGG GGSGGGGSGGGGSGGSESKYGPPCP PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 2】

		LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQ PREPQVCTLPSPQEEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLX
617	ProC1446 : F5. 17-Tra s-25-v619 h-20GG-24 -Half TCB (HC_FcK_I gG4_EN)	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLX
618	ProC1446 : F5. 17-Tra s-25-v619 h-20GG-24 -Half TCB (LC_Tras 5. 17)	QGQSGQGALICCSDVSGLCRWCG GGSSGGSISSGLLSGRSDNHGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 3】

619	Proc1447 : F5. 17-Tra s-25-v619 h-MN15a-2 4-Half TC B (HC_Tras- 25-v619h- MN15a-24- H4HEN)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARITYPTNGYTRYADSVKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTCTYTCNV DHKPSNTKVDKRVGGGGSGGGG SGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQ ASGKGLEWVGRIRSKYNNYATY YADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYVSWWAYWGQGT LVTVSSG GGGSGGGGSQTVVTQEP SLTV SPGGTVTLTCGSSTGAVTTSN YVNWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGTPARFSGSLIGGKAALT LSGAQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGSGGGSSGAS GTGTAGGTGSGSGTGSGLSGRS DDHGGGSQGGSGSNAFRCWWD PPCQPMTGSSSGSGGGGSGG GSGSGGGSGGGSGGGSESKYGP PCPPAPEFEFGGPSVFLFPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLT VLVHQA DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTI SKAKGQPREPQVCTLPSP SQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSF FLVSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGX
-----	---	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 4】

620	Pr oC1447 : F 5. 17-Tr a s- 25-v619h-M N15a-24-Ha 1 f TCB (HC_FcK_I g G4_EN)	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQ PREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGX
621	Pr oC1447 : F 5. 17-Tr a s- 25-v619h-M N15a-24-Ha 1 f TCB (LC_Tr a s 5. 17)	QQQSGQGALICCSDVSGLCRWCGGG SSGGSISSGLLSGRSDNHGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQD VNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
622	Pr oC1448 : F 5. 17-Tr a s- 25-v619h-M N15b-24-Ha 1 f TCB (HC_Tr a s-2 5-v619h-MN 15b-24-H4H EN)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDPKPSNTKVDKRVGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LKLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQASG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTED TAVYYCVRHGNFG

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 5】

		NSYVSWWAYWGQGT LVT VSSGGG GSGGGGSGGGGSQT VVT QEPSLT VSPGGTVTLT CGSSTGAVTTSNY VNWVQQKPGQAPRGL IGGTNKRA PGTPARFSGSL IGGKAALTL SGA QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG TKLTVLGGSGGSSGASGTGTAGG TGSGSGTGSGLSGRSDDHGGGSQ GQSGSARGLCWWDPPCTHDLGSS GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSES KYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPPSQEEM TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGLX
623	ProC1448 : F5. 17-Tra s-25-v619 h-MN15b-2 4-Half TC B (HC_FcK_ IgG4_EN)	GSSKYGPPCPPCPAPEFEGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLX

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 6】

6 2 4	Pr o C 1 4 4 8 : F 5 . 1 7 - T r a s - 2 5 - v 6 1 9 h - M N 1 5 b - 2 4 - H a l f T C B (L C _ T r a s 5 . 1 7)	Q G Q S G Q G A L I C C S D V S G L C R W C G G G S S G G S I S S G L L S G R S D N H G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C
6 2 5	Pr o C 3 0 6 : v 6 1 9 _ H L h _ T r a s 1 / 2 T C B (v 6 1 9 _ H L h)	G A A G T T C A G C T T G T T G A A T C T G G C G G C G G A C T G G T T C A G C C T G G C G G A T C T C T G A A A C T G A G C T G T G C C G C C A G C G G C T T C A C C T T T A G C A C C T A C G C C A T G A A C T G G G T C C G A C A G G C C T C T G G C A A A G G C C T G G A A T G G G T C G G A C G G A T C A G A A G C A A G T A C A A C A A C T A C G C C A C C T A C T A C G C C G A C A G C G T G A A G G A C A G A T T C A C C A T C A G C C G G G A C G A C A G C A A G A A C A C C G C C T A C C T G C A G A T G A A C A G C C T G A A A A C C G A G G A C A C C G C C G T G T A C T A C T G T G T G C G G C A C G G C A A C T T C G G C A A C A G C T A T G T G T C T T G G T G G G C C T A T T G G G G C C A G G G C A C A C T G G T T A C A G T T A G C T C T G G T G G C G G A G G A T C T G G C G G A G G T G G A A G C G G C G G A G G C G G T T C T C A A A C A G T G G T C A C A C A A G A G C C C A G C C T G A C C G T T T C T C C T G G C G G A A C A G T G A C C C T G A C A T G C G G A T C T T C T A C A G G C G C C G T G A C C A C C A G C A A C T

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 7】

		ATGTGAATTGGGTGCAGCAGAAGCCC GGACAGGCTCCTAGAGGACTGATCGG CGGCACCAACAAAAGAGCCCCCTGGAA CACCAGCCAGGTTCAGCGGCTCTCTG ATCGGAGGAAAAGCCGCTCTGACACT GTCTGGCGCTCAGCCTGAAGATGAGG CCGAGTACTATTGCGTGCTGTGGTAC AGCAACAGATGGGTGTTCCGGAGGCGG CACAAAGCTGACAGTGCTTGGCGGTG GCGGTAGCGAAGTTCAGCTGGTGGAG AGTGGTGGGGGGCTGGTTCAGCCTGG CGGTTCGCTCAGGCTGTTCATGCGCAG CGAGCGGGTTCAACATCAAGGACACG TATATCCATTGGGTGAGACAGGCCCC CGGGAAGGGCCTCGAATGGGTGCAA GGATTTATCCTACTAACGGGTACACA AGGTATGCTGACAGTGTGAAGGGGCG GTTCACAATTTCCGCCGATACTTCTA AGAATACTGCTTACCTCCAGATGAAC TCCCTGAGGGCCGAGGACACTGCCGT TTACTACTGCTCCCGCTGGGGAGGAG ACGGCTTTTATGCTATGGATTATTGG GGTCAAGGCACTCTAGTCAACCGTGAG TAGTGCTAGCACAAAGGGCCCCAGCG TGTTCCCTCTGGCTCCTTGTAGCAGA AGCACCAAGCGAGTCTACAGCCGCTCT GGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTC CCGAGCCTGTGACCGGTGTCCTGGAAT AGCGGAGCACTGACCAGCGGCGTGCA CACATTTCCAGCCGTGCTGCAAAGCA GCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTG GTCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGG CACCAAGACCTACACCTGTAATGTGG ACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTG
--	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 8】

		GACAAGCGCGTGGAATCTAAGTACGG CCCTCCTTGTCCTCCATGTCCTGCTC CAGAGTTTGAAGGCGGCCCTTCCGTG TTCCTGTTTCCCTCCAAAGCCTAAGGA CACCCCTGATGATCAGCAGAACCCTG AAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTT TCCCAAGAGGACCCTGAGGTGCAGTT CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGA GAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAG AGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGC ACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGG CCTGCCTAGCAGCATCGAGAAAACCA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGC GAACCTCAAGTCTGTACACTGCCTCC TAGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACC AGGTGTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAG GGCTTTTACCCTTCCGATATCGCCGT GGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAG AGAACAAC TACAAGACAACCCCTCCT GTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT CCTGGTGTCCAGACTGACCGTGGACA AGAGCAGATGGCAAGAGGGCAACGTG TTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CTCTGAGCCTGTCTCTGGGCNNN
626	Pr o C306 : v 6 19_HLh_T r a s 1 / 2 TCB (HC_F c K_I g G4_EN)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCCTTG TCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGTTTG AAGGCGGCCCTTCCGTGTTCTCTGTTT CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGAT GATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCT GCGTGGTGGTGGACGTGTCCAAGAG GATCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTA

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 9】

		CGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAG TTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATT GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAG CAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCAAGAGAACCCAG GTGTACACACTGCCTCCATGCCAAGA GGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTAC CCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGA GAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAAC ACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGAC AGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAG CAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGAT GGCAAGAGGGCAACGTGTTTCAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCC TGAGCCTGGGCNNN	10
627	ProC306: v6 19_HLh_Tra s1/2TCB (LC _Tra s)	GATATTTCAGATGACACAGAGCCCCAG CAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACA GAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGC CAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTG GTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCC CTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGC TTTCTGTACAGCGGCGTGCCAGCAG ATTCAGCGGCTCTAGAAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACCATAAGCAGTCTG CAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTA CTGTCAGCAGCACTACACCACACCTC CAACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTG GAAATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCC TAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCG ACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCC TCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTT	30

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 0】

		CTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAATAGCCAAGAGAGCGTGACCGA GCAGGACAGCAAGGACTCTACCTACA GCCTGAGCAGCACCCCTGACACTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGT GTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGG GCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGC TTCAACCGGGGCGAATGT
628	ProC531: v6 l9_hh9_Tra s1/2TCB HC (v6l9_h h9_Tra s1/2 TCB)	GAAGTTCAGCTTGTTGAATCTGGCGG CGGACTGGTTTCAGCCTGGCGGATCTC TGAAACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGC TTCACCTTTAGCACCTACGCCATGAA CTGGGTCCGACAGGCCTCTGGCAAAG GCCTGGAATGGGTCTGGACGGATCAGA AGCAAGTACAACAACCTACGCCACCTA CTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGAT TCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAG AACACCGCCTACCTGCAGATGAACAG CCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGT ACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTC GGCAACAGCTATGTGTCTTGGTGCGC CTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTTA CAGTTAGCTCTGGTGGCGGAGGATCT GGCGGAGGTGGAAGCGGCGGAGGCGG TTCTCAAACAGTGGTCACACAAGAGC CCAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGA ACAGTGACCCTGACCTGTAGATCTTC TACAGGCGCCGTGACCACCAGCAATT ACGCCAATTGGGTGCAGCAGAAGCCC GGACAGGCTCCTAGAGGACTGATCGG CGGCACCAACAAAAGAGCCCTGGAA CACCAGCCAGGTTCAGCGGCTCTCTG ATCGGAGGAAAAGCCGCTCTGACACT GTCTGGCGCTCAGCCTGAAGATGAGG CCGAGTACTATTGCGTGCTGTGGTAC

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 1】

		AGCAACCTGTGGGTGTTTCGGAGGCGG CACAAAGCTTACAGTGCTTGGAGGTG GCGGCAGCGAGGTGCAACTTGTGAG TCAGGCGGAGGCCTTGTGCAACCTGG TGGTAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCG CTTCTGGCTTCAACATCAAGGACACC TACATCCACTGGGTTCGACAAGCTCC AGGCAAGGGCCTTGAGTGGGTGCCA GAATCTACCCACCAACGGCTACACC AGATACGCCGACTCTGTGAAAGGCCG GTTCACCATCTCTGCCGACACCTCTA AGAATACTGCCTATCTCCAAATGAAC TCCCTGAGAGCCGAGGATACAGCCGT CTATTACTGCAGCAGATGGGGAGGCG ACGGCTTTTACGCCATGGATTACTGG GGACAGGGAACCCTGGTCAACCGTGTC CTCTGCTAGCACAAAGGGGCCCCAGCG TGTTCCCTCTGGCTCCTTGTAGCAGA AGCACAGCGAGTCTACAGCCGCTCT GGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTC CCGAGCCTGTGACCGGTGTCCTGGAAT AGCGGAGCACTGACCAGCGGCGTGCA CACATTTCCAGCCGTGCTGCAAAGCA GCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTG GTCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGG CACCAAGACCTACACCTGTAATGTGG ACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTG GACAAGCGCGTGGAATCTAAGTACGG CCCTCCTTGTCTCCTCCATGTCCTGCTC CAGAGTTTGAAGGCGGCCCTTCCGTG TTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGA CACCTTGATGATCAGCAGAACCCTG AAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTT TCCCAAGAGGACCCTGAGGTGCAGTT CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG
--	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 2】

		TGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGA GAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAG AGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGC ACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGG CCTGCCTAGCAGCATCGAGAAAACCA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGC GAACCTCAAGTCTGTACACTGCCTCC TAGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACC AGGTGTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAG GGCTTTTACCCTTCCGATATCGCCGT GGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAG AGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCT GTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTT CCTGGTGTCCAGACTGACCGTGGACA AGAGCAGATGGCAAGAGGGCAAACGTG TTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CTCTGAGCCTGTCTCTGGGCNNN
629	ProC531: v6 19_hh9_Tra s1/2TCB HC (HC_FcK _IgG4_EN)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCCTTG TCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGTTTG AAGGCGGCCCTTCCGTGTTCTCTGTTT CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGAT GATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCT GCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAG GATCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTA CGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAG TTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATT GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAG CAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCAAGAGAACCCAG GTGTACACACTGCCTCCATGCCAAGA

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 3】

		GGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTAC CCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGA GAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAAC ACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGAC AGCGACGGCTCATTCCTTCTGTACAG CAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGAT GGCAAGAGGGCAACGTGTTTCAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCC TGAGCCTGGGCGNN
630	Proc531: v6 19_hh9_Tra s1/2TCB HC (LC_Tra s)	GATATTCAGATGACACAGAGCCCCAG CAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACA GAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGC CAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTG GTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCC CTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGC TTTCTGTACAGCGGCGTGCCCAGCAG ATTCAGCGGCTCTAGAAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACCATAAGCAGTCTG CAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTA CTGTCAGCAGCACTACACCACACCTC CAACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTG GAAATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCC TAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCG ACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCC TCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACCTT CTACCCCGAGAGAAGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAATAGCCAAGAGAGCGTGACCGA GCAGGACAGCAAGGACTCTACCTACA GCCTGAGCAGCACCCCTGCACTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGT GTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGG GCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGC TTCAACCGGGGCGAATGT

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 4】

631	ProC1965 : v 619h-5-Tra s-noFc (SHL 2の非マスク、Fcな し形態) (PP_v619h- 5-Tra s-noFc c)	GAAGTTCAGCTTGTTGAATCTGGCG GCGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATC TCTGAAACTGAGCTGTGCCGCCAGC GGCTTCACCTTTAGCACCTACGCCA TGAAGTGGGTCCGACAGGCCTCTGG CAAAGGCCTGGAATGGGTCTGGACGG ATCAGAAGCAAGTACAACAACCTACG CCACCTACTACGCCGACAGCGTGAA GGACAGATTCAACCATCAGCCGGGAC GACAGCAAGAACACCGCCTACCTGC AGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGTGTGCGG CACGGCAACTTCGGCAACAGCTATG TGTCTTGGTGGGCCTATTGGGGCCA GGGCACACTGGTTACAGTTAGCTCT GGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTG GAAGCGGCGGAGGCGGTTCTCAAAC AGTGGTTCACACAAGAGCCCAGCCTG ACCGTTTCTCCTGGCGGAACAGTGA CCCTGACATGCGGATCTTCTACAGG CGCCGTGACCACCAGCAACTATGTG AATTGGGTGCAGCAGAAGCCCGGAC AGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGG CACCAACAAAAGAGCCCCTGGAACA CCAGCCAGGTTTCAGCGGCTCTCTGA TCGGAGGAAAAGCCGCTCTGACACT GTCTGGCGCCCAGCCAGAAGATGAG GCCGAGTACTATTGCGTGCTGTGGT ACAGCAACAGATGGGTGTTCTGGAGG CGGCACAAAGCTGACAGTTCTTGGA GGCGGAGGAAGTGAAGTGCAGCTGG TGGAAAGCGGTGGTGGACTTGTTCA ACCAGGCGGCAGCCTGAGACTGTCT TGTGCCGCTTCTGGCTTCAACATCA AGGACACCTACATCCACTGGGTTCG ACAAGCTCCAGGCAAGGGCCTTGAG TGGGTGCCA
-----	---	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 5】

		GAATCTACCCACCAACGGCTACACC AGATACGCCGACTCTGTGAAGGGCCG CTTCACAATCTCTGCCGACACCTCCA AAAACACAGCCTATCTCCAAATGAAC TCCCTGAGAGCCGAGGATACAGCCGT CTATTACTGCAGCAGATGGGGAGGCG ACGGCTTTTACGCCATGGATTACTGG GGACAGGGAACCCTGGTCACCGTGTC TAGCGCCTCTACAAAGGGCCCTAGCG TGTTCCCTCTGGCTCCCTGTAGCAGA AGCACCAGCGAATCTACAGCTGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTC CTGAGCCTGTGACCGGTGTCCTGGAAC AGCGGAGCACTGACATCTGGCGTGCA CACCTTTCCAGCCGTGCTGCAAAGCA GCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTG GTCACAGTGCCCTAGCTCTAGCCTGGG CACCAAGACCTACACCTGTAATGTGG ACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTG GACAAGAGAGTC
632	Proc1965: v 619h-5-Tras-noFc (SHL 2の非マスク、Fcなし形態) (LC_Tras)	GATATTCAGATGACACAGAGCCCCAG CAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACA GAGTGACCATCACCTGTAGAGCCAGC CAGGACGTGAACACAGCCGTGGCTTG GTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCC CTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGC TTTCTGTACAGCGGCGTGCCCAGCAG ATTCAGCGGCTCTAGAAGCGGCACCG ACTTCACCCTGACCATAAGCAGTCTG CAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTA CTGTCAGCAGCACTACACCACACCTC CAACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTG GAAATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCC TAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCG ACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCC

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 6】

		TCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTT CTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGT GGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAATAGCCAAGAGAGCGTGACCGA GCAGGACAGCAAGGACTCTACCTACA GCCTGAGCAGCACCCCTGACACTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGT GTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGG GCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGC TTCAACCGGGGCGAATGT
633	ProC1963: T ras-25-v61 9h-noFc (SH L1の非マスク/Fc なしの形態)	GAAGTTCAGCTTGTTGAATCTGGCGG CGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTC TGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGC TTCAACATCAAGGACACCTACATCCA CTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAG GACTTGAATGGGTGCGCCAGAATCTAC CCCACCAACGGCTACACCAGATACGC CGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCA TCAGCGCCGACACCAGCAAGAACACC GCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTTCTAGATGGGGAGGCGACGGCTTC TACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGG CACCCTGGTCACAGTGTCTAGCGCCT CTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCA CTGGCTCCCTGTAGCAGAAGCACCCAG CGAATCTACAGCCGCTCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTTTCCTGAGCCT GTGACCGTGTCTCTGGAACCTCTGGCGC TCTGACATCTGGCGTGCACACCTTTC CAGCCGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTG TACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGT GCCTAGCAGCTCTCTGGGCACCAAGA CCTACACCTGTAATGTGGACCACAAG CCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 7】

		AGTTGGCGGAGGCGGATCAGGTG GCGGAGGAAGCGGAGGCGGCGGA TCTGAAGTTCAACTGGTGGAAAG CGGCGGAGGCCTTGTGCAACCTG GTGGCAGTCTGAAACTGAGCTGT GCCGCCTCTGGCTTTCACCTTCAG CACATACGCCATGAATTGGGTTC GACAAGCCAGCGGCAAGGGCCTC GAATGGGTGGAAGAATCAGAAG CAAGTACAACAACCTACGCCACCT ACTACGCCGACAGCGTGAAGGAT CGGTTTACCATCAGCCGGGACGA CTCCAAGAATACTGCCTATCTCC AAATGAACTCCCTCAAGACCGAG GATACAGCCGTCTATTACTGCGT GCGGCACGGCAACTTCGGCAACA GCTATGTGTCTTGGTGGGCCTAC TGGGGACAGGGAAACACTGGTTAC TGTGTCCAGTGGCGGTGGTGGAA GTGGCGGCGGAGGATCAGGCGGT GGCGGTCTCTCAAACAGTGGTCAC CCAAGAGCCTAGCCTGACAGTGT CTCCTGGCGGAACCGTGACACTG ACATGTGGCAGTTCTACAGGCGC CGTGACCACCAGCAACTACGTGA ACTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGC CAGGCTCCTAGAGGACTGATCGG AGGCACCAACAAGAGAGCCCCTG GAACACCAGCCAGATTCTCCGGC TCTCTGATCGGCGGAAAAGCCGC ACTGACACTGTCTGGTGCTCAGC CTGAGGATGAGGCCGAGTACTAT TGCGTGCTGTGGTACAGCAACAG ATGGGTGTTCCGGCGGAGGGACCA AGCTGACAGTGCTT
--	--	--

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 8】

634	Proc1963 : Tras-25-v 619h-noFc (SHL1の非マス ク/Fcなしの形 態) (LC_Tras)	GATATTCAGATGACACAGAGCCC CAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGG GAGACAGAGTGACCATCACCTGT AGAGCCAGCCAGGACGTGAACAC AGCCGTGGCTTGGTATCAGCAGA AGCCTGGCAAGGCCCTAAGCTG CTGATCTACAGCGCCAGCTTTCT GTACAGCGGCGTGCCTCAGCAGAT TCAGCGGCTCTAGAAGCGGCACC GACTTCACCCTGACCATAAGCAG TCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCA CCTACTACTGTCAGCAGCACTAC ACCACACCTCCAACCTTTGGCCA GGGCACCAAGGTGGAAATCAAGC GGACAGTGGCCGCTCCTAGCGTG TTCATCTTTCCACCTAGCGACGA GCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCT CTGTCGTGTGCCTGCTGAACAAC TTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGT GCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCC TGCAGAGCGGCAATAGCCAAGAG AGCGTGACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCTACCTACAGCCTGAGCA GCACCCTGACACTGAGCAAGGCC GACTACGAGAAGCACAAAGTGTA CGCCTGCGAAGTGACCCACCAGG GCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAG AGCTTCAACCGGGGCGAATGT
-----	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 9】

635	Proc3007:2 0GG-GL1204 DDH-v619h- 5mr-F5.17- Tras-1490D NI-SHL2-TC B (HC_20GG-G L1204DDH-v 619h-5mr-T ras-1490DN I-FcH4EN)	CAAGGACAATCTGGCTCTGGCTATC TGTGGGGCTGCGAGTGGAATTGTGG CGGCATCACAAACAGGCTCTAGCGGC GGAAGCGGAGGATCTGGTGGACTGT CTGGCAGATCCGATGATCACGGCGG ATCTGAGGTGCAGCTGGTGGAAATCT GGCGGAGGACTTGTTCAGCCTGGCG GCTCTCTGAAGCTGTCTTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTTAGCACCTAC GCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCT CTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTCCG ACGGATCAGAAGCAAGTACAACAAC TACGCCACCTACTACGCCGACAGCG TGAAGGACAGATTACCATCAGCCG GGACGACAGCAAGAACACCGCCTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCG AGGACACCGCCGTGTACTACTGTGT GCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGC TATGTGTCTTGGTGGGCCTATTGGG GCCAGGGCACACTGGTTACAGTTAG CAGTGGCGGCGGAGGTAGTGGCGGA GGTGGCAGCGGAGGCGGTGGATCTC AAACAGTGGTCACCCAAGAGCCTAG CCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAACC GTGACACTGACATGCGGATCTTCTA CAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTA TGTGAATTGGGTGCAGCAGAAGCCC GGACAGGCTCCTAGAGGACTGATCG GAGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGG AACACCAGCCAGATTTCAGCGGATCT CTGATCGGCGGAAAGGCCGCTCTGA CACTTTCTGGTGCCCAGCCTGAAGA TGAGGCCGAGTACTATTGCGTGCTG TGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCTG GAGGCGGCACCAAGCTGACAGTTCT TGGAGGCGGAGGCAGCGAAGTCCAG CTGGTTGAAA
-----	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 4 0】

		GCGGTGGTGGCCTGGTCCAACCAGGT GGAAGTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC TTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCT ACATCCACTGGGTTCGACAAGCTCCA GGCAAGGGCCTTGAGTGGGTGCCAG AATCTACCCACCAACGGCTACACCA GATACGCCGACTCTGTGAAAGGCCGG TTCACCATCTCTGCCGACACCTCCAA AAACACAGCCTATCTCCAAATGAACT CCCTGAGAGCCGAGGATACAGCCGTC TATTACTGCAGCAGATGGGGAGGCGA CGGCTTTTACGCCATGGATTACTGGG GACAGGGAACCCTGGTCACCGTGTCT AGCGCCTCTACAAAGGGCCCTAGCGT GTTCCCTCTGGCTCCCTGTAGCAGAA GCACCAGCGAATCTACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCC TGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAACCT CTGGCGCTCTTACAAGCGGCGTGAC ACCTTTCCAGCCGTGCTGCAAAGCAG CGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGG TCACAGTGCCCTAGCTCTAGCCTGGGC ACAAAGACCTACACCTGTAATGTGGA CCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGG ACAAGCGCGTGGAATCTAAGTACGGC GGAGGAAGCTCTGGCGGCAGCATCTC TTCTGGACTGCTGAGCGGCAGAAGCG ACAATATCGGCGGAGGCTCTGGACCT CCTTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGA GTTTGAAGGCGGCCCTTCCGTGTTCC TGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACC CTGATGATCAGCAGAACCCTGAAGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCC AAGAGGATCCAGAGGTGCAGTTCAAT TGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA
--	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 4 1】

		CAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGG AACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTG GTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTG CCTAGCAGCATCGAGAAAACCATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAAC CTCAAGTCTGTACACTGCCTCCTAGC CAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCT TTTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAA CAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGC TGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTG GTGTCCAGACTGACCGTGGACAAGAG CAGATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGTCTCT GAGCCTGTCTCTGGGCNNN
636	ProC3007:2 0GG-GL1204 DDH-v619h- 5mr-F5.17- Tras-1490D NI-SHL2-TC B (HC_FcK_Ig G4_EN)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCCTTG TCCTCCATGTCTGCTCCAGAGTTTG AAGGCGGCCCTTCCGTGTTCTCTGTTT CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGAT GATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCT GCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAG GATCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTA CGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAG TTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATT GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAG CAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCAAGAGAACCCAG

10

20

30

40

50

【表 5 - 4 2】

		GTGTACACACTGCCTCCATGCCAAGA GGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTAC CCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGA GAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACT ACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGAC AGCGACGGCTCATTTCTTCCTGTACAG CAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGAT GGCAAGAGGGCAACGTGTTTCAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCC TGAGCCTGGGCNNN
637	Proc3007:2 OGG-GL1204 DDH-v619h- 5mr-F5.17- Tras-1490D NI-SHL2-TC B (LC_Tras 5.17)	CAAGGACAATCTGGACAAGGCGCCCT GATCTGCTGTTCCGATGTGTCTGGAC TGTGCCGTTGGTGCGGCGGAGGATCT TCTGGCGGCTCTATCTCTTCTGGCCT GCTGAGCGGCAGAAAGCGACAATCACG GCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACA CAGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCAG CGTGGGAGACAGAGTGACCATCACAT GTAGAGCCAGCCAGGACGTGAACACA GCCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCC TGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCT ACAGCGCCAGCTTTCTGTACAGCGGC GTGCCCAGCAGATTCAGCGGCTCTAG AAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCA TAAGCAGTCTGCAGCCCGAGGACTTC GCCACCTACTACTGTTCAGCAGCACTA CACCACACCTCCAACCTTTGGCCAGG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACA GTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTT TCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGT CTGGCACAGCCTCTGTCTGTGCTG CTGAACAACCTTCTACCCAGAGAAGC CAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG

10

20

30

40

50

【表 5 - 4 3】

		CCCTGCAGTCCGGCAATAGCCAAGAG AGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCTACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGT GACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTG TGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAA TGT
638	Pr o C 3 0 0 8 : 2 0 G G - G L 1 2 0 4 D D H - v 6 1 9 h - 5 m r - F 5 . 1 7 - T r a s - 1 4 0 6 - S H L 2 - T C B (H C _ 2 0 G G - G L 1 2 0 4 D D H - v 6 1 9 h - 5 m r - T r a s - 1 4 0 6 - F c H 4 E N)	CAAGGACAATCTGGCTCTGGCTATCT GTGGGGCTGCGAGTGGAATTGTGGCG GCATCACAAACAGGCTCTAGCGGCGGA AGCGGAGGATCTGGTGGACTGTCTGG CAGATCCGATGATCACGGCGGATCTG AGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGA GGACTTGTTTCAGCCTGGCGGCTCTCT GAAGCTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCT TCACCTTTTAGCACCTACGCCATGAAC TGGGTCCGACAGGCCTCTGGCAAAGG CCTGGAATGGGTTCGGACGGATCAGAA GCAAGTACAACAACCTACGCCACCTAC TACGCCGACAGCGTGAAAGGACAGATT CACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGA ACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGC CTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTA CTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTCG GCAACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTTAC AGTTAGCAGTGGCGGCGGAGGTAGTG GCGGAGGTGGCAGCGGAGGCGGTGGA TCTCAAACAGTGGTCACCCAAGAGCC TAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAA CCGTGACACTGACATGCGGATCTTCT ACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTA TGTGAATTGGGTGCAGCAGAAGCCCG

10

20

30

40

50

【表 5 - 4 4】

		GACAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGA GGCACCAACAAGAGAGCCCCTGGAAC ACCAGCCAGATTTCAGCGGATCTCTGA TCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTT TCTGGTGCCCAGCCTGAAGATGAGGC CGAGTACTATTGCGTGCTGTGGTACA GCAACAGATGGGTGTTTCGGAGGCGGC ACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGCGG AGGCAGCGAAGTCCAGCTGGTTGAAA GCGGTGGTGGCCTGGTCCAACCAGGT GGAAGTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC TTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCT ACATCCACTGGGTTCGACAAGCTCCA GGCAAGGGCCTTGAGTGGGTTCGCCAG AATCTACCCCAACCAACGGCTACACCA GATACGCCGACTCTGTGAAAGGCCGG TTCACCATCTCTGCCGACACCTCCAA AAACACAGCCTATCTCCAAATGAACT CCCTGAGAGCCGAGGATACAGCCGTC TATTACTGCAGCAGATGGGGAGGCGA CGGCTTTTACGCCATGGATTACTGGG GACAGGGAACCCTGGTCAACCGTGTCT AGCGCCTCTACAAAGGGCCCTAGCGT GTTCCCTCTGGCTCCCTGTAGCAGAA GCACCAGCGAATCTACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCC TGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAAC CTGGCGCTCTTACAAGCGGCGTGAC ACCTTTCCAGCCGTGCTGCAAAGCAG CGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGG TCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGC ACAAAGACCTACACCTGTAATGTGGA CCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGG ACAAGCGCGTGGAATCTAAGTACGGC GGAGGAAGCTCTGGCGGCAGCATCTC
--	--	--

10

20

30

40

50

【表 5 - 4 5】

		TTCTGGACTGCTGAGCGGCAGAA GCGACAATATCGGCGGAGGCTCT GGACCTCCTTGTCCTCCATGTCC TGCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCC CTTCCGTGTTCTCTGTTTCTCCA AAGCCTAAGGACACCCCTGATGAT CAGCAGAACCCCTGAAGTGACCT GCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAA GAGGATCCAGAGGTGCAGTTCAA TTGGTACGTGGACGGCGTGGAAG TGCACAACGCCAAGACCAAGCCT AGAGAGGAACAGTTCAACAGCAC CTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGA CAGTGCTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTA GCAGCATCGAGAAAACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGA ACCTCAAGTCTGTACACTGCCTC CTAGCCAAGAGGAAATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGAGCTGCGC CGTGAAGGGCTTTTACCCTTCCG ATATCGCCGTGGAATGGGAGAGC AATGGCCAGCCAGAGAACAATA CAAGACAACCCCTCCTGTGCTGG ACAGCGACGGCTCATTCTTCTG GTGTCCAGACTGACCGTGGACAA GAGCAGATGGCAAGAGGGCAACG TGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCTCTGAGCCTGTCTC TGGGCNNN
--	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 4 6】

639	Proc3008:2 0GG-GL1204 DDH-v619h- 5mr-F5.17- Tras-1406- SHL2-TCB (HC_FcK_Ig G4_EN)	CAAGGACAATCTGGCTCTGGCTATC TGTGGGGCTGCGAGTGGAATTGTGG CGGCATCACAAACAGGCTCTAGCGGC GGAAGCGGAGGATCTGGTGGACTGT CTGGCAGATCCGATGATCACGGCGG ATCTGAGGTGCAGCTGGTGGAAATCT GGCGGAGGACTTGTTTCAGCCTGGCG GCTCTCTGAAGCTGTCTTGTGCCGC CAGCGGCTTCACCTTTAGCACCTAC GCCATGAACCTGGGTCCGACAGGCCT CTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTCCG ACGGATCAGAAGCAAGTACAACAAC TACGCCACCTACTACGCCGACAGCG TGAAGGACAGATTACCATCAGCCG GGACGACAGCAAGAACACCGCCTAC CTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCG AGGACACCGCCGTGTACTACTGTGT GCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGC TATGTGTCTTGGTGGGCCTATTGGG GCCAGGGCACACTGGTTACAGTTAG CAGTGGCGGCGGAGGTAGTGGCGGA GGTGGCAGCGGAGGCGGTGGATCTC AAACAGTGGTCAACCAAGAGCCTAG CCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAACC GTGACACTGACATGCGGATCTTCTA CAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTA TGTGAATTGGGTGCAGCAGAAGCCC GGACAGGCTCCTAGAGGACTGATCG GAGGCACCAACAAGAGAGCCCCTGG AACACCAGCCAGATTCAGCGGATCT CTGATCGGCGGAAAGGCCGCTCTGA CACTTTCTGGTGCCCAGCCTGAAGA TGAGGCCGAGTACTATTGCGTGCTG TGGTACAGCAACAGATGGGTGTTTCG GAGGCGGCACCAAGCTGACAGTTCT TGGAGGCGGAGGCAGCGAAGTCCAG CTGGTTGAAA
-----	--	--

10

20

30

40

50

【表 5 - 4 7】

		GCGGTGGTGGCCTGGTCCAACCAGGT GGAAGTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC TTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCT ACATCCACTGGGTTCGACAAGCTCCA GGCAAGGGCCTTGAGTGGGTGCGCAG AATCTACCCACCAACGGCTACACCA GATACGCCGACTCTGTGAAAGGCCGG TTCACCATCTCTGCCGACACCTCCAA AAACACAGCCTATCTCCAAATGAACT CCCTGAGAGCCGAGGATACAGCCGTC TATTACTGCAGCAGATGGGGAGGCGA CGGCTTTTACGCCATGGATTACTGGG GACAGGGAACCCTGGTCAACCGTGTCT AGCGCCTCTACAAAGGGCCCTAGCGT GTTCCCTCTGGCTCCCTGTAGCAGAA GCACCAGCGAATCTACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCC TGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAACCT CTGGCGCTCTTACAAGCGGCGTGAC ACCTTTCCAGCCGTGCTGCAAAGCAG CGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGG TCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGC ACAAAGACCTACACCTGTAATGTGGA CCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGG ACAAGCGCGTGGAATCTAAGTACGGC GGAGGAAGCTCAGGCGGCTCTGCTCC TAGATCTGCTCTGGCCCATGGACTGT TTGGCGGAGGCTCTGGACCTCCTTGT CCTCCATGTCCTGCTCCAGAGTTTGA AGGCGGCCCTTCCGTGTTCTGTTC CTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATG ATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAGG ATCCAGAGGTGCAGTTCAATTGGTAC GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
--	--	--

10

20

30

40

50

【表 5 - 4 8】

		CAAGACCAAGCCTAGAGAGGGAACAGT TCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCC GTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTG GCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCA AGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGC AGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCTCGCGAACCTCAAG TCTGTACACTGCCTCCTAGCCAAGAG GAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GAGCTGCGCCGTGAAGGGCTTTTACC CTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAG AGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACATA CAAGACAACCCCTCCTGTGTCTGGACA GCGACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCC AGACTGACCGTGGACAAGAGCAGATG GCAAGAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCT GTCTCTGGGCNNN
640	ProC3008:2 0GG-GL1204 DDH-v619h- 5mr-F5. 17- Tras-1406- SHL2-TCB (LC_Tras5. 17)	CAAGGACAATCTGGACAAGGCGCCCT GATCTGCTGTTCCGATGTGTCTGGAC TGTGCCGTTGGTGC GGCGGAGGATCT TCTGGCGGCTCTATCTCTTCTGGCCT GCTGAGCGGCAGAAAGCGACAATCACG GCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACA CAGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCAG CGTGGGAGACAGAGTGACCATCACAT GTAGAGCCAGCCAGGACGTGAACACA GCCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCC TGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCT ACAGCGCCAGCTTTCTGTACAGCGGC GTGCCCAGCAGATTCAGCGGCTCTAG AAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCA TAAGCAGTCTGCAGCCCGAGGACTTC GCCACCTACTACTGTCAGCAGCACTA

10

20

30

40

50

【表 5 - 4 9】

		CACCACACCTCCAAACCTTTGGCCAGG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACA GTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTT TCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGT CTGGCACAGCCTCTGTTCGTGTGCCTG CTGAACAACCTTCTACCCCAGAGAAGC CAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGTCCGGCAATAGCCAAGAG AGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCTACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGT GACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTG TGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAA TGT
641	Proc1441:2 0GG-v619h- F5. 17-Tras -Half TCB (HC_20GG-v 619h-Tras- H4HEN)	CAAGGACAATCTGGCTCTGGCTATCT GTGGGGCTGCGAGTGGAATTGTGGCG GCATCACAAACAGGCTCTAGCGGCGGA AGCGGAGGATCTGGTGGACTGTCTGG CAGATCCGATGATCACGGCGGATCTG AGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGA GGACTTGTTTCAGCCTGGCGGCTCTCT GAAGCTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCT TCACCTTTAGCACCTACGCCATGAAC TGGGTCCGACAGGCCTCTGGCAAAGG CCTGGAATGGGTCCGGACGGATCAGAA GCAAGTACAACAACCTACGCCACCTAC TACGCCGACAGCGTGAAAGGACAGATT CACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGA ACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGC CTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTA CTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTCG GCAACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCC TATTGGGGCCAGGGCACACTGGTTAC AGTTAGCAGTGGCGGCGGAGGTAGTG GCGGAGGTGGCAGCGGAGGCGGTGGA

10

20

30

40

50

【表 5 - 5 0】

		TCTCAAACAGTGGTCACCCAAGAGCC TAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAA CCGTGACACTGACATGCGGATCTTCT ACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTA TGTGAATTGGGTGCAGCAGAAGCCCG GACAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGA GGCACCAACAAGAGAGCCCCCTGGAAC ACCAGCCAGATTCAGCGGATCTCTGA TCGGCGGAAAGGCCGCTCTGACACTT TCTGGTGCCCAGCCTGAAGATGAGGC CGAGTACTATTGCGTGCTGTGGTACA GCAACAGATGGGTGTTTCGGAGGCGGC ACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGCGG AGGCAGCGAAGTCCAGCTGGTTGAAA GCGGTGGTGGCCTGGTCCAACCAGGT GGAAGTCTGAGACTGAGCTGTGCCGC TTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCT ACATCCACTGGGTTCGACAAGCTCCA GGCAAGGGCCTTGAGTGGGTGCGCAG AATCTACCCACCAACGGCTACACCA GATACGCCGACTCTGTGAAAGGCCGG TTCACCATCTCTGCCGACACCTCCAA AAACACAGCCTATCTCCAAATGAACT CCCTGAGAGCCGAGGATACAGCCGTC TATTACTGCAGCAGATGGGGAGGCGA CGGCTTTTACGCCATGGATTACTGGG GACAGGGAACCCTGGTCAACCGTGTCT AGCGCCTCTACAAAGGGCCCTAGCGT GTTCCCTCTGGCTCCCTGTAGCAGAA GCACCAGCGAATCTACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCC TGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAAC CTGGCGCTCTTACAAGCGGCGTGAC ACCTTTCCAGCCGTGCTGCAAAGCAG CGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGG
--	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 5 1】

		TCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGG CACAAAGACCTACACCTGTAATGTG GACCACAAGCCTAGCAACACCAAGG TGGACAAGCGCGTGGAATCTAAGTA CGGCCCTCCTTGTCCTCCATGTCCT GCTCCAGAGTTTGAAGGCGGCCCTT CCGTGTTTCCTGTTTCCCTCCAAAGCC TAAGGACACCCTGATGATCAGCAGA ACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGGTGG TGGACGTTTCCCAAGAGGACCCCGA GGTGCAAGTTCAATTGGTACGTGGAC GGCGTGGAAGTGACACAACGCCAAGA CCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAA CAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTG CTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGC TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAA GGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAGC AGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCTCGCGAACCTCA AGTCTGTACACTGCCTCCTAGCCAA GAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGT CCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCTT TTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGA ACAAC TACAAGACCACACCTCCTGT GCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTC CTGGTGTCCAGACTGACCGTGGACA AGAGCAGATGGCAAGAGGGCAACGT GTTCACTGTCAGCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGA AGTCTCTGTCTCTGTCCCTGGGCNN N
--	--	--

10

20

30

40

50

【表 5 - 5 2】

6 4 2	P r o C 1 4 4 1 : 2 0 G G - v 6 1 9 h - F 5 . 1 7 - T r a s - H a l f T C B (H C _ F c K _ I g G 4 _ E N)	G G A T C T T C T A A G T A C G G A C C T C C T T G T C C T C C A T G T C C T G C T C C A G A G T T T G A A G G C G G C C C T T C C G T G T T C C T G T T T C C T C C A A A G C C T A A G G A C A C C C T G A T G A T C A G C A G A A C C C C T G A A G T G A C C T G C G T G G T G G T G G A C G T G T C C C A A G A G G A T C C T G A G G T G C A G T T C A A T T G G T A C G T G G A C G G C G T G G A A G T G C A C A A C G C C A A G A C C A A G C C T A G A G A G G A A C A G T T C A A C A G C A C C T A C A G A G T G G T G T C C G T G C T G A C C G T G C T G C A C C A G G A T T G G C T G A A C G G C A A A G A G T A C A A G T G C A A G G T G T C C A A C A A G G G C C T G C C T A G C A G C A T C G A G A A A A C C A T C A G C A A G G C C A A G G G C C A G C C A A G A G A A C C C C A G G T G T A C A C A C T G C C T C C A T G C C A A G A G G A A A T G A C C A A G A A C C A G G T G T C C C T G T G G T G C C T G G T C A A G G G C T T C T A C C C T T C C G A T A T C G C C G T G G A A T G G G A G A G C A A T G G C C A G C C T G A G A A C A A C T A C A A G A C C A C A C C T C C T G T G C T G G A C A G C G A C G G C T C A T T C T T C C T G T A C A G C A G A C T G A C C G T G G A C A A G A G C A G A T G G C A A G A G G G C A A C G T G T T C A G C T G C A G C G T G A T G C A C G A G G C C C T G C A C A A C C A C T A C A C C C A G A A G T C T C T G A G C C T G A G C C T G G G C N N N
-------	--	--

10

20

30

40

50

【表 5 - 5 3】

643	Proc1441:2 0GG-v619h- F5.17-Trans -Half TCB (LC_Trans5. 17)	CAAGGACAATCTGGACAAGGCGCCC TGATCTGCTGTTCCGATGTGTCTGG ACTGTGCCGTTGGTGCGGCGGAGGA TCTTCTGGCGGCTCTATCTCTTCTG GCCTGCTGAGCGGCAGAAGCGACAA TCACGGCGGAGGCAGCGACATCCAG ATGACACAGAGCCCTTCTAGCCTGA GCGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGAC CATCACATGTAGAGCCAGCCAGGAC GTGAACACAGCCGTGGCTTGGTATC AGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTAA GCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTTT CTGTACAGCGGCGTGCCAGCAGAT TCAGCGGCTCTAGAAGCGGCACCGA CTTCACCCTGACCATAAGCAGTCTG CAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACT ACTGTCAGCAGCACTACACCACACC TCCAACCTTTGGCCAGGGCACCAAG GTGGAAATCAAGCGGACAGTGGCCG CTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACC TAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGC ACAGCCTCTGTCTGTGCTGCTGA ACAACCTTCTACCCCAGAGAAGCCAA GGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC CTGCAGTCCGGCAATAGCCAAGAGA GCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCTACCTACAGCCTGAGCAGCACC CTGACACTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGA AGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGC CCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGG GCGAATGT
-----	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 5 4】

6 4 4	P r o C 1 4 4 6 : F 5. 1 7 - T r a s - 2 5 - v 6 1 9 h - 2 0 G G - 2 4 - H a 1 f T C B (H C _ T r a s - 2 5 - v 6 1 9 h - 2 0 G G - 2 4 - H 4 H E N)	G A A G T T C A G C T T G T T G A A T C T G G C G G C G G A C T G G T T C A G C C T G G C G G A T C T C T G A G A C T G T C T T G T G C C G C C A G C G G C T T C A A C A T C A A G G A C A C C T A C A T C C A C T G G G T C C G A C A G G C C C C T G G C A A A G G A C T T G A A T G G G T C G C C A G A A T C T A C C C C A C C A A C G G C T A C A C C A G A T A C G C C G A C T C T G T G A A G G G C A G A T T C A C C A T C A G C G C C G A C A C C A G C A A G A A C A C C G C C T A C C T G C A G A T G A A C A G C C T G A G A G C C G A G G A C A C C G C C G T G T A C T A C T G T T C T A G A T G G G G A G G C G A C G G C T T C T A C G C C A T G G A T T A T T G G G G C C A G G G C A C C C T G G T C A C A G T G T C T A G C G C C T C T A C A A A G G G C C C C A G C G T T T T C C C A C T G G C T C C C T G T A G C A G A A G C A C C A G C G A A T C T A C A G C C G C T C T G G G C T G C C T G G T C A A G G A C T A C T T T C C T G A G C C T G T G A C C G T G T C C T G G A A C T C T G G C G C T C T G A C A T C T G G C G T G C A C A C C T T T C C A G C C G T G C T G C A A A G C A G C G G C C T G T A C T C T C T G A G C A G C G T C G T G A C A G T G C C T A G C A G C T C T C T G G G C A C C A A G A C C T A C A C C T G T A A T G T G G A C C A C A A G C C T A G C A A C A C C A A G G T G G A C A A G A G A G T T G G C G G A G G C G G A T C A G G T G G C G G A G G A A G C G G A G G C G G C G G A T C T G A A G T G C A A C T G G T T G A A A G C G G C G G A G G C C T T G T G C A A C C T G G C G G A A G C C T G A A A C T G A G C T G T G C C G C C T C T G G C T T C A C C T T C A G C A C A T A C G C C A T G A A T T G G G T T C G A C A A G C C A G C G G C A A G G G C C T C G A A T G G G T T G G A A G A A T C A G A A G C A A G T A C A A C A A C T A C G C C A C C T A C T A C G C C G A C A G C G T G A A G G A T C G G T T T A
-------	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 5 5】

		CCATCAGCCGGGACGACTCCAAGAAT ACTGCCTATCTCCAAATGAACTCCCT CAAGACCGAGGATACAGCCGTCTATT ACTGCGTGCGGCACGGCAACTTCGGC AACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTA CTGGGGACAGGGAACACTGGTTACTG TGTCCAGTGGCGGTGGTGGAAAGTGGC GGCGGAGGATCAGGCGGTGGCGGTTC TCAAACAGTGGTCAACCAAGAGCCTA GCCTGACAGTGTCTCCAGGCGGAACC GTGACACTGACATGTGGCAGTTCTAC AGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACG TGAACCTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGC CAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGAGG CACCAACAAGAGAGCCCCTGGAACAC CAGCCAGATTCTCCGGCTCTCTGATC GGCGGAAAAGCCGCACTGACACTGTC TGGTGCTCAGCCTGAGGATGAGGCCG AGTACTATTGCGTGCTGTGGTACAGC AACAGATGGGTGTTCTGGCGGAGGGAC CAAGCTGACAGTGCTTGGAGGTTCTG GTGGCAGCAGCGGCGCTTCTGGAAC GGAACAGCTGGCGGAACAGGCTCTGG ATCTGGCACAGGATCTGGCCTGAGCG GCAGATCCGATGATCATGGCGGAGGT TCTCAGGGCCAGTCTGGCAGTGGATA TCTGTGGGGCTGCGAGTGGAATTGCG GCGGCATCACAAACAGGATCTAGCGGA GGCTCAGGTGGTGGTGGATCTGGTGG TGGCGGCTCAGGCGGAGGTGGTAGCG GTGGTTCTGAGTCTAAGTACGGCCCT CCTTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGA GTTTGAAGGCGGCCCTTCCGTGTTCC TGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACC CTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGT
--	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 5 6】

		GACCTGCGTGGTGGTTCGACGTTTCC CAAGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT GCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGA GAGGAACAGTTCAACAGCACCTACA GAGTGGTGTCCGTGCTGACTGTGCT GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAA GAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA AGGGCCTGCCAAGCAGCATCGAGAA AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAG CCTCGCGAACCTCAAGTCTGTACAC TGCCTCCTAGCCAAGAGGAAATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGAGCTGC GCCGTGAAGGGCTTTTACCCTTCCG ATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAA TGGCCAGCCAGAGAACAACTACAAG ACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCG ACGGCTCATTTTTTCCTGGTGTCCAG ACTGACCGTGGACAAGTCCAGATGG CAAGAGGGCAACGTGTTTCACTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAGTCTCTGTCT CTGAGCCTGGGCGNNN
645	Pr oC1446 : F 5. 17-Tras- 25-v619h-2 0GG-24-Hal f TCB (HC_F cK_IgG4_E N)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCCTT GTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGTT TGAAGGCGGCCCTTCCGTGTTCCCTG TTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCC TGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC CAAGAGGATCCTGAGGTGCAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT GCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGA GAGGAACAGTTCAACAGCACCTACA GAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAA GAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA AGGGCCTGCCTAG

10

20

30

40

50

【表 5 - 5 7】

		CAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCAAGAGAACCCAG GTGTACACACTGCCTCCATGCCAAGA GGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTAC CCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGA GAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACCT ACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGAC AGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAG CAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGAT GGCAAGAGGGCAACGTGTTTCAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCC TGAGCCTGGGCNNN
6 4 6	Pr o C 1 4 4 6 : F 5, 1 7 - T r a s - 2 5 - v 6 1 9 h - 2 0 G G - 2 4 - H a l f T C B (L C _ T r a s 5, 1 7)	CAAGGACAATCTGGACAAGGCGCCCT GATCTGCTGTTCCGATGTGTCTGGAC TGTGCCGTTGGTGC GGCGGAGGATCT TCTGGCGGCTCTATCTCTTCTGGCCT GCTGAGCGGCAGAAGCGACAATCACG GCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACA CAGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCAG CGTGGGAGACAGAGTGACCATCACAT GTAGAGCCAGCCAGGACGTGAACACA GCCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCC TGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCT ACAGCGCCAGCTTTCTGTACAGCGGC GTGCCCAGCAGATTCAGCGGCTCTAG AAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCA TAAGCAGTCTGCAGCCCGAGGACTTC GCCACCTACTACTGTCAGCAGCACTA CACCACACCTCCAACCTTTGGCCAGG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACA GTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTT TCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGT CTGGCACAGCCTCTGTCTGTGCCTG

10

20

30

40

50

【表 5 - 5 8】

		CTGAACAACCTTCTACCCCAGAGAAGC CAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGTCCGGCAATAGCCAAGAG AGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCTACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGT GACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTG TGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAA TGT
647	ProC1447:F 5.17-Trans- 25-v619h-M N15a-24-Ha lf TCB (HC_Trans-2 5-v619h-MN 15a-24-H4H EN)	GAAGTTCAGCTTGTTGAATCTGGCGG CGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTC TGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGC TTCAACATCAAGGACACCTACATCCA CTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAG GACTTGAATGGGTGCGCCAGAATCTAC CCCACCAACGGCTACACCAGATACGC CGACTCTGTGAAGGGCAGATTACCA TCAGCGCCGACACCAGCAAGAACACC GCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTTCTAGATGGGGAGGCGACGGCTTC TACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGG CACCCTGGTCACAGTGTCTAGCGCCT CTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTTCCCA CTGGCTCCCTGTAGCAGAAGCACCCAG CGAATCTACAGCCGCTCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCT GTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGC TCTGACATCTGGCGTGCACACCTTTC CAGCCGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTG TACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGT GCCTAGCAGCTCTCTGGGCACCAAGA CCTACACCTGTAATGTGGACCAACAAG CCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG

10

20

30

40

50

【表 5 - 5 9】

		AGTTGGCGGAGGCGGATCAGGTGGCG GAGGAAGCGGAGGCGGCGGATCTGAA GTGCAACTGGTTGAAAGCGGCGGAGG CCTTGTGCAACCTGGCGGAAGCCTGA AACTGAGCTGTGCCGCCTCTGGCTTC ACCTTCAGCACATACGCCATGAATTG GGTTCGACAAGCCAGCGGCAAGGGCC TCGAATGGGTTGGAAGAATCAGAAGC AAGTACAACAACCTACGCCACCTACTA CGCCGACAGCGTGAAGGATCGGTTTA CCATCAGCCGGGACGACTCCAAGAAT ACTGCCTATCTCCAAATGAACTCCCT CAAGACCGAGGATACAGCCGTCTATT ACTGCGTGCGGCACGGCAACTTCGGC AACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTA CTGGGGACAGGGAACACTGGTTACTG TGTCAGTGGCGGTGGTGGAAAGTGGC GGCGGAGGATCAGGCGGTGGCGGTTC TCAAACAGTGGTCACCCAAGAGCCTA GCCTGACAGTGTCTCCAGGCGGAACC GTGACACTGACATGTGGCAGTTCTAC AGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACG TGAACCTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGC CAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGAGG CACCAACAAGAGAGCCCCCTGGAACAC CAGCCAGATTCTCCGGCTCTCTGATC GGCGGAAAAGCCGCACTGACACTGTC TGGTGCTCAGCCTGAGGATGAGGCCG AGTACTATTGCGTGCTGTGGTACAGC AACAGATGGGTGTTTCGGCGGAGGGAC CAAGCTGACAGTGCTTGGAGGTTCTG GTGGCAGCAGCGGCGCTTCTGGAAC GGAACAGCTGGCGGAACAGGCTCTGG ATCTGGCACAGGATCTGGCCTGAGCG GCAGATCCGATGATCATGGCGGAGGT
--	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 6 0】

		TCTCAGGGCCAGTCTGGCAGCAA TGCCTTCAGATGTTGGTGGGACC CTCCTTGCCAGCCTATGACAGGA TCTAGCGGAGGCTCAGGTGGCGG TGGATCTGGCGGAGGTGGTAGCG GAGGTGGTGGGAAGCGGAGGATCT GAGTCTAAGTACGGCCCTCCTTG TCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGT TTGAAGGCGGCCCTTCCGTGTTT CTGTTTTCCTCCAAAGCCTAAGGA CACCTTGATGATCAGCAGAACCC CTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GACGTTTCCCAAGAGGACCCTGA GGTGCAGTTCAATTGGTACGTGG ACGGCGTGGAAGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCTAGAGAGGAACA GTTCAACAGCACCTACAGAGTGG TGTCCGTGCTGACTGTGCTGCAC CAGGATTGGCTGAACGGCAAAGA GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA AGGGCCTGCCAAGCAGCATCGAG AAAACCATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCTCGCGAACCTCAAGTCT GTACACTGCCTCCTAGCCAAGAG GAAATGACCAAGAACCAGGTGTC CCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCT TTTACCCTTCCGATATCGCCGTG GAATGGGAGAGCAATGGCCAGCC AGAGAACAACCTACAAGACAACCC CTCCTGTGCTGGACAGCGACGGC TCATTTTTTCCTGGTGTCCAGACT GACCGTGGACAAGTCCAGATGGC AAGAGGGCAACGTGTTTCAGCTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCA CAACCACTACACCCAGAAGTCTC TGTCTCTGAGCCTGGGCNNN
--	--	--

10

20

30

40

50

【表 5 - 6 1】

648	Proc1447 : F5. 17-Tra s-25-v619 h-MN15a-2 4-Half TC B (HC_FcK_I gG4_EN)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCC TTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAG AGTTTGAAGGCGGCCCTTCCGTG TTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAA GGACACCCTGATGATCAGCAGAA CCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG GTGGACGTGTCCCAAGAGGATCC TGAGGTGCAGTTCAATTGGTACG TGGACGGCGTGGAAGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGA ACAGTTCAACAGCACCTACAGAG TGGTGTCCTGCTGACCGTGCTG CACCAGGATTGGCTGAACGGCAA AGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCA ACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATC GAGAAAACCATCAGCAAGGCCAA GGGCCAGCCAAGAGAACCCAGG TGTACACACTGCCTCCATGCCAA GAGGAAATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGG GCTTCTACCCTTCCGATATCGCC GTGGAATGGGAGAGCAATGGCCA GCCTGAGAACAACCTACAAGACCA CACCTCCTGTGCTGGACAGCGAC GGCTCATTCTTCTGTACAGCAG ACTGACCGTGGACAAGAGCAGAT GGCAAGAGGGCAACGTGTTTCAGC TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCT GCACAACCACTACACCCAGAAGT CTCTGAGCCTGAGCCTGGGCGNN
-----	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 6 2】

649	Proc1447 : F5. 17-Tras-25-v619 h-MN15a-2 4-Half TC B (LC_Tras 5. 17)	CAAGGACAATCTGGACAAGGCGC CCTGATCTGCTGTTCCGATGTGT CTGGACTGTGCCGTTGGTGCGGC GGAGGATCTTCTGGCGGCTCTAT CTCTTCTGGCCTGCTGAGCGGCA GAAGCGACAATCACGGCGGAGGC AGCGACATCCAGATGACACAGAG CCCTTCTAGCCTGAGCGCCAGCG TGGGAGACAGAGTGACCATCACA TGTAGAGCCAGCCAGGACGTGAA CACAGCCGTGGCTTGGTATCAGC AGAAGCCTGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACAGCGCCAGCTT TCTGTACAGCGGCGTGCCCAGCA GATTCAGCGGCTCTAGAAGCGGC ACCGACTTCACCCTGACCATAAG CAGTCTGCAGCCCGAGGACTTCG CCACCTACTACTGTGAGCAGCAC TACACCACACCTCCAACCTTTGG CCAGGGCACCAAGGTGGAAATCA AGCGGACAGTGGCCGCTCCTAGC GTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGA CGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAG CCTCTGTGCGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCAGAGAAGCCAA GGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGTCCGGCAATAGCCAA GAGAGCGTGACCGAGCAGGACAG CAAGGACTCTACCTACAGCCTGA GCAGCACCCCTGACACTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCACAAAGT GTACGCCTGCGAAGTGACCCACC AGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACC AAGAGCTTCAACCGGGGCGAATG T
-----	---	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 6 3】

650	ProC1448:F 5.17-Trans- 25-v619h-M N15b-24-Ha lf TCB (HC_Trans-2 5-v619h-MN 15b-24-H4H EN)	GAAGTTCAGCTTGTTGAATCTGGCGG CGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTC TGAGACTGTCTTGTTGCCGCCAGCGGC TTCAACATCAAGGACACCTACATCCA CTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAG GACTTGAATGGGTTCGCCAGAATCTAC CCCACCAACGGCTACACCAGATACGC CGACTCTGTGAAGGGCAGATTTCACCA TCAGCGCCGACACCAGCAAGAACACC GCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACT GTTCTAGATGGGGAGGCGACGGCTTC TACGCCATGGATTATTGGGGGCCAGGG CACCTTGGTTCACAGTGTCTAGCGCCT CTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCA CTGGCTCCCTGTAGCAGAAGCACACAG CGAATCTACAGCCGCTCTGGGCTGCC TGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCT GTGACCGTGTCTCTGGAAGTCTGGCGC TCTGACATCTGGCGTGCACACCTTTC CAGCCGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTG TACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGT GCCTAGCAGCTCTCTGGGCACCAAGA CCTACACCTGTAATGTGGACCACAAG CCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAG AGTTGGCGGAGGCGGATCAGGTGGCG GAGGAAGCGGAGGCGGCGGATCTGAA GTGCAACTGGTTGAAAGCGGCGGAGG CCTTGTGCAACCTGGCGGAAGCCTGA AACTGAGCTGTGCCGCCTCTGGCTTC ACCTTCAGCACATACGCCATGAATTG GGTTCGACAAGCCAGCGGCAAGGGCC TCGAATGGGTTGGAAGAATCAGAAGC AAGTACAACAACCTACGCCACCTACTA CGCCGACAGCGTGAAGGATCGGTTTA
-----	---	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 6 4】

		CCATCAGCCGGGACGACTCCAAGAAT ACTGCCTATCTCCAAATGAACTCCCT CAAGACCGAGGATACAGCCGTCTATT ACTGCGTGCGGCACGGCAACTTCGGC AACAGCTATGTGTCTTGGTGGGCCTA CTGGGGACAGGGAACACTGGTTACTG TGTCCAGTGGCGGTGGTGGAAAGTGGC GGCGGAGGATCAGGCGGTGGCGGTTC TCAAACAGTGGTCAACCAAGAGCCTA GCCTGACAGTGTCTCCAGGCGGAACC GTGACACTGACATGTGGCAGTTCTAC AGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACG TGAACCTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGC CAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGAGG CACCAACAAGAGAGCCCCTGGAACAC CAGCCAGATTCTCCGGCTCTCTGATC GGCGGAAAAGCCGCACTGACACTGTC TGGTGCTCAGCCTGAGGATGAGGCCG AGTACTATTGCGTGCTGTGGTACAGC AACAGATGGGTGTTTCGGCGGAGGGAC CAAGCTGACAGTGCTTGGAGGTTCTG GTGGCAGCAGCGGCGCTTCTGGAAC GGAACAGCTGGCGGAACAGGCTCTGG ATCTGGCACAGGATCTGGCCTGAGCG GCAGATCCGATGATCATGGCGGAGGT TCTCAGGGCCAGTCTGGCTCTGCAAG AGGACTGTGTTGGTGGGACCCCTCCTT GCACACACGATCTGGGATCTTCAGGC GGATCTGGCGGAGGTGGTAGCGGTGG TGGTGGTAGCGGAGGCGGAGGTAGTG GTGGAAGCGAGTCTAAGTACGGCCCT CCTTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGA GTTTGAAGGCGGCCCTTCCGTGTTCC TGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACC CTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGT
--	--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 6 5】

		GACCTGCGTGGTGGTTCGACGTTTCCC AAGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAAT TGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGG AACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTG GTGTCCGTGCTGACTGTGCTGCACCA GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTG CCAAGCAGCATCGAGAAAACCATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGCGAAC CTCAAGTCTGTACACTGCCTCCTAGC CAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCT TTTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAA CAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGC TGGACAGCGACGGCTCATTTTTCCTG GTGTCCAGACTGACCGTGGACAAGTC CAGATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCACTACACCCAGAAGTCTCT GTCTCTGAGCCTGGGCGNN
651	Proc1448: F 5, 17-Trans- 25-v619h-M N15b-24-Ha lI TCB (HC_ FcK_IgG4_E N)	GGATCTTCTAAGTACGGACCTCCTTG TCCTCCATGTCCCTGCTCCAGAGTTTG AAGGCGGGCCCTTCCGTGTTCCCTGTTT CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGAT GATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCT GCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAG GATCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTA CGTGGACGGCGTGGAAGTGACACAACG CCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAG TTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATT GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTAG

10

20

30

40

50

【表 5 - 6 6】

		CAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGG CCAAGGGCCAGCCAAGAGAACCCAG GTGTACACACTGCCTCCATGCCAAGA GGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTAC CCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGA GAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAAC ACAAGACCACACCTCCTGTGCTGGAC AGCGACGGCTCATTTCTTCCTGTACAG CAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGAT GGCAAGAGGGCAACGTGTTTCACTGC AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCC TGAGCCTGGGCNNN
652	Proc1448:F 5.17-Trans- 25-v619h-M N15b-24-Ha lf TCB (LC__ Trans5.17)	CAAGGACAATCTGGACAAGGCGCCCT GATCTGCTGTTCCGATGTGTCTGGAC TGTGCCGTTGGTGCGGCGGAGGATCT TCTGGCGGCTCTATCTCTTCTGGCCT GCTGAGCGGCAGAAGCGACAATCACG GCGGAGGCAGCGACATCCAGATGACA CAGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCAG CGTGGGAGACAGAGTGACCATCACAT GTAGAGCCAGCCAGGACGTGAACACA GCCGTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCC TGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCT ACAGCGCCAGCTTTCTGTACAGCGGC GTGCCCAGCAGATTCAGCGGCTCTAG AAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCA TAAGCAGTCTGCAGCCCGAGGACTTC GCCACCTACTACTGTTCAGCAGCACTA CACCACACCTCCAACCTTTGGCCAGG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACA GTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTT TCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGT CTGGCACAGCCTCTGTCTGTGCTG

10

20

30

40

50

【表 5 - 6 7】

		CTGAACAACCTTCTACCCCAGAGA AGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGG ACAACGCCCTGCAGTCCGGCAAT AGCCAAGAGAGCGTGACCGAGCA GGACAGCAAGGACTCTACCTACA GCCTGAGCAGCACCCCTGACACTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCA CAAAGTGTTACGCCTGCGAAGTGA CCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCT GTGACCAAGAGCTTCAACCGGGG CGAATGT
--	--	--

10

*注記：Xは、リシン残基であるか、またはC末端に存在しない。

**注記：Nは、リシンのコドンを形成するアデニンであるか、または各Nは存在せず、その結果、リシンのコドンは存在しないかのいずれかである。

【0248】

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

20

【0249】

本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によってその全体が組み込まれる。矛盾する場合には、定義を含めて本明細書が優先する。セクションの見出しに加えて、材料、方法、及び実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。

30

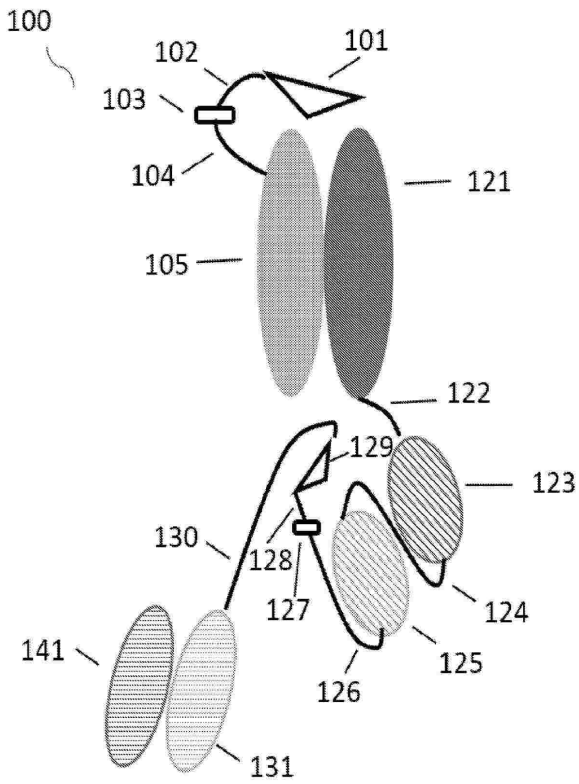
40

50

【図面】

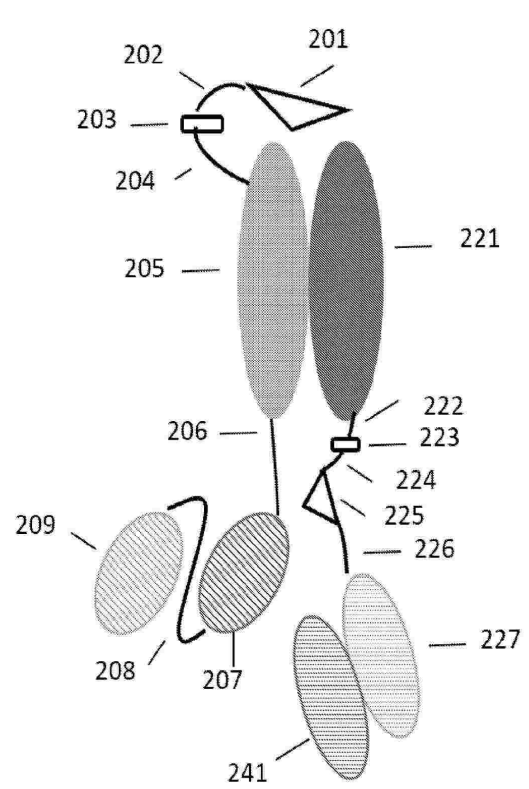
【図 1】

【図 1】



【図 2】

【図 2】

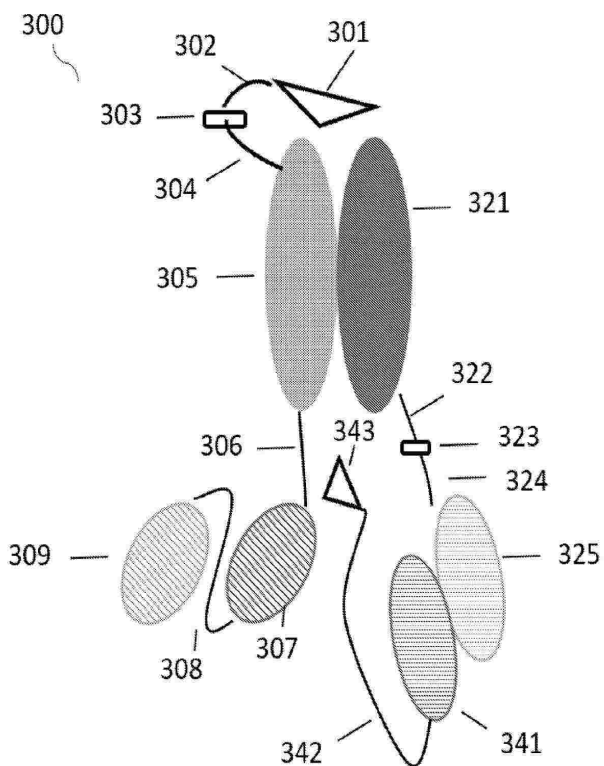


10

20

【図 3】

【図 3】

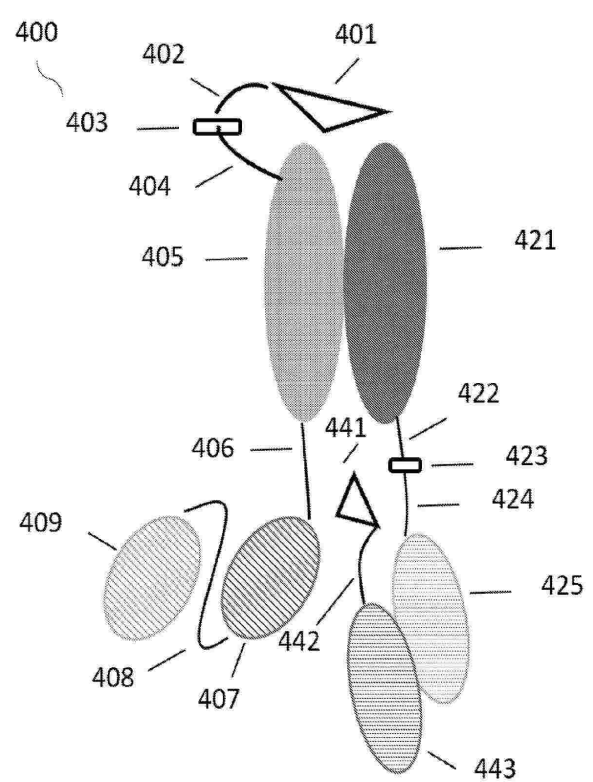


30

40

【図 4】

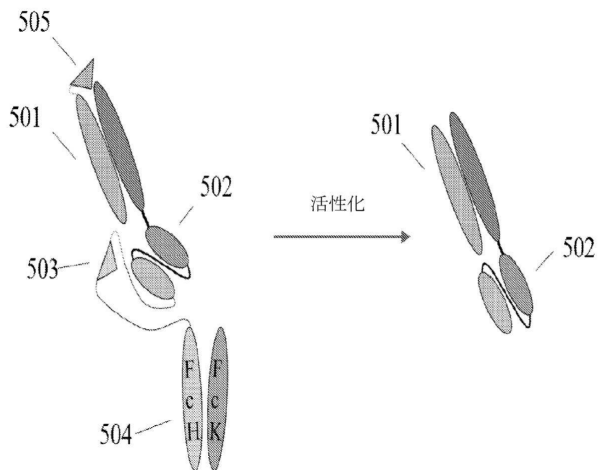
【図 4】



50

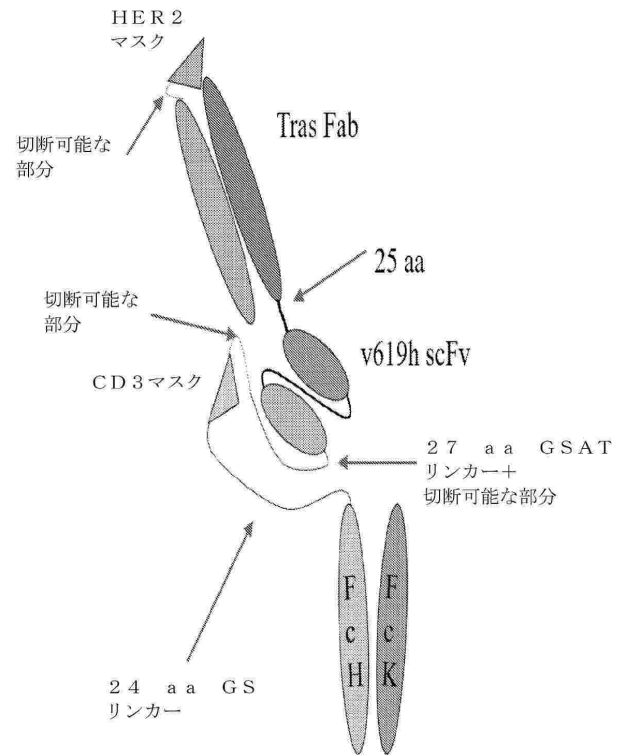
【図 5】

【図 5】



【図 6 A】

【図 6 A】

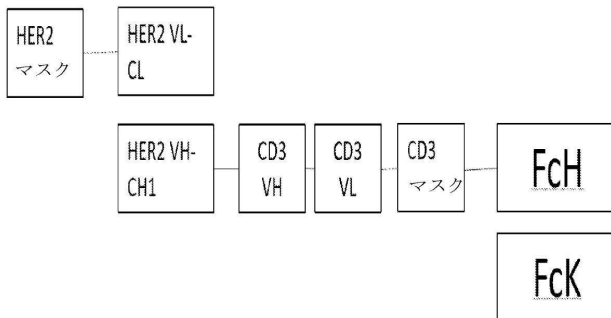


10

20

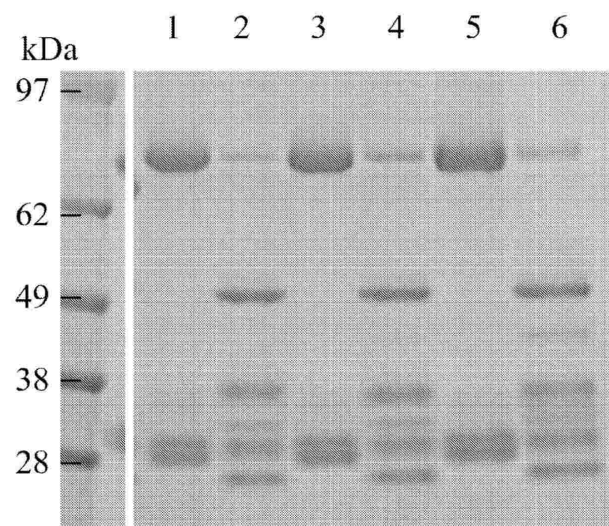
【図 6 B】

【図 6 B】



【図 7 A】

【図 7 A】



30

40

50

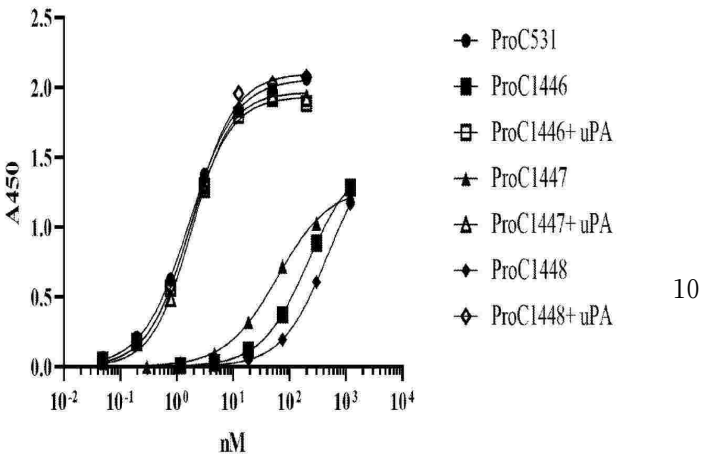
【図 7 B】

【図 7 B】

レーン		注記	予想MW (k D a)
1	ProC1446	20GG	83, 28, 26
2	ProC1446	+ uPA	53, 30, 24, 26
3	ProC1447	MN15a	83, 28, 26
4	ProC1447	+ uPA	53, 30, 24, 26
5	ProC1448	MN15b	83, 28, 26
6	ProC1448	+ uPA	53, 30, 24, 26

【図 8】

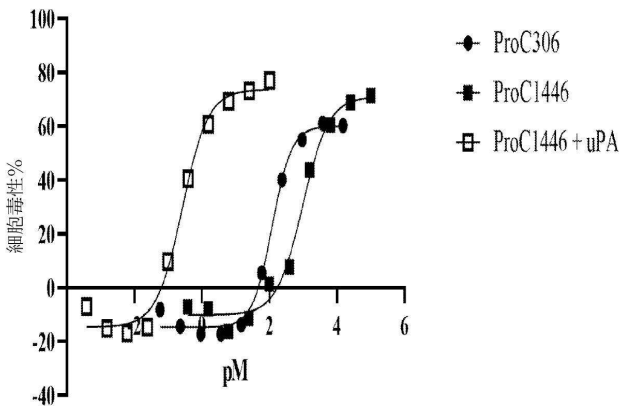
【図 8】



	EC50 (nM)	ME
ProC531	1.126	1
ProC1446	181.2	161
ProC1446 +uPA	2.574	2
ProC1447	60.24	53
ProC1447 +uPA	2.152	2
ProC1448	450.1	400
ProC1448 +uPA	2.268	2

【図 9 A】

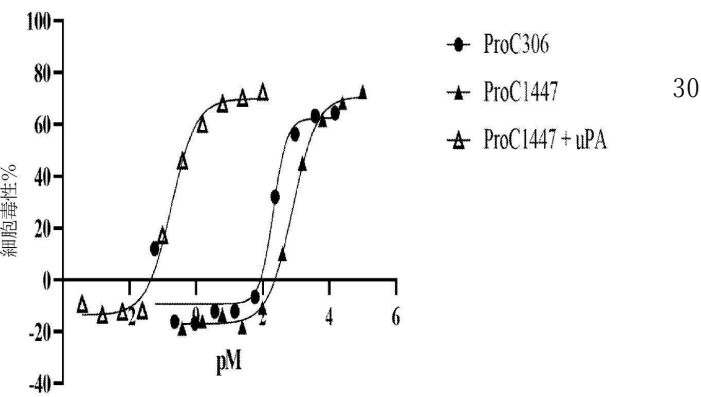
【図 9 A】



	EC50 (pM)	ME
ProC306	118.8	
ProC1446	958.3	3671
ProC1446 +uPA	0.261	

【図 9 B】

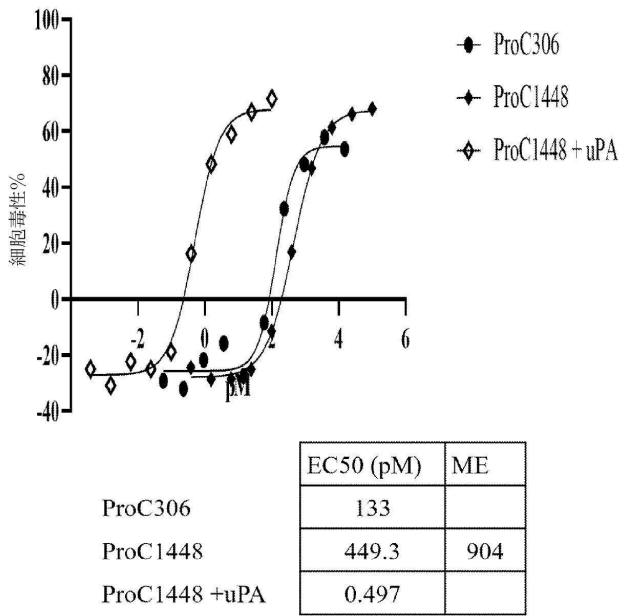
【図 9 B】



	EC50 (pM)	ME
ProC306	208	
ProC1447	775.9	4315
ProC1447 +uPA	0.180	

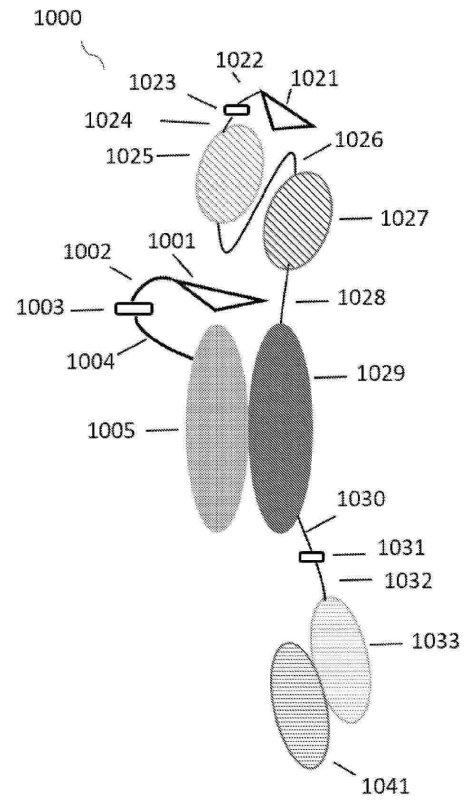
【図 9 C】

【図 9 C】



【図 10】

【図 10】

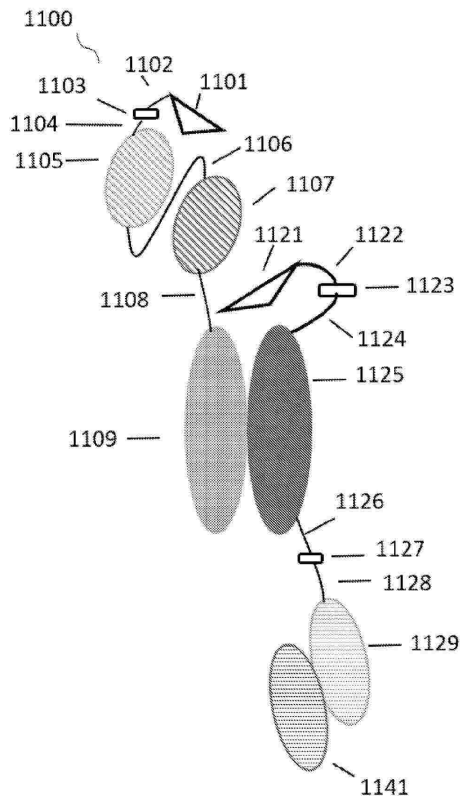


10

20

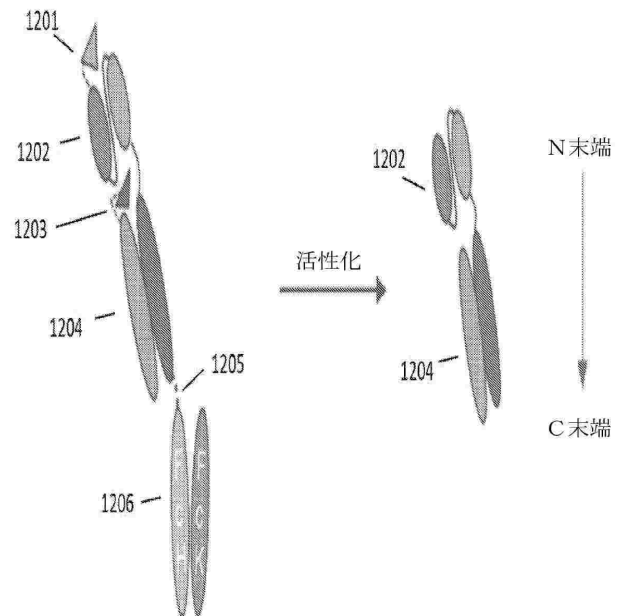
【図 11】

【図 11】



【図 12】

【図 12】



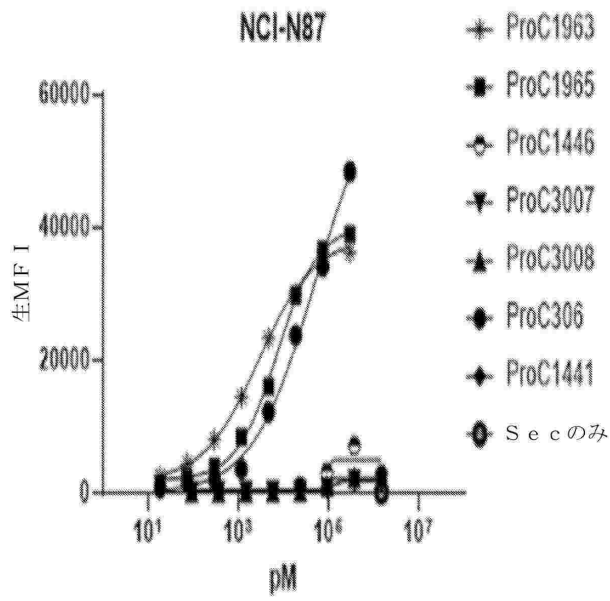
30

40

50

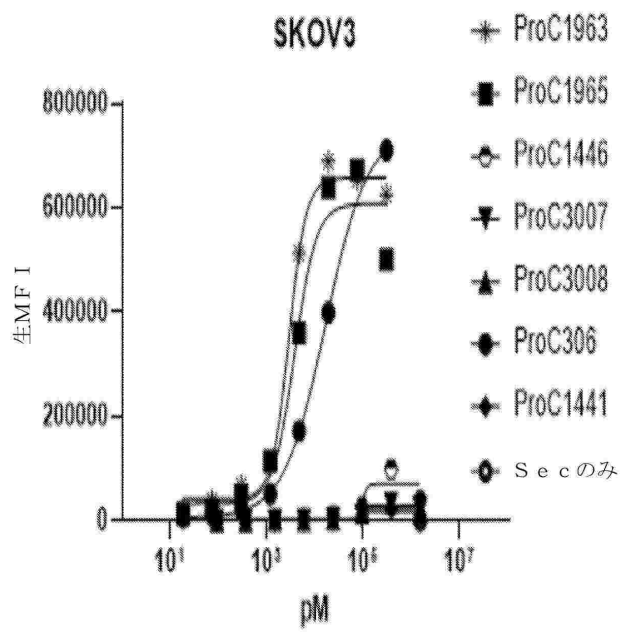
【図 13 A】

【図 13 A】



【図 13 B】

【図 13 B】

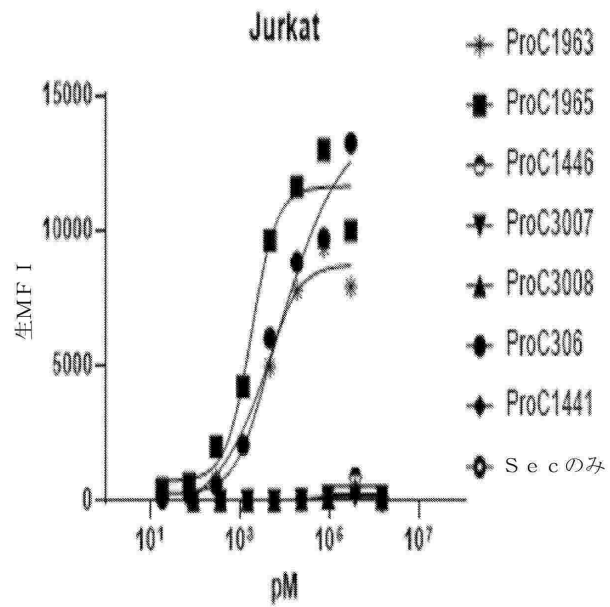


10

20

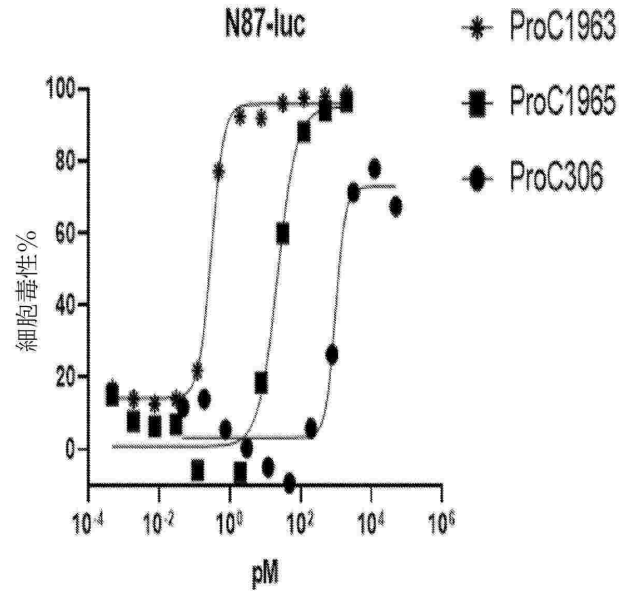
【図 13 C】

【図 13 C】



【図 14 A】

【図 14 A】



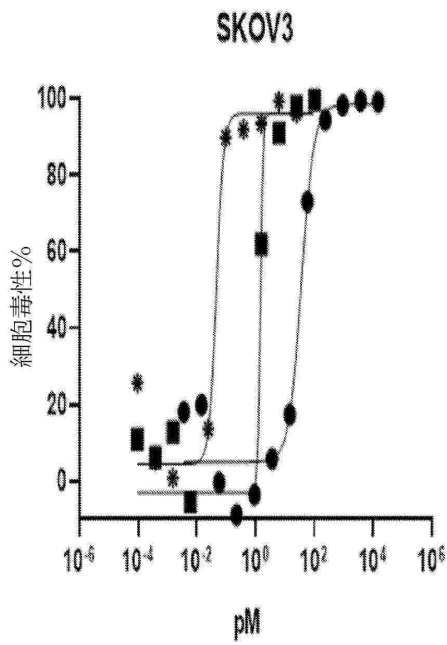
30

40

50

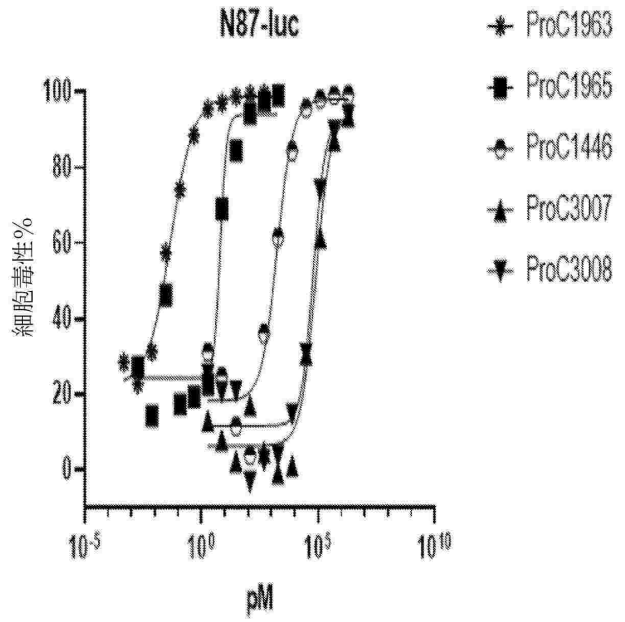
【図 1 4 B】

【図 1 4 B】



【図 1 5 A】

【図 1 5 A】

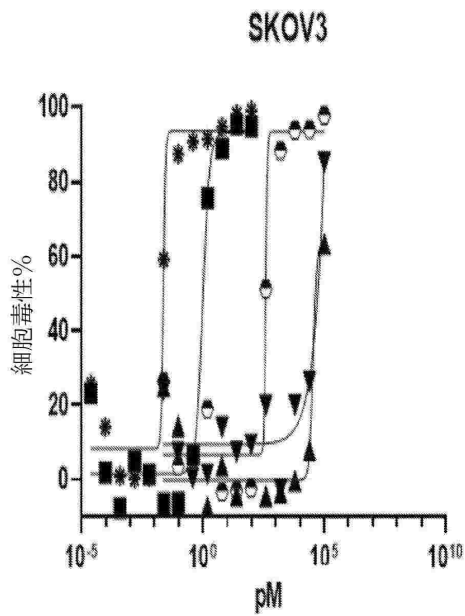


10

20

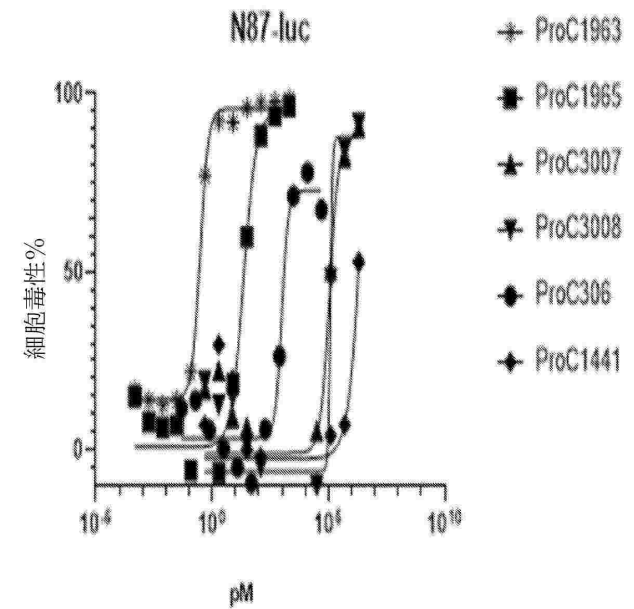
【図 1 5 B】

【図 1 5 B】



【図 1 6 A】

【図 1 6 A】



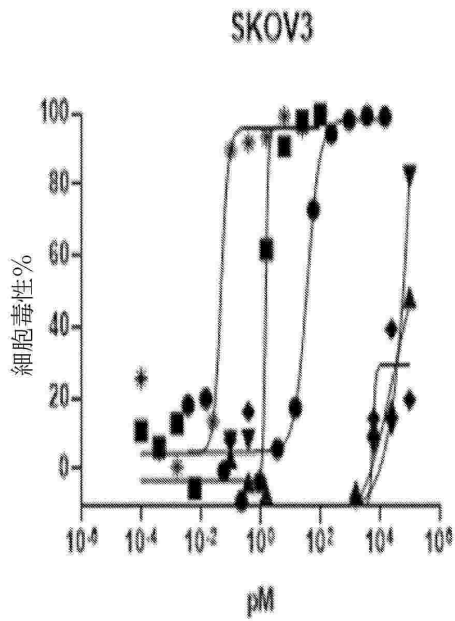
30

40

50

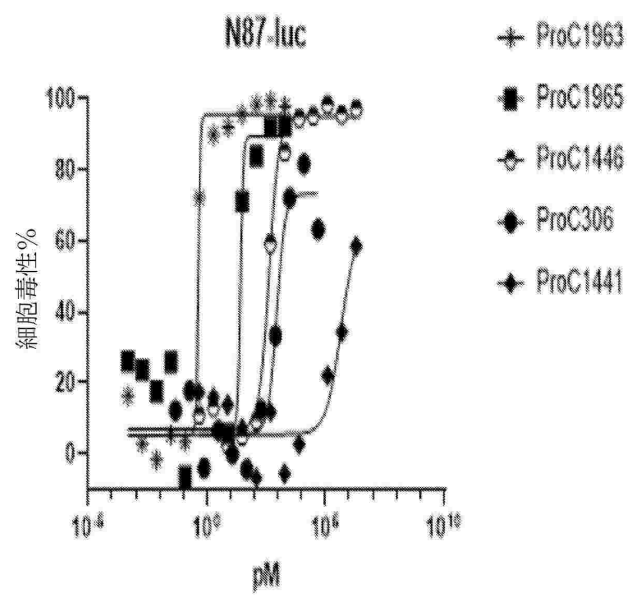
【図 16 B】

【図 16 B】



【図 16 C】

【図 16 C】

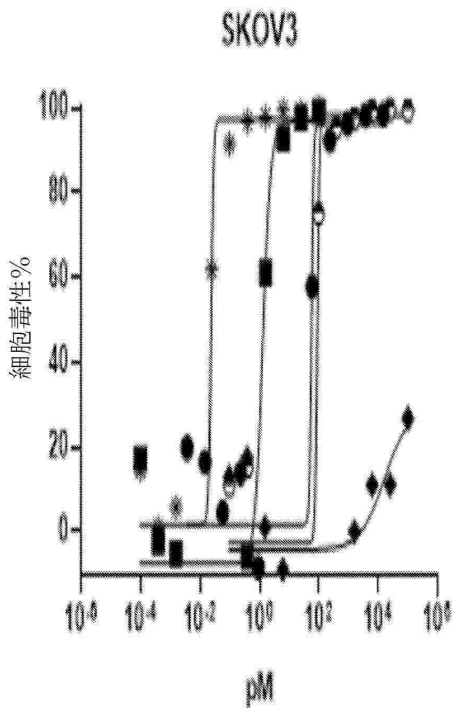


10

20

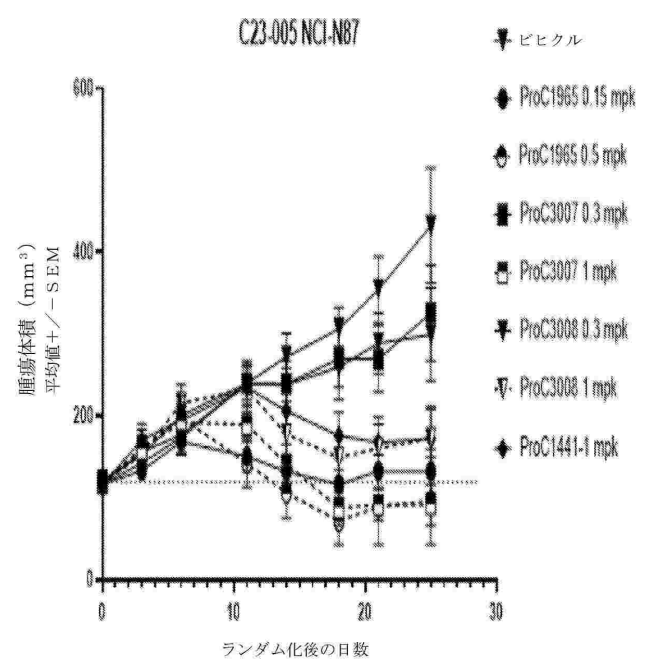
【図 16 D】

【図 16 D】



【図 17】

【図 17】



30

40

【配列表】

202551119000001.xml

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065191

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 A61P35/00 C07K16/28 C07K16/32 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/229553 A1 (LOCKBODY THERAPEUTICS LTD [GB]) 19 November 2020 (2020-11-19) page 72, line 18 - page 73, line 22; claims 1-72; figures 2A, 41A, 41B; table 22	1-81
X	WO 2017/124002 A1 (SCHUETZ THOMAS JOSEPH [US] ET AL) 20 July 2017 (2017-07-20) para 355 : masking moiety; example 22	1-81
X	WO 2016/046778 A2 (YAN WEI [US] ET AL) 31 March 2016 (2016-03-31) examples 1-5; sequence 30	1-81
	----- -/--	
☒ 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 22 June 2023		Date of mailing of the international search report 30/06/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Flao, Katell

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/065191

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/162587 A1 (HOFFMANN LA ROCHE) 28 September 2017 (2017-09-28) claims 1-10; figures 42A, 42B, 42C; example 23 -----	1-81
X	WO 2020/264200 A1 (AMUNIK PHARMACEUTICALS INC [US]) 30 December 2020 (2020-12-30) figures 1-4; examples 5-8, 20, 24 -----	1-81
X,P	WO 2022/170740 A1 (ADAGENE PTE LTD [SG]; LUO PETER PEIZHI [CN]) 18 August 2022 (2022-08-18) constant region (para. 630) with knob-into-hole mutations (para 557); figures 4, 5A, 7; example 1; table 1 -----	1-6, 8, 9, 18-23, 25-81

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/065191

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

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/065191

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2020229553 A1	19-11-2020	AU 2020276891 A1	23-12-2021
		BR 112021022661 A2	29-03-2022
		CA 3138827 A1	19-11-2020
		CN 113840634 A	24-12-2021
		EP 3969116 A1	23-03-2022
		IL 287890 A	01-01-2022
		JP 2022532534 A	15-07-2022
		KR 20220008841 A	21-01-2022
		SG 11202112114Y A	29-11-2021
		US 2023192899 A1	22-06-2023
		WO 2020229553 A1	19-11-2020
WO 2017124002 A1	20-07-2017	AU 2017207480 A1	02-08-2018
		BR 112018014368 A2	05-02-2019
		CA 3011535 A1	20-07-2017
		CN 109562162 A	02-04-2019
		EP 3402519 A1	21-11-2018
		JP 2019509055 A	04-04-2019
		MA 43874 A	21-11-2018
		US 2019031785 A1	31-01-2019
		WO 2017124002 A1	20-07-2017
WO 2016046778 A2	31-03-2016	AU 2015323313 A1	16-03-2017
		CA 2960128 A1	31-03-2016
		EP 3197916 A2	02-08-2017
		JP 2017529853 A	12-10-2017
		JP 2020188772 A	26-11-2020
		US 2017247476 A1	31-08-2017
		WO 2016046778 A2	31-03-2016
WO 2017162587 A1	28-09-2017	AR 107946 A1	28-06-2018
		AR 120543 A2	23-02-2022
		AU 2017237376 A1	02-08-2018
		BR 112018016281 A2	02-01-2019
		CA 3012422 A1	28-09-2017
		CN 108884170 A	23-11-2018
		CO 2018007556 A2	31-07-2018
		CR 20180453 A	05-12-2018
		EP 3433280 A1	30-01-2019
		KR 20180128407 A	03-12-2018
		PE 20181891 A1	11-12-2018
		SG 11201808085W A	30-10-2018
		WO 2017162587 A1	28-09-2017
WO 2020264200 A1	30-12-2020	AU 2020308868 A1	20-01-2022
		BR 112021026089 A2	22-03-2022
		CA 3143519 A1	30-12-2020
		CL 2021003448 A1	09-09-2022
		CN 115175933 A	11-10-2022
		CO 2022000406 A2	31-05-2022
		CR 20210628 A	22-03-2022
		EC SP22005986 A	29-04-2022
		EP 3990497 A1	04-05-2022
		IL 289102 A	01-02-2022
		JP 2022537824 A	30-08-2022
		KR 20220038068 A	25-03-2022
		PE 20220600 A1	25-04-2022
		US 2021054077 A1	25-02-2021

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/065191

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2023121775 A1	20-04-2023
		WO 2020264200 A1	30-12-2020
WO 2022170740 A1	18-08-2022	TW 202246337 A	01-12-2022
		WO 2022170619 A1	18-08-2022
		WO 2022170740 A1	18-08-2022
		WO 2022171192 A1	18-08-2022

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N

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

弁理士 富樫 征也

(72)発明者 ペイドウンガット, マダン エム.

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

(72)発明者 ミトラ, サヤンタン

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

(72)発明者 フォックス, エレイン アン マリアーノ

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

(72)発明者 ヴィノード, ヴィーナ

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

(72)発明者 バティル, ソナリ アルン

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

(72)発明者 バウスタニー, レイラ エム.

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

F ターム (参考)

4B064 AG26 AG27 CA19 CC24 CE10 DA01
4B065 AA01X AA57X AA83X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25
CA44
4C076 AA95 BB11 CC27 CC41 EE41 EE59
4C085 AA14 BB31 CC23 DD61 EE01 GG01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74
GA21