(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2017-200955
(P2017-200955A)
(43)公開日　平成29年11月9日(2017.11.9)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/00	***(2006.01)***	C07K	16/00	ZNA	4C076
C07K 19/00	***(2006.01)***	C07K	19/00		4C084
C07K 16/46	***(2006.01)***	C07K	16/46		4C085
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P	35/00		4H045
A61K 39/395	***(2006.01)***	A61K	39/395	L	

審査請求 有　請求項の数 1　OL　外国語出願　（全 134 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-157121 (P2017-157121)
(22)出願日　平成29年8月16日 (2017.8.16)
(62)分割の表示　特願2015-146530 (P2015-146530)の分割
原出願日　平成22年1月12日 (2010.1.12)
(31)優先権主張番号　61/249,441
(32)優先日　平成21年10月7日 (2009.10.7)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/144,110
(32)優先日　平成21年1月12日 (2009.1.12)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/144,105
(32)優先日　平成21年1月12日 (2009.1.12)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　510046457
サイトムエックス　セラピューティクス，インク.
ＣｙｔｏｍＸ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ.
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９４０８０，サウス　サンフランシスコ，オイスター　ポイント　ブールバード　３４３，スイート　１００
３４３　Ｏｙｓｔｅｒ　Ｐｏｉｎｔ　Ｂｏｕｌｅｖａｒｄ，Ｓｕｉｔｅ　１００，Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ，９４０８０　Ｕ.Ｓ.Ａ.

最終頁に続く

(54)【発明の名称】改変した抗体組成物、それを作製および使用する方法

(57)【要約】
【課題】改変した抗体組成物、それを作製および使用する方法の提供。
【解決手段】本開示は、マスキング部分（ＭＭ）で改変した抗体または抗体断片（ＡＢ）を含有する改変抗体を提供する。そのような改変抗体は切断可能な部分（ＣＭ）とさらにカップリングして活性化可能な抗体（ＡＡ）をもたらすことができ、ＣＭは、切断、還元もしくは光分解、または他の様式で改変することができる。ＡＡは、ＡＢが、たとえば、ＣＭを切断、還元、または光分解することができる薬剤の存在下におけるＣＭの切断、還元、または光分解によるＭＭの除去の後に、標的により接近可能となるような、活性化可能なコンホメーションを示すことができる。本開示は、そのような改変抗体および活性化可能な抗体を作製および使用する方法をさらに提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
図面に記載された発明。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
この出願は、２００９年１月１２日に出願された米国仮出願第６１／１４４，１１０号、２００９年１月１２日に出願された同第６１／１４４，１０５号、２００９年１０月７日に出願された同第６１／２４９，４４１号および２００９年１０月７日に出願された同第６１／２４９，４１６号の利益を主張する。これらの出願は、それらの全体が参考として本明細書に援用される。
【背景技術】
【０００２】
タンパク質に基づいた治療は様々な異なる疾患において応用を見出し、医学の様相を変えている。特定の抗体に基づいた治療は、一部の疾患には有効な処置が証明されているが、一部の例では、幅広い標的発現が原因の毒性によりその治療有効性が制限されている。
【０００３】
しかし、どの薬物でもそうであるように、その標的に対する特異性および選択性が向上した薬物の必要性および要求は、特に、それが結合する公知の標的を有する第二世代の抗体に基づいた薬物の開発において、大変興味深い。疾患部位に対する抗体の標的化の増加は、全身性の機構に基づいた毒性を低下させ、より幅広い治療上の有用性をもたらす可能性がある。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
小分子薬物の領域では、活性化学物質のプロドラッグを提供するための戦略が開発されている。そのようなプロドラッグは、比較的不活性（または活性が有意により低い）形態で投与する。投与後、プロドラッグはｉｎ　ｖｉｖｏで活性化合物へと代謝される。そのようなプロドラッグ戦略では、その意図する標的に対する薬物の選択性の増加および有害作用の低下をもたらすことができる。酸化還元の活性化を用いて低酸素癌細胞を標的とするために使用する薬物は、低酸素細胞中に存在する大量のレダクターゼ酵素を利用して、薬物をその細胞毒性がある形態へと変換し、それを本質的に活性化させる。プロドラッグはこの活性化前は細胞毒性が低いため、非癌細胞に対する損傷の危険性は顕著に減少しており、したがって、薬物に関連する副作用の低下がもたらされる。当分野では、プロドラッグの特長を抗体に基づいた治療学に提供する戦略の必要性が存在する。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
本開示は、治療学および診断学に有用な、改変した活性化可能な抗体組成物を提供する。この活性化可能な抗体組成物は、プロドラッグの特長を有する慣用の抗体治療剤と比較して、増加したバイオアベイラビリティおよび体内分布を示す。また、診断学および治療学において使用する方法、ならびにそのような組成物をスクリーニングおよび構築する方法も提供する。
【０００６】
一態様では、本開示は、その標的と特異的に結合することができ、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む改変抗体であって、ＭＭのカップリングにより、標的に対するＭＭとカップリングしたＡＢの解離定数（K_d）が前記標的に対するＭＭとカップリングしていないＡＢのK_dよりも少なくとも１００倍高い、少なくとも１０００倍高い、または少なくとも１０，０００倍高くなるように、ＡＢがその標的と結合する能力が低下する、改変抗体を提供する。

【０００７】
別の態様では、本開示は、その標的と特異的に結合することができ、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む改変抗体であって、ＭＭとＡＢとのカップリングにより、標的置換アッセイを用いてｉｎ　ｖｉｔｒｏでアッセイした場合に、ＡＢが標的と結合する能力が、ＭＭとカップリングしていないＡＢが標的と結合する能力と比較して少なくとも９０％低下する、改変抗体を提供する。そのようなＭＭとＡＢとのカップリングにより、ＡＢがその標的と結合する能力が、少なくとも１２時間の間または少なくとも２４時間の間または少なくとも７２時間の間低下する。
【０００８】
別の態様では、改変抗体は切断可能な部分（ＣＭ）とさらにカップリングしている。ＣＭは酵素によって切断することができるか、またはＣＭは還元剤によって還元することができるか、またはＣＭは光分解することができる。ＣＭは、少なくとも約$1\times10^{4}M^{-1}S^{-1}$、または少なくとも$5\times10^{4}M^{-1}S$、または少なくとも$10\times10^{4}M^{-1}S$の速度で特異的に切断、還元、または光分解することができる。一実施形態では、改変抗体のＣＭはＭＭ内にある。
【０００９】
本明細書中で提供する改変抗体中の、ＡＢに対するＭＭの解離定数（K_d）は、通常、標的に対するＡＢのK_dよりも少なくとも１００倍高い。一般に、ＡＢに対するＭＭのK_dは、１０ｎＭ未満、または５ｎＭ未満、または約１ｎＭである。
【００１０】
一部の実施形態では、改変抗体のＭＭは、ＡＢの抗原結合ドメインと特異的に結合することによって、その標的と結合するＡＢの能力を低下させる。そのような結合は非共有結合であることができる。改変抗体のＭＭは、その標的とアロステリックまたは立体的に結合するＡＢの能力を低下させることができる。具体的な実施形態では、改変抗体のＭＭは、ＡＢの天然の結合パートナーに対して５０％より高いアミノ酸配列類似性を含まない。
【００１１】
具体的な実施形態では、改変抗体のＡＢは、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ｓｃＦｖ、ｓｃＡＢ、ｄＡｂ、単一ドメイン重鎖抗体、および単一ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体断片である。
【００１２】
関連する実施形態では、改変抗体のＡＢは、表２の抗体からなる群より選択されるか、または、具体的には、ＡＢの供給源は、セツキシマブ（ｃｅｔｕｘｉｍａｂ）、パニツムマブ（ｐａｎｉｔｕｍｕｍａｂ）、インフリキシマブ（ｉｎｆｌｉｘｉｍａｂ）、アダリムマブ（ａｄａｌｉｍｕｍａｂ）、エファリツマブ（ｅｆａｌｉｚｕｍａｂ）、イピリムマブ（ｉｐｉｌｉｍｕｍａｂ）、トレメリムマブ（ｔｒｅｍｅｌｉｍｕｍａｂ）、アデカツムマブ（ａｄｅｃａｔｕｍｕｍａｂ）、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ（ａｌｅｍｔｕｚｕｍａｂ）、ラニビズマブ（ｒａｎｉｂｉｚｕｍａｂ）、トシツモマブ（ｔｏｓｉｔｕｍｏｍａｂ）、イブリツモマブチウキセタン（ｉｂｒｉｔｕｍｏｍａｂ　ｔｉｕｘｅｔａｎ）、リツキシマブ（ｒｉｔｕｘｉｍａｂ）、インフリキシマブ（ｉｎｆｌｉｘｉｍａｂ）、ベバシズマブ（ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）、もしくはフィギツムマブ（ｆｉｇｉｔｕｍｕｍａｂ）である。具体的な実施形態では、改変抗体はアレムツズマブではない。
【００１３】
関連する実施形態では、ＡＢの標的は、表１の標的からなる群より選択される。例示的な実施形態では、標的は、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である。具体的な一実施形態では、標的はＣＤ５２ではない。
【００１４】
具体的な実施形態では、改変抗体は第２のＡＢをさらに含み、第２のＡＢの標的は表１

の標的からなる群より選択される。

【００１５】

関連する実施形態では、ＣＭは表３の酵素からなる群より選択される酵素の基質である。具体的な実施形態では、ＣＭは、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である。改変したＡＢがＣＭを含む、そのような実施形態では、ＡＢは表２の抗体からなる群より選択され、具体的には、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブからであることができる。例示的な一実施形態では、ＡＢはアレムツズマブではない。

【００１６】

改変抗体がＣＭおよびＭＭとカップリングしたＡＢを含む一実施形態では、標的は表１の標的からなる群より選択されるか、または、標的は、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、もしくはＩＬ４である。例示的な一実施形態では、標的はＣＤ５２ではない。

【００１７】

改変抗体は、酵素によって特異的に修飾することができる第２の切断可能な部分（ＣＭ）とさらにカップリングしていることができる。この実施形態では、第２の切断可能は、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である。

【００１８】

別の具体的な実施形態では、改変抗体はＡＢとＭＭとの間に位置するリンカーペプチドをさらに含むか、または、改変抗体はＭＭとＣＭとの間に位置するリンカーペプチドをさらに含むか、または、改変抗体はＡＢとＣＭとの間に位置するリンカーペプチドをさらに含むか、または、改変抗体は、第１のリンカーペプチドがＡＢとＣＭとの間に位置し、第２のリンカーペプチドがＭＭとＣＭとの間に位置する、２つのリンカーペプチドをさらに含む。リンカーは、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、および分枝状リンカーからなる群より選択される。

【００１９】

特定の実施形態では、改変抗体は検出可能な部分をさらに含む。具体的な一実施形態では、検出可能な部分は診断剤である。

【００２０】

特定の一実施形態では、本明細書中に記載の改変抗体は、ＡＢと結合体化した薬剤をさらに含む。一態様では、薬剤は治療剤、たとえば抗腫瘍剤である。そのような実施形態では、薬剤はＡＢの炭水化物部分と結合体化しており、炭水化物部分は、ＡＢの抗原結合領域の外に配置されていることができる。あるいは、薬剤はＡＢのスルフヒドリル基と結合体化している。

【００２１】

本明細書中で提供する改変抗体は、生物に投与した場合に少なくとも５日間の血清半減期を示す。

【００２２】

本明細書中で提供する改変抗体の一部のＭＭのコンセンサス配列は、ＣＩＳＰＲＧＣ、Ｃ（Ｎ／Ｐ）Ｈ（ＨＶＦ）（Ｙ／Ｔ）（Ｆ／Ｗ／Ｔ／Ｌ）（Ｙ／Ｇ／Ｔ／Ｓ）（Ｔ／Ｓ／Ｙ／Ｈ）ＣＧＣＩＳＰＲＧＣＧ、ｘＣｘｘＹＱＣＬｘｘｘｘｘｘ、ＸＸＱＰｘＰＰＲＶＸ

Ｘ、ＰｘＰＧＦＰＹＣｘｘｘｘ、ｘｘｘｘＱｘｘＰＷＰＰ、ＧｘＧｘＣＹＴＩＬＥｘｘＣｘｘｘＲ、ＧｘｘｘＣＹｘＩｘＥｘｘＣｘｘｘｘ、ＧｘｘｘＣＹｘＩｘＥｘＷＣｘｘｘｘ、ｘｘｘＣＣｘｘＹｘＩｘｘＣＣｘｘｘ、またはｘｘｘｘｘＹｘＩＬＥｘｘｘｘｘである。具体的な実施形態では、コンセンサス配列は、抗ＶＥＧＦ抗体、抗ＥＦＧＲ抗体、または抗ＣＴＬＡ－４抗体との結合に特異的である。

【００２３】

関連する態様では、本開示は、その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片（ＡＢ）と、ＡＢとその標的との特異的結合を阻害することができる、ＡＢとカップリングしたマスキング部分（ＭＭ）と、酵素によって特異的に切断することができるＡＢとカップリングした切断可能な部分（ＣＭ）とを含む活性化可能な抗体（ＡＡ）であって、ＡＡがＣＭを切断するために十分な酵素活性の存在下にない場合に、ＭＭは、ＡＡがＣＭを切断するために十分な酵素活性の存在下にあってＭＭがＡＢとその標的との特異的結合を阻害しない場合と比較して、ＡＢとその標的との特異的結合を少なくとも９０％低下させる、活性化可能な抗体（ＡＡ）を提供する。具体的な実施形態では、ＡＢとその標的との結合が、少なくとも１２時間の間、または少なくとも２４時間の間、または少なくとも７２時間の間低下される。

【００２４】

一実施形態では、ＡＡ中、標的に対するＭＭおよびＣＭとカップリングしたＡＢの解離定数（K_d）は、標的に対するＭＭおよびＣＭとカップリングしていないＡＢのK_dよりも少なくとも１００倍高い。関連する実施形態では、ＡＢに対するＭＭの解離定数（K_d）は、標的に対するＡＢのK_dよりも少なくとも１００倍高い。一般に、ＡＢに対するＭＭのK_dは、１０ｎＭ未満、または５ｎＭ未満、または約１ｎＭである。

【００２５】

ＡＡの一部の実施形態では、ＭＭはＡＢの抗原結合ドメインと特異的に結合することができる。

【００２６】

ＡＡの一部の実施形態では、ＣＭは、酵素によって、少なくとも約$1\times10^{4}M^{-1}S^{-1}$、または少なくとも$5\times10^{4}M^{-1}S$、または少なくとも$10\times10^{4}M^{-1}S$の速度で特異的に切断することができる。

【００２７】

ＡＢが抗体断片であるＡＡの特定の実施形態では、抗体断片は、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ｓｃＦｖ、ｓｃＡＢ、ｄＡｂ、単一ドメイン重鎖抗体、および単一ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される。

【００２８】

特定の実施形態では、ＡＡのＡＢは、表２の抗体からなる群より選択される。具体的な実施形態では、ＡＢは、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである。

【００２９】

特定の実施形態では、ＡＡの標的は、表１の標的からなる群より選択される。具体的な実施形態では、標的は、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である。

【００３０】

具体的な一実施形態では、ＡＢはアレムツズマブではなく、標的はＣＤ５２ではない。

【００３１】

特定の実施形態では、ＡＡのＣＭは、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４

、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である。具体的な実施形態では、ＡＡは、酵素によって特異的に修飾することができる第２の切断可能な部分（ＣＭ）とさらにカップリングしている。この実施形態では、第２のＣＭは、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である。

【００３２】

本明細書中に提供するＡＡの一部の実施形態では、ＣＭはＭＭ内に位置する。

【００３３】

本明細書中に提供するＡＡの一部の実施形態では、ＭＭは、ＡＢの天然の結合パートナーに対して５０％より高いアミノ酸配列類似性を含まない。

【００３４】

一部の実施形態では、ＡＡは、ＭＭとＣＭとの間に位置するリンカーペプチドをさらに含む。具体的な実施形態では、リンカーペプチドはＡＢとＣＭとの間に位置する。

【００３５】

特定の実施形態では、本明細書中に提供するＡＡは、ＡＢと結合体化した検出可能な部分または薬剤をさらに含む。

【００３６】

さらに別の態様では、本開示は、それぞれがその標的と特異的に結合することができる、２つの抗体または抗体断片（ＡＢ１およびＡＢ２）と、ＡＢ１およびＡＢ２とその標的との特異的結合を阻害することができる、ＡＢ１またはＡＢ２のどちらかとカップリングした少なくとも１つのマスキング部分（ＭＭ）と、酵素によって特異的に切断されて、ＡＣ組成物を活性化することができる、ＡＢ１またはＡＢ２のどちらかとカップリングした少なくとも１つの切断可能な部分（ＣＭ）とを含む活性化可能な抗体複合体（ＡＡＣ）であって、ＡＡＣが切断されていない状態である場合、ＭＭはＡＢ１およびＡＢ２とその標的との特異的結合を阻害し、ＡＡＣが切断された状態である場合、ＭＭはＡＢ１およびＡＢ２とその標的との特異的結合を阻害しない、活性化可能な抗体複合体（ＡＡＣ）を提供する。

【００３７】

一実施形態では、ＡＡＣは二重特異的であり、ＡＢ１およびＡＢ２は同じ標的上の同じエピトープと結合するか、またはＡＢ１およびＡＢ２は同じ標的上の異なるエピトープと結合するか、またはＡＢ１およびＡＢ２は異なる標的上の異なるエピトープと結合する。

【００３８】

ＡＡＣの一実施形態では、ＣＭは、酵素によって少なくとも約$1\times10^{4}M^{-1}S^{-1}$の速度で特異的に切断することができる。

【００３９】

ＡＡＣのＡＢ１またはＡＢ２が抗体断片である実施形態では、抗体断片は、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ｓｃＦｖ、ｓｃＡＢ、ｄＡｂ、単一ドメイン重鎖抗体、および単一ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される。

【００４０】

ＡＡＣの一実施形態では、ＡＢ１および／またはＡＢ２は、表２の抗体からなる群より選択される。具体的な実施形態では、ＡＢ１および／またはＡＢ２は、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである。

【００４１】

ＡＡＣの一実施形態では、ＡＢ１および／またはＡＢ２の標的は、表１の標的からなる群より選択される。関連する実施形態では、ＡＢ１および／またはＡＢ２の標的は、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、

ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である。具体的な実施形態では、ＡＢ１およびＡＢ２は、それぞれ、ＥＧＦＲおよびＶＥＧＦ、Ｎｏｔｃｈ受容体およびＥＧＦＲ、ＪａｇｇｅｄリガンドおよびｃＭＥＴおよびＶＥＧＦと結合することができる。

【００４２】

関連するＡＡＣの実施形態では、ＣＭは表３の酵素からなる群より選択される酵素の基質である。具体的な実施形態では、ＣＭは、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である。さらに別の具体的な実施形態では、ＡＡＣは、酵素によって特異的に切断することができる第２の切断可能な部分（ＣＭ）とさらにカップリングしており、第２のＣＭは、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である。

【００４３】

ＡＡＣの具体的な実施形態では、ＭＭは、ＡＢの天然の結合パートナーに対して５０％より高いアミノ酸配列類似性を含まない。

【００４４】

ＡＡＣの他の具体的な実施形態では、ＡＡＣは、検出可能な部分をさらに含む、または薬剤とさらに結合体化している。

【００４５】

また、本明細書中では、被験体における状態を処置または診断する方法であって、その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片（ＡＢ）と、ＡＢとその標的との特異的結合を阻害することができる、ＡＢとカップリングしたマスキング部分（ＭＭ）と、酵素によって特異的に切断することができるＡＢとカップリングした切断可能な部分（ＣＭ）とを含む組成物を被験体に投与することを含み、被験体に投与した際、ＡＡがＣＭを切断するために十分な酵素活性の存在下にない場合に、ＭＭは、ＡＡがＣＭを切断するために十分な酵素活性の存在下にあってＭＭがＡＢとその標的との特異的結合を阻害しない場合と比較して、ＡＢとその標的との特異的結合を少なくとも９０％低下させる、方法も提供する。

【００４６】

本方法では、ＡＢは、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ｓｃＦｖ、ｓｃＡＢ、ｄＡｂ、単一ドメイン重鎖抗体、および単一ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される。

【００４７】

具体的な実施形態では、状態は癌である。

【００４８】

別の具体的な実施形態では、ＭＭはＡＢの天然の結合パートナーではない。

【００４９】

本方法の様々な実施形態では、ＡＢは表２の抗体からなる群より選択される。具体的には、一部の実施形態では、ＡＢは、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである。

【００５０】

本方法の様々な実施形態では、標的は表１の標的の群から選択される。具体的な実施形態では、標的は、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４であ

る。
【００５１】
本方法の非常に具体的な一実施形態では、ＡＢはアレムツズマブではなく、標的はＣＤ５２ではない。
【００５２】
本方法の様々な実施形態では、ＣＭは表３の酵素からなる群より選択される酵素の基質である。具体的な実施形態では、ＣＭは、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である。
【００５３】
また、本明細書中では、哺乳動物被験体において血管形成を阻害する方法であって、それを必要としている被験体に、治療上有効な量の、改変したＡＢ、ＡＡ、ＡＡＣ、またはＡＡＣＪを含む医薬組成物を投与することを含み、標的は、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である、方法も提供する。具体的な実施形態では、ＡＢは、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブであり、ＣＭは、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である。
【００５４】
また、本明細書中では、活性化可能な抗体（ＡＡ）組成物を作製する方法であって、その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片（ＡＢ）を提供するステップと、ＡＢとその標的との特異的結合を阻害することができるマスキング部分（ＭＭ）を、ＡＢとカップリングさせるステップと、酵素によって特異的に切断することができる切断可能な部分（ＣＭ）を、ＡＢとカップリングさせるステップとを含み、標的に対するＭＭとカップリングしたＡＢの解離定数（K_d）が標的に対するＭＭとカップリングしていないＡＢのK_dよりも少なくとも１００倍高い、方法も提供する。
【００５５】
本方法の一実施形態では、ＡＢは、表２の抗体からなる群より選択される抗体であるか、またはそれに由来する。具体的な実施形態では、ＡＢは、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブであるか、またはそれに由来する。
【００５６】
非常に具体的な一実施形態では、ＡＢはアレムツズマブではなく、標的はＣＤ５２ではない。
【００５７】
本方法の別の実施形態では、ＣＭは表３の酵素からなる群より選択される酵素の基質である。具体的な実施形態では、ＣＭは、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である。
【００５８】
また、本明細書中では、候補ペプチドをスクリーニングして抗体または抗体断片（ＡＢ）と結合することができるマスキング部分（ＭＭ）ペプチドを同定する方法であって、それぞれのペプチド足場が膜貫通タンパク質（ＴＭ）および候補ペプチドを含む、ペプチド

足場のライブラリを提供するステップと、ＡＢをライブラリと接触させるステップと、ＡＢと結合することができる少なくとも１つの候補ペプチドを同定するステップと、ＡＢに対する候補ペプチドの解離定数（K_d）が１～１０ｎＭであるかどうかを決定するステップとを含む方法も提供する。

【００５９】

本方法の様々な実施形態では、ライブラリはウイルス、細胞または胞子を含む。具体的な一実施形態では、ライブラリはＥ．ｃｏｌｉを含む。別の実施形態では、ペプチド足場は検出可能な部分をさらに含む。

【００６０】

また、最適なマスキング効率で抗体または抗体断片（ＡＢ）をマスキングすることができるマスキング部分（ＭＭ）ペプチドを同定するための別のスクリーニング方法であって、それぞれが候補ペプチドとカップリングした、標的と特異的に結合することができる複数のＡＢを含むライブラリを提供するステップと、それぞれのライブラリメンバーを標的と共にインキュベートするステップと、標的に対するそれぞれのライブラリメンバーの結合親和性を、標的に対する候補ペプチドとカップリングしていないそれぞれのＡＢの結合親和性と比較するステップとを含む方法も提供する。具体的な実施形態では、最適な結合効率は、標的に対するライブラリメンバーの結合親和性が、標的に対する改変していないＡＢの結合親和性と比較して１０％である場合である。

【００６１】

また、一態様では、本明細書中では、第１の組織中での抗体治療剤とその標的との結合の親和性が、抗体治療剤と第２の組織中のその標的との結合よりも低い、バイオアベイラビリティが向上した抗体治療剤も提供する。また、関連する態様では、本明細書中では、その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片（ＡＢ）と、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物であって、第１の組織中の標的に対する抗体または抗体断片の親和性は、第２の組織中の標的に対する抗体または抗体断片の親和性よりも低い、医薬組成物も提供する。具体的な実施形態では、第１の組織中での親和性は、第２の組織中での親和性の１０～１．０００分の１である。一実施形態では、ＡＢは、ＡＢとその標的との結合を還元することができるマスキング部分（ＭＭ）および酵素によって特異的に切断することができる切断可能な部分（ＣＭ）とカップリングしている。

【００６２】

関連する実施形態では、標的は、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である。関連する実施形態では、ＣＭは、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である。関連する実施形態では、抗体または抗体断片は、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである。

【００６３】

具体的な実施形態では、第１の組織は健康な組織であり、第２の組織は罹患した組織であるか、または、第１の組織は早期腫瘍であり、第２の組織は末期腫瘍であるか、第１の組織は良性腫瘍であり、第２の組織は悪性腫瘍であるか、または、第１の組織および第２の組織は空間的に分離されているか、または、第１の組織は上皮組織であり、第２の組織は、乳房、頭部、頸部、肺、膵臓、神経系、肝臓、前立腺、泌尿生殖器、もしくは子宮頸部（ｃｅｒｅｖｉｃａｌ）の組織である。

【００６４】

一実施形態では、抗体治療剤は薬剤とさらにカップリングしている。具体的な実施形態

では、薬剤は抗腫瘍剤である。

【００６５】

また、本明細書中では、診断的および治療的使用のための具体的な組成物も提供する。本明細書中では、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、レグマインで活性化可能な抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、カスパーゼで活性化可能な抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ＴＭＰＲＳＳ－３／４で活性化可能な抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ＰＳＡで活性化可能な抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、カテプシンで活性化可能な抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ヒト好中球エラスターゼで活性化可能な抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ベーターセクレターゼで活性化可能な抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ｕＰＡで活性化可能な抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ＴＭＰＲＳＳ－３／４で活性化可能な抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ＭＴ１－ＭＭＰで活性化可能な抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＥＧＦＲ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＴＮＦアルファ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＣＤ１１ａ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＣＳＦＲ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＣＴＬＡ－４抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＥｐＣＡＭ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＣＤ４０Ｌ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＮｏｔｃｈ１抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＮｏｔｃｈ３抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＪａｇｇｅｄ１抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＪａｇｇｅｄ２抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なセツキシマブ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なｖｅｃｔｉｂｉｘ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なインフリキシマブ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なアダリムマブ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なエファリズマブ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なイピリムマブ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なトレメリムマブ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物、またはマスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なアデカツムマブ抗体もしくは抗体断片（ＡＢ）を含む組成物を提供する。

【００６６】

参考としての組み込み

本明細書中で言及するすべての出版物、特許、および特許出願は、それぞれの個々の出版物、特許、または特許出願が具体的かつ個々に参考として組み込まれていると示されている場合と同程度に、本明細書中に参考として組み込まれている。

【００６７】
本発明の新規特長は、添付の特許請求の範囲中に詳細に記載されている。本発明の特長および利点のより良好な理解は、本発明の原理を利用した例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、およ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。
したがって、本発明は、以下の項目を提供する：
（項目１）
その標的と特異的に結合することができ、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む改変抗体であって、上記ＭＭのカップリングにより、上記標的に対する上記ＭＭとカップリングした上記ＡＢの解離定数（K_d）が上記標的に対する上記ＭＭとカップリングしていない上記ＡＢのK_dの少なくとも１００倍になるように、上記ＡＢがその標的と結合する能力が低下する、改変抗体。
（項目２）
上記標的に対する上記ＭＭとカップリングした上記ＡＢのK_dが、上記標的に対する上記ＭＭとカップリングしていない上記ＡＢのK_dの少なくとも１０００倍である、項目１に記載の改変抗体。
（項目３）
上記標的に対する上記ＭＭとカップリングした上記ＡＢのK_dが、上記標的に対する上記ＭＭとカップリングしていない上記ＡＢのK_dの少なくとも１０，０００倍である、項目１に記載の改変抗体。
（項目４）
標的の存在下で、上記ＭＭと上記ＡＢとのカップリングにより、標的置換アッセイを用いてｉｎ　ｖｉｔｒｏでアッセイした場合に、上記ＡＢがその標的と結合する能力が、上記ＭＭとカップリングしていない上記ＡＢがその標的と結合する能力と比較して少なくとも９０％低下する、項目１に記載の改変抗体。
（項目５）
上記ＭＭと上記ＡＢとのカップリングにより、上記ＡＢがその標的と結合する能力が少なくとも１２時間の間低下する、項目４に記載の改変抗体。
（項目６）
上記ＭＭと上記ＡＢとのカップリングにより、上記ＡＢがその標的と結合する能力が少なくとも２４時間の間低下する、項目４に記載の改変抗体。
（項目７）
上記ＭＭと上記ＡＢとのカップリングにより、上記ＡＢがその標的と結合する能力が少なくとも７２時間の間低下する、項目４に記載の改変抗体。
（項目８）
上記ＡＢに対する上記ＭＭの解離定数（K_d）が、上記標的に対する上記ＡＢのK_dの少なくとも１００倍である、項目１に記載の改変抗体。
（項目９）
上記ＡＢに対する上記ＭＭのK_dが１０ｎＭ未満である、項目８に記載の改変抗体。
（項目１０）
上記ＡＢに対する上記ＭＭのK_dが５ｎＭ未満である、項目８に記載の改変抗体。
（項目１１）
上記ＡＢに対する上記ＭＭのK_dが約１ｎＭである、項目８に記載の改変抗体。
（項目１２）
切断可能な部分（ＣＭ）とさらにカップリングしている、項目１に記載の改変抗体。
（項目１３）
上記ＣＭを酵素によって切断することができる、項目１２に記載の改変抗体。
（項目１４）
上記ＣＭを還元剤によって還元することができる、項目１２に記載の改変抗体。
（項目１５）
上記ＣＭを光分解することができる、項目１２に記載の改変抗体。

（項目１６）
上記ＭＭが上記ＡＢの抗原結合ドメインと特異的に結合することができる、項目１に記載の改変抗体。
（項目１７）
上記ＭＭと上記抗原結合ドメインとの結合が非共有結合である、項目１６に記載の改変抗体。
（項目１８）
上記ＭＭが、その標的とアロステリックに結合する上記ＡＢの能力を低下させる、項目１に記載の改変抗体。
（項目１９）
上記ＭＭが、その標的と立体的に結合する上記ＡＢの能力を低下させる、項目１に記載の改変抗体。
（項目２０）
上記ＣＭを、酵素によって少なくとも約$1\times10^{4}M^{-1}S^{-1}$の速度で特異的に切断することができる、項目１２に記載の改変抗体。
（項目２１）
上記ＣＭを、酵素によって少なくとも$5\times10^{4}M^{-1}S$の速度で特異的に切断することができる、項目２０に記載のＡＢ。
（項目２２）
上記ＣＭを、酵素によって少なくとも$10\times10^{4}M^{-1}S$の速度で特異的に切断することができる、項目２０に記載の改変抗体。
（項目２３）
上記抗体断片が、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ｓｃＦｖ、ｓｃＡＢ、ｄＡｂ、単一ドメイン重鎖抗体、および単一ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される、項目１に記載の改変抗体。
（項目２４）
上記ＡＢが表２の抗体からなる群より選択される、項目１に記載の改変抗体。
（項目２５）
上記ＡＢがアレムツズマブではない、項目２４に記載の改変抗体。
（項目２６）
上記ＡＢが、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目２４に記載の改変抗体。
（項目２７）
上記標的が表１の標的からなる群より選択される、項目１に記載の改変抗体。
（項目２８）
上記標的がＣＤ５２ではない、項目１に記載の改変抗体。
（項目２９）
上記標的が、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である、項目２７に記載の改変抗体。
（項目３０）
第２のＡＢをさらに含み、上記第２のＡＢの標的が表１の標的からなる群より選択される、項目１に記載の改変抗体。
（項目３１）
上記ＣＭが上記ＭＭ内に位置する、項目１２に記載の改変抗体。
（項目３２）

上記ＣＭが表３の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目１２に記載の改変抗体。
（項目３３）
上記ＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目３２に記載の改変抗体。
（項目３４）
上記ＡＢが表２の抗体からなる群より選択される、項目３２に記載の改変抗体。
（項目３５）
上記ＡＢがアレムツズマブではない、項目３２に記載の改変抗体。
（項目３６）
上記ＡＢが、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目３４に記載の改変抗体。
（項目３７）
上記標的が表１の標的からなる群より選択される、項目３２に記載の改変抗体。
（項目３８）
上記標的がＣＤ５２ではない、項目３７に記載の改変抗体。
（項目３９）
上記標的が、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である、項目３７に記載の改変抗体。
（項目４０）
酵素によって特異的に修飾することができる第２の切断可能な部分（ＣＭ）とさらにカップリングしている、項目１２に記載の改変抗体。
（項目４１）
上記第２のＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目４０に記載の改変抗体。
（項目４２）
上記ＭＭが、上記ＡＢの天然の結合パートナーに対して５０％より高いアミノ酸配列類似性を含まない、項目１に記載の改変抗体。
（項目４３）
上記ＡＢと上記ＭＭとの間に位置するリンカーペプチドをさらに含む、項目１に記載の改変抗体。
（項目４４）
上記ＭＭと上記ＣＭとの間に位置するリンカーペプチドをさらに含む、項目１２に記載の改変抗体。
（項目４５）
上記ＡＢと上記ＣＭとの間に位置するリンカーペプチドをさらに含む、項目１２に記載の改変抗体。
（項目４６）
第１のリンカーペプチドが上記ＡＢと上記ＣＭとの間に位置し、第２のリンカーペプチドが上記ＭＭと上記ＣＭとの間に位置する、２つのリンカーペプチドをさらに含む、項目１２に記載の改変抗体。
（項目４７）
上記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、および分枝状リンカー

からなる群より選択される、項目４３に記載の改変抗体。
（項目４８）
上記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、および分枝状リンカーからなる群より選択される、項目４４に記載の改変抗体。
（項目４９）
上記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、および分枝状リンカーからなる群より選択される、項目４５に記載の改変抗体。
（項目５０）
上記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、および分枝状リンカーからなる群より選択される、項目４６に記載の改変抗体。
（項目５１）
検出可能な部分をさらに含む、項目１に記載の改変抗体。
（項目５２）
酵素によって特異的に修飾することができる上記ＡＢとカップリングした切断可能な部分（ＣＭ）をさらに含む、項目４７に記載の改変抗体。
（項目５３）
上記検出可能な部分が診断剤である、項目４７に記載の改変抗体。
（項目５４）
上記ＡＢと結合体化した薬剤をさらに含む、項目１に記載の改変抗体。
（項目５５）
上記薬剤が治療剤である、項目５４に記載の改変抗体。
（項目５６）
特異的に切断することができる上記ＡＢとカップリングした切断可能な部分（ＣＭ）をさらに含む、項目５４に記載の改変抗体。
（項目５７）
上記薬剤が抗腫瘍剤である、項目５６に記載の改変抗体。
（項目５８）
上記抗体または抗体断片が、表２の抗体からなる群より選択される、項目５６に記載の改変抗体。
（項目５９）
上記ＡＢがアレムツズマブではない、項目５６に記載の改変抗体。
（項目６０）
上記抗体または抗体断片が、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目５８に記載の改変抗体。
（項目６１）
上記標的が表１の標的からなる群より選択される、項目５６に記載の改変抗体。
（項目６２）
上記標的がＣＤ５２ではない、項目５６に記載の改変抗体。
（項目６３）
上記標的が、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である、項目６１に記載の改変抗体。
（項目６４）
上記ＣＭが表３の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目５６に記載の改変抗体。

（項目６５）
上記ＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目６４に記載の改変抗体。
（項目６６）
上記ＣＭを光分解によって切断することができる、項目５６に記載の改変抗体。
（項目６７）
上記薬剤が上記ＡＢの炭水化物部分と結合体化している、項目５４に記載の改変抗体。
（項目６８）
上記炭水化物部分が上記ＡＢの抗原結合領域の外に配置されている、項目６７に記載の改変抗体。
（項目６９）
上記薬剤が上記ＡＢのスルフヒドリル基と結合体化している、項目５４に記載の改変抗体。
（項目７０）
生物に投与した場合に、上記組成物の血清半減期が少なくとも５日間である、項目１２に記載の改変抗体。
（項目７１）
上記ＭＭのコンセンサス配列が、ＣＩＳＰＲＧＣ、Ｃ（Ｎ／Ｐ）Ｈ（ＨＶＦ）（Ｙ／Ｔ）（Ｆ／Ｗ／Ｔ／Ｌ）（Ｙ／Ｇ／Ｔ／Ｓ）（Ｔ／Ｓ／Ｙ／Ｈ）ＣＧＣＩＳＰＲＧＣＧ、ｘＣｘｘＹＱＣＬｘｘｘｘｘｘ、ＸＸＱＰｘＰＰＲＶＸＸ、ＰｘＰＧＦＰＹＣｘｘｘｘ、ｘｘｘｘＱｘｘＰＷＰＰ、ＧｘＧｘＣＹＴＩＬＥｘｘＣｘｘｘＲ、ＧｘｘｘＣＹｘＩｘＥｘｘＣｘｘｘｘ、ＧｘｘｘＣＹｘＩｘＥｘＷＣｘｘｘｘ、ｘｘｘＣＣｘｘＹｘＩｘｘＣＣｘｘ、またはｘｘｘｘｘＹｘＩＬＥｘｘｘｘｘである、項目１に記載の改変抗体。
（項目７２）
上記コンセンサス配列が、抗ＶＥＧＦ抗体、抗ＥＦＧＲ抗体、または抗ＣＴＬＡ－４抗体との結合に特異的である、項目５７に記載の改変抗体。
（項目７３）
その標的と特異的に結合することができ、マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む改変抗体であって、上記ＭＭと上記ＡＢとのカップリングにより、標的置換アッセイを用いてｉｎ　ｖｉｔｒｏでアッセイした場合に、上記ＡＢが上記標的と結合する能力が、上記ＭＭとカップリングしていない上記ＡＢが上記標的と結合する能力と比較して少なくとも９０％低下する、改変抗体。
（項目７４）
上記ＡＢと上記標的との結合が少なくとも１２時間の間低下される、項目７３に記載の改変抗体。
（項目７５）
上記ＡＢと上記標的との結合が少なくとも２４時間の間低下される、項目７３に記載の改変抗体。
（項目７６）
上記ＡＢと上記標的との結合が少なくとも７２時間の間低下される、項目７３に記載の改変抗体。
（項目７７）
上記標的に対する上記ＭＭとカップリングした上記ＡＢの解離定数（K_d）が上記標的に対する上記ＭＭとカップリングしていない上記ＡＢのK_dよりも少なくとも１００倍高い、項目７３に記載の改変抗体。
（項目７８）
上記ＡＢに対する上記ＭＭの解離定数（K_d）が上記標的に対する上記ＡＢのK_dよりも少なくとも１００倍高い、項目７３に記載の改変抗体。
（項目７９）

上記ＡＢに対する上記ＭＭのＫ$_d$が１０ｎＭ未満である、項目７８に記載の改変抗体。
（項目８０）
上記ＡＢに対する上記ＭＭのＫ$_d$が５ｎＭ未満である、項目７８に記載の改変抗体。
（項目８１）
上記ＡＢに対する上記ＭＭのＫ$_d$が約１ｎＭである、項目７８に記載の改変抗体。
（項目８２）
上記ＡＢと上記ＭＭとの間にリンカーをさらに含む、項目７３に記載の改変抗体。
（項目８３）
上記リンカーが切断可能な部分（ＣＭ）を含む、項目８２に記載の改変抗体。
（項目８４）
上記ＭＭが上記ＡＢの抗原結合ドメインと特異的に結合することができる、項目７３に記載の改変抗体。
（項目８５）
上記ＣＭを、酵素によって少なくとも１×１０^{4}Ｍ$^{-1}$Ｓ$^{-1}$の速度で特異的に切断することができる、項目８３に記載の改変抗体。
（項目８６）
上記ＣＭを、酵素によって少なくとも５×１０^{4}Ｍ$^{-1}$Ｓの速度で特異的に切断することができる、項目８３に記載の改変抗体。
（項目８７）
上記ＣＭを、酵素によって少なくとも１０×１０^{4}Ｍ$^{-1}$Ｓの速度で特異的に切断することができる、項目８３に記載の改変抗体。
（項目８８）
上記ＣＭを還元剤によって切断することができる、項目８３に記載の改変抗体。
（項目８９）
上記ＣＭを光分解によって切断することができる、項目８３に記載の改変抗体。
（項目９０）
上記抗体断片が、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ｓｃＦｖ、ｓｃＡＢ、ｄＡｂ、単一ドメイン重鎖抗体、および単一ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される、項目７３に記載の改変抗体。
（項目９１）
上記ＡＢが表２の抗体からなる群より選択される、項目７３に記載の改変抗体。
（項目９２）
上記ＡＢが、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目９１に記載の改変抗体。
（項目９３）
上記標的が表１の標的からなる群より選択される、項目７３に記載の改変抗体。
（項目９４）
上記標的が、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である、項目９３に記載の改変抗体。
（項目９５）
上記ＡＢがアレムツズマブではない、項目７３に記載の改変抗体。
（項目９６）
上記標的がＣＤ５２ではない、項目７３に記載の改変抗体。
（項目９７）
上記ＣＭが表３の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目８３に記載の

改変抗体。
（項目９８）
上記ＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目９７に記載の改変抗体。
（項目９９）
酵素によって特異的に修飾することができる第２の切断可能な部分（ＣＭ）とさらにカップリングしている、項目８３に記載の改変抗体。
（項目１００）
上記第２のＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目９９に記載の改変抗体。
（項目１０１）
上記ＭＭが、上記ＡＢの天然の結合パートナーに対して５０％より高いアミノ酸配列類似性を含まない、項目７３に記載の改変抗体。
（項目１０２）
検出可能な部分をさらに含む、項目７３に記載の改変抗体。
（項目１０３）
上記ＡＢと結合体化した薬剤をさらに含む、項目７３に記載の改変抗体。
（項目１０４）
（ａ）その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片（ＡＢ）と、
（ｂ）上記ＡＢとその標的との特異的結合を阻害することができる、上記ＡＢとカップリングしたマスキング部分（ＭＭ）と、
（ｃ）酵素によって特異的に切断することができる上記ＡＢとカップリングした切断可能な部分（ＣＭ）と
を含む活性化可能な抗体（ＡＡ）であって、
上記ＡＡが上記ＣＭを切断するために十分な酵素活性の存在下にない場合に、上記ＭＭが、上記ＡＡが上記ＣＭを切断するために十分な酵素活性の存在下にあって上記ＭＭが上記ＡＢとその標的との特異的結合を阻害しない場合と比較して、上記ＡＢとその標的との特異的結合を少なくとも９０％低下させる、活性化可能な抗体（ＡＡ）。
（項目１０５）
上記ＡＢとその標的との結合が少なくとも１２時間の間低下される、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１０６）
上記ＡＢとその標的との結合が少なくとも２４時間の間低下される、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１０７）
上記ＡＢとその標的との結合が少なくとも７２時間の間低下される、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１０８）
上記標的に対する上記ＭＭおよびＣＭとカップリングした上記ＡＢの解離定数（K_d）が、上記標的に対する上記ＭＭおよびＣＭとカップリングしていない上記ＡＢのK_dよりも少なくとも１００倍高い、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１０９）
上記ＡＢに対する上記ＭＭの解離定数（K_d）が上記標的に対する上記ＡＢのK_dよりも少なくとも１００倍高い、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１１０）
上記ＡＢに対する上記ＭＭのK_dが１０ｎＭ未満である、項目１０９に記載の改変抗体。
（項目１１１）

上記ＡＢに対する上記ＭＭのＫ$_{d}$が５ｎＭ未満である、項目１０９に記載の改変抗体。
（項目１１２）
上記ＡＢに対する上記ＭＭのＫ$_{d}$が約１ｎＭである、項目１０９に記載の改変抗体。
（項目１１３）
上記ＭＭが上記ＡＢの抗原結合ドメインと特異的に結合することができる、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１１４）
上記ＣＭを、酵素によって少なくとも約１×１０^{4}Ｍ$^{-1}$Ｓ$^{-1}$の速度で特異的に切断することができる、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１１５）
上記ＣＭを、酵素によって少なくとも５×１０^{4}Ｍ$^{-1}$Ｓの速度で特異的に還元することができる、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１１６）
上記ＣＭを、酵素によって少なくとも１０×１０^{4}Ｍ$^{-1}$Ｓの速度で特異的に還元することができる、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１１７）
上記抗体断片が、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ｓｃＦｖ、ｓｃＡＢ、ｄＡｂ、単一ドメイン重鎖抗体、および単一ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１１８）
上記ＡＢが表２の抗体からなる群より選択される、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１１９）
上記ＡＢが、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目１１８に記載のＡＡ。
（項目１２０）
上記標的が表１の標的からなる群より選択される、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１２１）
上記標的が、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である、項目１２０に記載のＡＡ。
（項目１２２）
上記ＡＢがアレムツズマブではない、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１２３）
上記標的がＣＤ５２ではない、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１２４）
上記ＣＭが表３の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１２５）
上記ＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目１２４に記載のＡＡ。
（項目１２６）
酵素によって特異的に修飾することができる第２の切断可能な部分（ＣＭ）とさらにカップリングしている、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１２７）
上記第２のＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、Ｍ

Ｔ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目１２６に記載のＡＡ。
（項目１２８）
上記ＣＭが上記ＭＭ内に位置する、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１２９）
上記ＭＭが、上記ＡＢの天然の結合パートナーに対して５０％より高いアミノ酸配列類似性を含まない、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１３０）
上記ＭＭと上記ＣＭとの間に位置するリンカーペプチドをさらに含む、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１３１）
上記ＡＢと上記ＣＭとの間に位置するリンカーペプチドをさらに含む、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１３２）
検出可能な部分をさらに含む、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１３３）
上記ＡＢと結合体化した薬剤をさらに含む、項目１０４に記載のＡＡ。
（項目１３４）
（ａ）それぞれがその標的と特異的に結合することができる、２つの抗体または抗体断片（ＡＢ１およびＡＢ２）と、
（ｂ）ＡＢ１およびＡＢ２とその標的との特異的結合を阻害することができる、ＡＢ１またはＡＢ２のどちらかとカップリングした少なくとも１つのマスキング部分（ＭＭ）と、
（ｃ）酵素によって特異的に切断されて、ＡＡＣ組成物を活性化することができる、ＡＢ１またはＡＢ２のどちらかとカップリングした少なくとも１つの切断可能な部分（ＣＭ）と
を含む活性化可能な抗体複合体（ＡＡＣ）であって、
上記ＡＡＣが切断されていない状態である場合、上記ＭＭはＡＢ１およびＡＢ２とその標的との特異的結合を阻害し、上記ＡＡＣが切断された状態である場合、上記ＭＭはＡＢ１およびＡＢ２とその標的との特異的結合を阻害しない、活性化可能な抗体複合体（ＡＡＣ）。
（項目１３５）
上記複合体が二重特異的である、項目１３４に記載の組成物。
（項目１３６）
ＡＢ１およびＡＢ２が同じ標的上の同じエピトープと結合する、項目１３４に記載の組成物。
（項目１３７）
ＡＢ１およびＡＢ２が同じ標的上の異なるエピトープと結合する、項目１３４に記載の組成物。
（項目１３８）
ＡＢ１およびＡＢ２が異なる標的上の異なるエピトープと結合する、項目１３４に記載の組成物。
（項目１３９）
上記ＣＭを、酵素によって少なくとも約$1\times10^{4}M^{-1}S^{-1}$の速度で特異的に切断することができる、項目１３４に記載の組成物。
（項目１４０）
上記抗体断片が、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ｓｃＦｖ、ｓｃＡＢ、ｄＡｂ、単一ドメイン重鎖抗体、および単一ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される、項目１３４に記載の組成物。
（項目１４１）

ＡＢ１および／またはＡＢ２が、表２の抗体からなる群より選択される、項目１３４に記載の組成物。
（項目１４２）
ＡＢ１および／またはＡＢ２が、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目１３４に記載の組成物。
（項目１４３）
上記標的が表１の標的からなる群より選択される、項目１３４に記載の組成物。
（項目１４４）
ＡＢ１および／またはＡＢ２が、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である、項目１３４に記載の組成物。
（項目１４５）
ＡＢ１およびＡＢ２が、それぞれ、ＥＧＦＲおよびＶＥＧＦ、Ｎｏｔｃｈ受容体およびＥＧＦＲ、ＪａｇｇｅｄリガンドおよびｃＭＥＴおよびＶＥＧＦと結合することができる、項目１３４に記載の組成物。
（項目１４６）
上記ＣＭが表３の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目１３４に記載の組成物。
（項目１４７）
上記ＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目１３４に記載の組成物。
（項目１４８）
酵素によって特異的に切断することができる第２の切断可能な部分（ＣＭ）とさらにカップリングしている、項目１３４に記載の組成物。
（項目１４９）
上記第２のＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目１４８に記載の組成物。
（項目１５０）
上記ＭＭが、上記ＡＢの天然の結合パートナーに対して５０％より高いアミノ酸配列類似性を含まない、項目１３４に記載の組成物。
（項目１５１）
検出可能な部分をさらに含む、項目１３４に記載の組成物。
（項目１５２）
上記ＡＢと結合体化した薬剤をさらに含む、項目１３４に記載の組成物。
（項目１５３）
被験体における状態を処置または診断する方法であって、
（ａ）その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片（ＡＢ）と、
（ｂ）上記ＡＢとその標的との特異的結合を阻害することができる、上記ＡＢとカップリングしたマスキング部分（ＭＭ）と、
（ｃ）酵素によって特異的に切断することができる上記ＡＢとカップリングした切断可能な部分（ＣＭ）と
を含む組成物を上記被験体に投与することを含み、
上記被験体に投与した際、上記ＡＡが上記ＣＭを切断するために十分な酵素活性の存在下

にない場合に、上記ＭＭが、上記ＡＡが上記ＣＭを切断するために十分な酵素活性の存在下にあって上記ＭＭが上記ＡＢとその標的との特異的結合を阻害しない場合と比較して、上記ＡＢとその標的との特異的結合を少なくとも９０％低下させる、方法。

（項目１５４）

上記ＡＢが、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、ｓｃＦｖ、ｓｃＡＢ、ｄＡｂ、単一ドメイン重鎖抗体、および単一ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される、項目１５３に記載の方法。

（項目１５５）

上記状態が癌である、項目１５３に記載の方法。

（項目１５６）

上記ＭＭが上記ＡＢの天然の結合パートナーではない、項目１５３に記載の方法。

（項目１５７）

上記ＡＢが表２の抗体からなる群より選択される、項目１５３に記載の方法。

（項目１５８）

上記ＡＢが、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目１５７に記載の方法。

（項目１５９）

上記標的が表１の標的の群から選択される、項目１５３に記載の方法。

（項目１６０）

上記標的が、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である、項目１５９に記載の方法。

（項目１６１）

上記ＡＢがアレムツズマブではない、項目１５３に記載の方法。

（項目１６２）

上記標的がＣＤ５２ではない、項目１５３に記載の方法。

（項目１６３）

上記ＣＭが表３の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目１５３に記載の方法。

（項目１６４）

上記ＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目１６３に記載の方法。

（項目１６５）

哺乳動物被験体において血管形成を阻害する方法であって、血管形成の阻害を必要としている被験体に、治療上有効な量の項目１２に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

（項目１６６）

上記標的が、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である、項目１６５に記載の方法。

（項目１６７）

上記ＡＢが、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマ

ブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目１６５に記載の方法。
（項目１６８）
上記ＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目１６５に記載の方法。
（項目１６９）
活性化可能な抗体（ＡＡ）組成物を作製する方法であって、
（ａ）その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片（ＡＢ）を提供するステップと、
（ｂ）上記ＡＢとその標的との特異的結合を阻害することができるマスキング部分（ＭＭ）を、上記ＡＢとカップリングさせるステップと、
（ｃ）酵素によって特異的に切断することができる切断可能な部分（ＣＭ）を、上記ＡＢとカップリングさせるステップと
を含み、
上記標的に対する上記ＭＭとカップリングした上記ＡＢの解離定数（K_d）が上記標的に対する上記ＭＭとカップリングしていない上記ＡＢのK_dよりも少なくとも１００倍高い、方法。
（項目１７０）
上記ＡＢが、表２の抗体からなる群より選択される抗体であるか、またはそれに由来する、項目１６６に記載の方法。
（項目１７１）
上記ＡＢが、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブであるか、あるいはそれに由来する、項目１６６に記載の方法。
（項目１７２）
上記ＡＢがアレムツズマブではない、項目１６６に記載の方法。
（項目１７３）
上記標的がＣＤ５２ではない、項目１６６に記載の方法。
（項目１７４）
上記ＣＭが表３の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目１６６に記載の方法。
（項目１７５）
上記ＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目１６６に記載の方法。
（項目１７６）
候補ペプチドをスクリーニングして抗体または抗体断片（ＡＢ）と結合することができるマスキング部分（ＭＭ）ペプチドを同定する方法であって、
（ａ）それぞれのペプチド足場が、
（ｉ）膜貫通タンパク質（ＴＭ）、および
（ｉｉ）候補ペプチド
を含む、ペプチド足場のライブラリを提供するステップと、
（ｂ）ＡＢを上記ライブラリと接触させるステップと、
（ｃ）上記ＡＢと結合することができる少なくとも１つの候補ペプチドを同定するステップと、
（ｄ）上記ＡＢに対する上記候補ペプチドの解離定数（K_d）が１～１０ｎＭであるかどうかを決定するステップと

を含む、方法。
（項目１７７）
上記ライブラリがウイルス、細胞または胞子を含む、項目１７６に記載の方法。
（項目１７８）
上記ライブラリがＥ．ｃｏｌｉを含む、項目１７６に記載の方法。
（項目１７９）
上記ペプチド足場が検出可能な部分をさらに含む、項目１７６に記載の方法。
（項目１８０）
候補ペプチドをスクリーニングして、最適なマスキング効率で抗体または抗体断片（ＡＢ）をマスキングすることができるマスキング部分（ＭＭ）ペプチドを同定する方法であって、
（ａ）それぞれが候補ペプチドとカップリングした、標的と特異的に結合することができる複数のＡＢを含むライブラリを提供するステップと、
（ｂ）それぞれのライブラリメンバーを上記標的と共にインキュベートするステップと、
（ｃ）上記標的に対するそれぞれのライブラリメンバーの結合親和性を、上記標的に対する候補ペプチドとカップリングしていないそれぞれのＡＢの結合親和性と比較するステップと
を含む、方法。
（項目１８１）
ステップｃにおいて、最適な結合効率が、上記標的に対するライブラリメンバーの結合親和性が、上記標的に対する改変していない上記ＡＢの結合親和性と比較して１０％である場合である、項目１８０に記載の方法。
（項目１８２）
上記ＡＢが同じである、項目１８０に記載の方法。
（項目１８３）
バイオアベイラビリティが向上した抗体治療剤であって、第１の組織中での上記抗体治療剤とその標的との結合の親和性が、第２の組織中での上記抗体治療剤とその標的との結合と比較した場合により低い、抗体治療剤。
（項目１８４）
上記標的が、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である、項目１８３に記載の抗体治療剤。
（項目１８５）
上記第１の組織が健康な組織であり、上記第２の組織が罹患した組織である、項目１８３に記載の抗体治療剤。
（項目１８６）
上記第１の組織が早期腫瘍であり、上記第２の組織が末期腫瘍である、項目１８３に記載の抗体治療剤。
（項目１８７）
上記第１の組織が良性腫瘍であり、上記第２の組織が悪性腫瘍である、項目１８３に記載の抗体治療剤。
（項目１８８）
上記第１の組織および第２の組織が空間的に分離されている、項目１８３に記載の抗体治療剤。
（項目１８９）
上記第１の組織が上皮組織であり、上記第２の組織が、乳房、頭部、頸部、肺、膵臓、神経系、肝臓、前立腺、泌尿生殖器、もしくは子宮頸部の組織である、項目１８３に記載

の抗体治療剤。
（項目１９０）
薬剤とさらにカップリングしている、項目１８３に記載の抗体治療剤。
（項目１９１）
上記薬剤が抗腫瘍剤である、項目１９０に記載の抗体治療剤。
（項目１９２）
（ａ）その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片（ＡＢ）と、
（ｂ）薬学的に許容される賦形剤と
を含む医薬組成物であって、第１の組織中の上記標的に対する上記抗体または抗体断片の親和性が、第２の組織中の上記標的に対する上記抗体または抗体断片の親和性よりも低い、医薬組成物。
（項目１９３）
上記第１の組織中での親和性が上記第２の組織中での親和性の１０～１，０００分の１である、項目１９２に記載の組成物。
（項目１９４）
上記ＡＢが、上記ＡＢとその標的との結合を還元することができるマスキング部分（ＭＭ）および酵素によって特異的に切断することができる切断可能な部分（ＣＭ）とカップリングしている、項目１９２に記載の組成物。
（項目１９５）
上記標的が、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４である、項目１９２に記載の組成物。
（項目１９６）
上記第１の組織が健康な組織であり、上記第２の組織が罹患した組織である、項目１９２に記載の組成物。
（項目１９７）
上記第１の組織が早期腫瘍であり、上記第２の組織が末期腫瘍である、項目１９２に記載の組成物。
（項目１９８）
上記第１の組織が良性腫瘍であり、上記第２の組織が悪性腫瘍である、項目１９２に記載の組成物。
（項目１９９）
上記第１の組織および第２の組織が空間的に分離されている、項目１９２に記載の組成物。
（項目２００）
上記第１の組織が上皮組織であり、上記第２の組織が、乳房、頭部、頸部、肺、膵臓、神経系、肝臓、前立腺、泌尿生殖器、もしくは子宮頸部の組織である、項目１９２に記載の組成物。
（項目２０１）
上記ＣＭが、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡの基質である、項目１９４に記載の組成物。
（項目２０２）
上記抗体または抗体断片が、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目１９２に記載の組成物。

（項目２０３）
上記ＡＢとカップリングした薬剤をさらに含む、項目１９２に記載の組成物。
（項目２０４）
上記薬剤が抗腫瘍剤である、項目２０３に記載の組成物。
（項目２０５）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、レグマインで活性化可能な抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２０６）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２０７）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、カスパーゼで活性化可能な抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２０８）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ＴＭＰＲＳＳ－３／４で活性化可能な抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２０９）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ＰＳＡで活性化可能な抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２１０）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、カテプシンで活性化可能な抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２１１）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ヒト好中球エラスターゼで活性化可能な抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２１２）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ベーターセクレターゼで活性化可能な抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２１３）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ｕＰＡで活性化可能な抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２１４）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ＴＭＰＲＳＳ－３／４で活性化可能な抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２１５）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、ＭＴ１－ＭＭＰで活性化可能な抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２１６）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＥＧＦＲ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２１７）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＴＮＦアルファ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２１８）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＣＤ１１ａ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２１９）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＣＳＦＲ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２２０）

マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＣＴＬＡ－４抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２２１）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＥｐＣＡＭ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２２２）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＣＤ４０Ｌ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２２３）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＮｏｔｃｈ１抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２２４）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＮｏｔｃｈ３抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２２５）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＪａｇｇｅｄ１抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２２６）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なＪａｇｇｅｄ２抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２２７）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なセツキシマブ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２２８）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なｖｅｃｔｉｂｉｘ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２２９）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なインフリキシマブ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２３０）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なアダリムマブ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２３１）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なエファリズマブ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２３２）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なイピリムマブ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２３３）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なトレメリムマブ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
（項目２３４）
マスキング部分（ＭＭ）とカップリングした、活性化可能なアデカツムマブ抗体または抗体断片（ＡＢ）を含む組成物。
【図面の簡単な説明】
【００６８】
【図１】図１は、抗体（ＡＢ）、マスキング部分（ＭＭ）、および切断可能な部分（ＣＭ）を含有する、プロテアーゼで活性化されるＡＡを示す。
【図２】図２は、ｉｎ　ｖｉｖｏの例示的なＡＡの活性を示す。パネルＡは、ＡＡが結合することができず、副作用が最小である健康な組織を示す。パネルＢは、ＡＡが標的に結

合し効果的となることを可能にする、疾患に特異的なプロテアーゼ／還元剤によってＡＡが活性化されている罹患した組織を示す。
【図３】図３は、ＭＭについてスクリーニングすること、ＣＭについてスクリーニングすること、ＭＭ、ＣＭ、およびＡＢを組み立てること、組み立てられた構築物を発現および精製すること、ならびに組み立てられた構築物を活性および毒性についてｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏでアッセイすることを含む、プロテアーゼで活性化されるＡＡを製造するプロセスを示す。
【図４】図４は、ＭＭＰ－９で切断可能なマスキングされた例示的な抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖアミノ酸配列を提供する。
【図５】図５は、ＭＭ３０６および３１４を有するＭＢＰ：抗ＶＥＧＦｓｃＦｖ　ＡＡのＭＭＰ－９による活性化を示すＥＬＩＳＡデータを提供する。試料をＴＥＶで処置してＭＢＰ融合パートナーを除去し、続いてＭＭＰ－９消化によって活性化する。
【図６】図６は、３０６ＭＭを有する抗ＶＥＧＦｓｃＦｖ　Ｈｉｓ構築物のＭＭＰ－９依存性ＶＥＧＦ結合を示すＥＬＩＳＡデータを提供する。
【図７】図７は、ＨＥＫ細胞上清からのＭＭ３０６および３１４を有する抗ＶＥＧＦｓｃＦｖ－Ｆｃ　ＡＡのＭＭＰ－９依存性ＶＥＧＦ結合を示すＥＬＩＳＡデータを提供する。
【図８】図８は、プロテインＡカラムを使用して精製されたＭＭ３０６および３１４を有する抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ－Ｆｃ　ＡＡ構築物のＭＭＰ－９－依存性ＶＥＧＦ結合を示すＥＬＩＳＡデータを提供する。
【図９】図９は、６００ｎＭを超える親和性で抗ＶＥＧＦ抗体に結合する３０６ＭＭが、ＶＥＧＦとの結合を効率的に妨げないことを示す。
【図１０】図１０は、両方の方向のｓｃＦｖ構築物、$V_H V_L$および$V_L V_H$を生成するためにＳＯＥ－ＰＣＲを介して接続された抗ＣＴＬＡ４軽鎖および重鎖を示す。
【図１１】図１１は、抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖ　$V_H V_L$および$V_L V_H$構築物のＮ末端にＭＭクローニング用の部位、ＣＭ切断配列、ＧＧＳ２リンカーを付加するためのＰＣＲの使用を示す。
【図１２】図１２は、ＭＭＰ－９によるＡＡの活性化を示す。
【図１３】図１３は、ＣＭを切断してＭＭを除去すると、ＡＢの結合が回復することを示す。
【図１４】図１４は、改変されていない抗体と区別できない抗体結合をもたらすプロテアーゼによるＡＡの活性化を示す。
【図１５】図１５は、ＶＥＧＦとの特定の結合親和性を有するＡＢを含むＡＡが阻害され、活性化されたＡＡはピコモルの親和性でＶＥＧＦと結合することを示す。
【図１６】図１６は、ＶＥＧＦとの特定の結合親和性を有するＡＢを含むＡＡがＨＵＶＥＣ増殖を阻害することを示す。
【図１７】図１７は、培養された腫瘍細胞は、ＶＥＧＦとの特定の結合親和性を有するＡＢを含むＡＡの強いｉｎ　ｓｉｔｕ活性化を示すことを示す。
【図１８】図１８は、ＡＡが正常および癌患者の血漿において不活性であることを示す。
【図１９】図１９は、マウスおよびヒトの両方のＣＴＬＡ４に対する抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖの結合を示す。
【図２０】図２０は、抗体（ＡＢを含有する）、マスキング部分（ＭＭ）、切断可能な部分（ＣＭ）、および結合体化した薬剤を含有する、プロテアーゼで活性化されるＡＡＣＪを示す。ＣＭが切断され、脱マスキングされると、結合体化したＡＢは遊離する。
【図２１】図２１は、ｅＣＰＸ３．０クローンＪＳ３０６、ＪＳ１８２５、ＪＳ１８２７、およびＪＳ１８２９の結合を３つの異なる濃度のＤｙＬｉｇｈｔ標識抗ＶＥＧＦでＦＡＣＳにおいて分析したことを示す。親和性成熟ペプチドの３つすべてがＪＳ３０６よりも少なくとも１０倍高い親和性を示した。
【図２２】図２２は、ＥＧＦＲ　ＭＭの一部の親和性成熟のプロセスを示す。
【図２３】図２３は、ＭＭの３６９０、３９５４および３９５７に対するＣ２２５Ｆａｂ結合の細胞上親和性測定の結合カーブを示す。ＭＭ３９５４および３９５７は、３６９０

よりも少なくとも１００倍高い親和性を示した。
【図２４】図２４は、標的置換アッセイおよび親の抗体結合のパーセントとしての平衡結合の程度を表す。
【図２５】図２５は、ｕＰＡ対照と違って、基質ＳＭ１６、ＫＫ１２０３、１２０４および１２１４が、ＫＬＫ５、ＫＬＫ７およびプラスミンによる切断に対して抵抗性を示すことを示す。
【図２６】図２６は、最適化されていない基質と違って、最適化された基質Ｐｌａｓ１２３７、Ｐｌａｓ１２９およびＰｌａｓ１２５４は、ＫＬＫ５、ＫＬＫ７による切断に対して抵抗性を示すことを示す。
【図２７】図２７のパネルＡは、５ｍｇ／ｍＬのレグマインによる処理後の、レグマイン基質ＡＡＮＬおよびＰＴＮＬを含有するＳｃＦｖ　ＡＡの活性化を示す。パネルＢは、レグマイン基質ＰＮＴＬを含有する抗ＶＥＧＦ　ＩｇＧ　ＡＡの活性化を示す。
【図２８】図２８は、レグマインで活性化されるＡＡにおけるそれぞれの時点での全ＡＡに対する活性化されたＡＡの比を示す。プラスミンで活性化されるＡＡは７日目でほぼ完全に活性化されるが、レグマインで活性化可能なＡＡは両方とも最小限にしか活性化されない。注射後７日目までに血清から単離されたレグマインで活性化可能なＡＡは、マスキングされたままである。（ｎ＝４）。
【図２９】図２９は、マスキングされた単鎖Ｆｖ－Ｆｃ融合プロ抗体が血清半減期の増大を示すことを示す。
【００６９】
【図３０】図３０は、１０日間にわたる健康なマウスのｓｃＦｖ－Ｆｃ血清濃度を示す。ＡＡ濃度は、投与後７日目まで安定なままであったが、親のｓｃＦｖ－Ｆｃ濃度は３日後に減少し、１０日目はほとんど検出不可能であった。
【図３１】図３１は、ＡＡ　ｓｃＦｖ－Ｆｃ濃度が腫瘍担持マウスにおける親のｓｃＦｖ－Ｆｃと比較して血清中で上昇し、より長く持続することを示す。最初のＡＡ投与のより高い割合が、３日目（Ｂ）ならびに３日目および７日目（Ａ）に血清において検出された。
【図３２】図３２は、腫瘍担持マウスの多回投与試験においてＡＡ　ｓｃＦｖ－Ｆｃｓがより高い濃度で持続することを示す。ＡＡは、試験全体にわたって親よりも有意に高い血清濃度を維持した。
【図３３】図３３は、ＡＡが、ＭＭで改変されていない親の抗体と比較して正常マウスの血清において高レベルで持続することを示す。
【図３４】図３４は、１種または複数の抗体またはその断片（この図ではＡＢはＡＢＤと称す）、マスキング部分（ＭＭ）、および切断可能な部分（ＣＭ）を含有するプロテアーゼで活性化される活性化可能な抗体複合体（ＡＡＣ）を示し、ＡＢＤ１およびＡＢＤ２は第１および第２のＡＢ任意の呼称である。このような実施形態では、ＭＭ１およびＭＭ２は、それぞれＡＢＤ１およびＡＢＤ２を含有するドメインに結合し、切断されていない二重標的結合ＡＡＣに対する標的結合を妨害するためのマスキング部分として働く。ＡＢが結合することができる標的は、同じ標的でも異なる標的でもよく、または同じ標的の異なる結合部位でもよい。一部の実施形態（図１Ａ、１Ｄ、１Ｆ）では、反対の分子におけるＡＢＤ２を含有するドメインに対するＭＭ１の結合は、ＡＢＤ１およびＡＢＤ２のマスキング部分として働くことができる複合体を形成する。
【図３５】図３５は、切断されていない状態では両方のＡＢによる標的結合が弱められ、複合体が分解するのを可能にする、ＣＭを切断する薬剤の存在下では標的結合が増大するような交差マスキングが起こるＡＡＣを示す。この図では、ＡＢ１およびＡＢ２はそれぞれＡＢＤ１およびＡＢＤ２と称する。
【図３６】図３６は、切断されていない状態ではＡＢＤ２（ＡＢ２）による標的結合が弱められ、複合体が分解するのを可能にする、ＣＭを切断する薬剤の存在下ではＡＢＤ２（ＡＢ２）による標的結合が増大するような、ＭＭ１とＡＢＤ１（ＡＢ１）の共有結合によって形成されるＡＡＣを示す。この図では、ＡＢ１およびＡＢ２はそれぞれＡＢＤ１およ

びＡＢＤ２と称する。
【発明を実施するための形態】
【００７０】
本開示は、治療学および診断学に有用な改変した抗体組成物を提供する。本明細書中に記載の組成物は、より高い体内分布および向上したバイオアベイラビリティを可能にする。
【００７１】
改変した活性化可能な抗体
本明細書中に記載の改変抗体組成物は、標的と特異的に結合することができる少なくとも抗体またはその抗体断片（本開示全体にわたってＡＢと総称する）を含有し、ＡＢはマスキング部分（ＭＭ）によって修飾されている。
【００７２】
ＡＢがＭＭで修飾されており、標的の存在下にある場合、ＡＢとその標的との特異的結合は、標的とＭＭで修飾されていないＡＢとの特異的結合または親ＡＢとの特異的結合と比較して、低下または阻害されている。
【００７３】
標的に対するＭＭで修飾されたＡＢのK_dは、標的に対するＭＭで修飾されていないＡＢまたは親ＡＢのK_dよりも、少なくとも５、１０、２５、５０、１００、２５０、５００、１，０００、２，５００、５，０００、１０，０００、５０，０００、１００，０００、５００，０００、１，０００，０００、５，０００，０００、１０，０００，０００、５０，０００，０００倍もしくはそれより多く高い、または５～１０、１０～１００、１０～１，０００、１０～１０，０００、１０～１００，０００、１０～１，０００，０００、１０～１０，０００，０００、１００～１，０００、１００～１０，０００、１００～１００，０００、１００～１，０００，０００、１００～１０，０００，０００、１，０００～１０，０００、１，０００～１００，０００、１，０００～１，０００，０００、１０００～１０，０００，０００、１０，０００～１００，０００、１０，０００～１，０００，０００、１０，０００～１０，０００，０００、１００，０００～１，０００，０００、もしくは１００，０００～１０，０００，０００倍高い場合がある。逆に、標的に対するＭＭで修飾されたＡＢの結合親和性は、標的に対するＭＭで修飾されていないＡＢまたは親ＡＢの結合親和性の、少なくとも５、１０、２５、５０、１００、２５０、５００、１，０００、２，５００、５，０００、１０，０００、５０，０００、１００，０００、５００，０００、１，０００，０００、５，０００，０００、１０，０００，０００、５０，０００，０００分の１もしくはそれより低い、または５～１０、１０～１００、１０～１，０００、１０～１０，０００、１０～１００，０００、１０～１，０００，０００、１０～１０，０００，０００、１００～１，０００、１００～１０，０００、１００～１００，０００、１００～１，０００，０００、１００～１０，０００，０００、１，０００～１０，０００、１，０００～１００，０００、１，０００～１，０００，０００、１０００～１０，０００，０００、１０，０００～１００，０００、１０，０００～１，０００，０００、１０，０００～１０，０００，０００、１００，０００～１，０００，０００、もしくは１００，０００～１０，０００，０００分の１である場合がある。
【００７４】
ＡＢに対するＭＭの解離定数（K_d）は、一般に標的に対するＡＢのK_dよりも高い。ＡＢに対するＭＭのK_dは、標的に対するＡＢのK_dよりも少なくとも５、１０、２５、５０、１００、２５０、５００、１，０００、２，５００、５，０００、１０，０００、１００，０００、１，０００，０００またはさらには１０，０００，０００倍高い場合がある。逆に、ＡＢに対するＭＭの結合親和性は、一般に標的に対するＡＢの結合親和性よりも低い。ＡＢに対するＭＭの結合親和性は、標的に対するＡＢの結合親和性の少なくとも５、１０、２５、５０、１００、２５０、５００、１，０００、２，５００、５，０００、１０，０００、１００，０００、１，０００，０００またはさらには１０，０００，

０００分の１である場合がある。

【００７５】

ＡＢがＭＭで修飾されており、標的の存在下にある場合、ＡＢとその標的との特異的結合は、標的とＭＭで修飾されていないＡＢとの特異的結合または親ＡＢとの特異的結合と比較して、低下または阻害されている場合がある。本明細書中に記載のようにｉｎ　ｖｉｖｏまたは標的置換ｉｎ　ｖｉｔｒｏの免疫吸着アッセイで測定した際に、標的とＭＭで修飾されていないＡＢとの結合または親ＡＢとの結合と比較した場合、ＭＭで修飾した場合に標的と結合するＡＢの能力は、少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、さらには１００％、少なくとも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、１２カ月間もしくはそれより長くの間、低下する場合がある。

【００７６】

ＭＭはＡＢと標的との結合を阻害することができる。ＭＭは、ＡＢの抗原結合ドメインと結合してＡＢとその標的との結合を阻害することができる。ＭＭは、ＡＢと標的との結合を立体的に阻害することができる。ＭＭは、ＡＢとその標的との結合をアロステリックに阻害することができる。ＡＢが修飾されているまたはＭＭとカップリングしており、標的の存在下にあるこれらの実施形態では、本明細書中に記載のようにｉｎ　ｖｉｖｏまたは標的置換ｉｎ　ｖｉｔｒｏの免疫吸着アッセイで測定した際に、ＡＢと標的との結合が存在しないもしくは結合が実質的に存在しない、または、ＭＭで修飾されていないＡＢ、親ＡＢ、またはＭＭとカップリングしていないＡＢと標的との結合と比較して、．００１％、．０１％、．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、もしくは５０％以下のＡＢと標的との結合のみが、少なくとも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、１２カ月間もしくはそれより長くの間存在する。

【００７７】

ＡＢがＭＭとカップリングしているまたはそれによって修飾されている場合、ＭＭは、ＡＢとその標的との特異的結合を「マスキング」もしくは低下、または阻害することができる。ＡＢがＭＭとカップリングしているまたはそれによって修飾されている場合、そのようなカップリングまたは修飾は、その標的と特異的に結合するＡＢの能力を低下または阻害する構造的変化をもたらす場合がある。

【００７８】

ＭＭとカップリングしたまたはそれで修飾されたＡＢは、以下の式（アミノ（Ｎ）末端領域からカルボキシル（Ｃ）末端領域への順序：

（ＭＭ）－（ＡＢ）

（ＡＢ）－（ＭＭ）

（ＭＭ）－Ｌ－（ＡＢ）

（ＡＢ）－Ｌ－（ＭＭ）

によって表すことができ、ＭＭはマスキング部分であり、ＡＢは抗体またはその抗体断片であり、Ｌはリンカーである。多くの実施形態では、柔軟性を提供するために１つまたは複数のリンカー、たとえば柔軟なリンカーを組成物内に挿入することが望ましい場合がある。

【００７９】

特定の実施形態では、ＭＭはＡＢの天然の結合パートナーではない。ＭＭは、ＡＢとの結合の親和性および／または結合力を少なくともわずかに減少させるアミノ酸変化を含有する、ＡＢの改変された結合パートナーであり得る。一部の実施形態では、ＭＭは、ＡＢの天然の結合パートナーとの相同性を含有しないまたは実質的に含有しない。他の実施形

態では、ＭＭは、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、または８０％以下しか、ＡＢの天然の結合パートナーと類似でない。

【００８０】

また、本開示は、ＭＭによって修飾されたＡＢに１つまたは複数の切断可能な部分（ＣＭ）がさらに含まれることができる、活性化可能な抗体（ＡＡ）も提供する。そのようなＡＡは、ＡＢの標的との活性化可能／切替可能な結合を示す。ＡＡには、一般に、マスキング部分（ＭＭ）および修飾可能もしくは切断可能な部分（ＣＭ）によって修飾されたまたはそれとカップリングした、抗体または抗体断片（ＡＢ）が含まれる。一部の実施形態では、ＣＭは、目的のプロテアーゼの基質として役割を果たすアミノ酸配列を含有する。他の実施形態では、ＣＭは、還元によって切断可能なシステイン－システインジスルフィド結合を提供する。さらに他の実施形態では、ＣＭは、光分解によって活性化可能な光分解性基質を提供する。

【００８１】

例示的なＡＡの模式図を図１に提供する。例示したように、ＡＡの要素は、ＣＭが、切断された（または比較的活性の状態）標的の存在下にある場合はＡＢが標的と結合する一方で、切断されていない（または比較的不活性の状態）標的の存在下にある場合は、ＡＢとその標的との特異的結合が低下または阻害されるように位置するように、配置されている。ＡＢとその標的との特異的結合は、その標的と特異的に結合するＡＢの能力の、ＭＭによる阻害またはマスキングが原因で低下する場合がある。

【００８２】

標的に対するＭＭおよびＣＭで修飾されたＡＢのK_dは、標的に対するＭＭおよびＣＭで修飾されていないＡＢまたは親ＡＢのK_dよりも、少なくとも５、１０、２５、５０、１００、２５０、５００、１，０００、２，５００、５，０００、１０，０００、５０，０００、１００，０００、５００，０００、１，０００，０００、５，０００，０００、１０，０００，０００、５０，０００，０００倍もしくはそれより多く高い、または５～１０、１０～１００、１０～１，０００、１０～１０，０００、１０～１００，０００、１０～１，０００，０００、１０～１０，０００，０００、１００～１，０００、１００～１０，０００、１００～１００，０００、１００～１，０００，０００、１００～１０，０００，０００、１，０００～１０，０００、１，０００～１００，０００、１，０００～１，０００，０００、１０００～１０，０００，０００、１０，０００～１００，０００、１０，０００～１，０００，０００、１０，０００～１０，０００，０００、１００，０００～１，０００，０００、もしくは１００，０００～１０，０００，０００倍高い場合がある。逆に、標的に対するＭＭおよびＣＭで修飾されたＡＢの結合親和性は、標的に対するＭＭおよびＣＭで修飾されていないＡＢまたは親ＡＢの結合親和性の、少なくとも５、１０、２５、５０、１００、２５０、５００、１，０００、２，５００、５，０００、１０，０００、５０，０００、１００，０００、５００，０００、１，０００，０００、５，０００，０００、１０，０００，０００、５０，０００，０００分の１もしくはそれより低い、または５～１０、１０～１００、１０～１，０００、１０～１０，０００、１０～１００，０００、１０～１，０００，０００、１０～１０，０００，０００、１００～１，０００、１００～１０，０００、１００～１００，０００、１００～１，０００，０００、１００～１０，０００，０００、１，０００～１０，０００、１，０００～１００，０００、１，０００～１，０００，０００、１０００～１０，０００，０００、１０，０００～１００，０００、１０，０００～１，０００，０００、１０，０００～１０，０００，０００、１００，０００～１，０００，０００、もしくは１００，０００～１０，０００，０００分の１である場合がある。

【００８３】

ＡＢがＭＭおよびＣＭで修飾されており、標的の存在下にあるが、修飾剤（たとえば、酵素、プロテアーゼ、還元剤、光）の非存在下にある場合、ＡＢとその標的との特異的結合は、ＭＭおよびＣＭで修飾されていないＡＢまたは親ＡＢと標的との特異的結合と比較

して、低下または阻害されている場合がある。本明細書中に記載のようにｉｎ　ｖｉｖｏまたは標的置換ｉｎ　ｖｉｔｒｏの免疫吸着アッセイで測定した際に、その標的と、親ＡＢとの結合またはＭＭおよびＣＭで修飾されていないＡＢとの結合と比較した場合、ＭＭおよびＣＭで修飾した場合に標的と結合するＡＢの能力は、少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、さらには１００％、少なくとも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、１２カ月間もしくはそれより長くの間、低下する場合がある。

【００８４】

本明細書中で使用する用語、切断された状態とは、プロテアーゼによるＣＭの改変および／またはＣＭのシステイン－システインジスルフィド結合の還元および／または光活性化後の、ＡＡの状態をいう。本明細書中で使用する用語、切断されていない状態とは、プロテアーゼによるＣＭの切断の非存在下および／またはＣＭのシステイン－システインジスルフィド結合の還元の非存在下および／または光の非存在下における、ＡＡの状態をいう。上述のように、本明細書中で使用する用語ＡＡとは、その切断されていない（ネイティブ）状態およびその切断された状態の両方のＡＡをいう。一部の実施形態では、切断されたＡＡはプロテアーゼによるＣＭの切断が原因でＭＭを欠き、少なくともＭＭの放出をもたらし得ることが、当業者には明らかであろう（たとえば、ＭＭが共有結合によってＡＡと結合していない場合（たとえばシステイン残基間のジスルフィド結合）。

【００８５】

活性化可能または切替可能とは、ＡＡが、阻害、マスキングされたまたは切断されていない状態（すなわち第１のコンホメーション）にある場合に標的との結合の第１のレベルを示し、阻害されていない、マスキングされていないおよび／または切断された状態（すなわち第２のコンホメーション）にある場合に標的との結合の第２のレベルを示し、第２の標的結合レベルは第１の結合レベルよりも高いことを意味する。一般に、ＡＡのＡＢに対する標的の接近は、ＣＭを切断することができる切断剤の存在下において、そのような切断剤の非存在下よりも高い。したがって、ＡＡが切断されていない状態にある場合、ＡＢは標的結合から阻害され、標的結合からマスキングされる場合があり（すなわち、第１のコンホメーションとはＡＢが標的と結合できないことである）、切断された状態では、ＡＢは標的結合に関して阻害されていないまたはマスキングされていない。

【００８６】

ＡＡのＣＭおよびＡＢは、ＡＢが目的の標的の結合部分を表し、ＣＭが被験体内の処置部位で標的と共に共局在化しているプロテアーゼの基質を表すように、選択し得る。あるいは、またはそれに加えて、ＣＭは、ジスルフィド結合の還元の結果として切断可能なシステイン－システインジスルフィド結合である。ＡＡは、プロテアーゼで切断可能なＣＭまたはシステイン－システインジスルフィド結合のうちの少なくとも１つを含有し、一部の実施形態では、両方の種類のＣＭが含まれる。あるいは、またはさらに、ＡＡには、光源によって活性化可能な光解離性基質が含まれることができる。本明細書中に開示するＡＡは、図２に例示するように、たとえば、ＣＭ中の部位を切断することができるプロテアーゼが、処置部位の標的含有組織（たとえば罹患した組織、たとえば治療的処置または診断的処置のため）中で、非処置部位の組織中（たとえば健康な組織中）よりも比較的高いレベルで存在する場合に、特定の使用が見つかる。また、本明細書中に開示するＡＡは、たとえば、ＣＭ中の部位を還元することができる還元剤が、処置または診断部位の標的含有組織中で、非処置の非診断部位の組織中よりも比較的高いレベルで存在する場合にも、特定の使用が見つかる。また、本明細書中に開示するＡＡは、たとえば、ＣＭ中の部位を光分解することができる、たとえばレーザーによる光源を処置または診断部位の標的含有組織に導入する場合にも、特定の使用が見つかる。

【００８７】

一部の実施形態では、ＡＡは、ＡＢがその標的との結合からマスキングまたは他の様式

で阻害されていない場合に、そうでなければ非処置部位でのＡＢの結合の結果もたらされ得る毒性および／または有害な副作用の低下を提供することができる。ＡＡが、ジスルフィド結合の還元を促進する還元剤によって切断可能なＣＭを含有する場合、そのようなＡＡのＡＢは、ＡＢの活性化が活用されるように選択してよく、目的の標的は、環境がたとえば非処置部位の環境よりも高い還元潜在性のものであるように、還元剤のレベルが上昇していることによって特徴づけられた所望の処置部位に存在する。

【００８８】

一般に、ＡＡは、コンホメーションが束縛された場合にＭＭがＡＢのマスキングまたはＡＢとその標的との結合の低下を提供するように、目的のＡＢを選択し、ＡＡの残りの部分を構築することによって設計することができる。この機能的特長を提供するために、構造的な設計基準を考慮すべきである。

【００８９】

特定の実施形態では、二重標的結合ＡＡを本開示中で提供する。そのような二重標的結合ＡＡは、同じまたは異なる標的と結合し得る２つのＡＢを含有する。具体的な実施形態では、二重標的化ＡＡは二重特異性抗体または抗体断片を含有する。具体的な例示的な一実施形態では、ＡＡはＩＬ１７　ＡＢとＩＬ２３　ＡＢを含有する。他の具体的な実施形態では、ＡＡは、ＩＬ１２　ＡＢとＩＬ２３　ＡＢ、またはＥＧＦＲ　ＡＢとＶＥＧＦ　ＡＢ、またはＩＧＦ１Ｒ　ＡＢとＥＧＦＲ　ＡＢ、またはｃＭＥＴ　ＡＢとＩＧＦ１Ｒ　ＡＢ、またはＥＧＦＲ　ＡＢとＶＥＧＦ　ＡＢ、またはＮｏｔｃｈ受容体ＡＢとＥＧＦＲ　ＡＢ、またはＪａｇｇｅｄリガンドＡＢとＥＧＦＲ　ＡＢ、またはｃＭＥＴ　ＡＢとＶＥＧＦ　ＡＢを含有する。

【００９０】

二重標的結合ＡＡは、ＡＡのＡＢと結合することができる標的のうちの一方または両方と共に標的組織中に共局在化している、切断剤によって切断可能なＣＭを有するように設計することができる。同じまたは異なる標的に対する複数のＡＢを有する二重標的結合ＡＡは、第１のＣＭが第１の標的組織中の切断剤によって切断可能であり、第２のＣＭが第２の標的組織中の切断剤によって切断可能である複数のＣＭを有し、標的のうちの１つまたは複数がＡＡのＡＢと結合することができるように、設計することができる。第１および第２の標的組織は、空間的に分離されている、たとえば生物中の異なる部位であることができる。第１および第２の標的組織は、時間的に分離された同じ組織、たとえば同じ組織の２つの異なる時点であることができ、たとえば、第１の時点は組織が健康な腫瘍である時であることができ、第２の時点は組織が壊死した腫瘍である時であることができる。

【００９１】

阻害された対阻害されていないコンホメーションで、標的結合に関して所望の動作範囲の切替可能な表現型を示すＡＡを提供する。一般に、動作範囲とは、（ａ）第１の条件組下におけるパラメータの最大の検出されたレベル対（ｂ）第２の条件組下におけるそのパラメータの最小の検出された値の比をいう。たとえば、ＡＡのコンテキストでは、動作範囲とは、（ａ）ＡＡのＣＭを切断することができるプロテアーゼの存在下における、標的タンパク質とＡＡとの結合の最大の検出されたレベル対（ｂ）プロテアーゼの非存在下における、標的タンパク質とＡＡとの結合の最小の検出されたレベルの比をいう。ＡＡの動作範囲は、ＡＡ切断剤（たとえば酵素）処理の平衡解離定数対ＡＡ切断剤処理の平衡解離定数の比として計算することができる。ＡＡの動作範囲が大きければ大きいほど、ＡＡの切替可能な表現型がより良好となる。比較的高い動作範囲値（たとえば１より高い）を有するＡＡは、ＡＡによる標的タンパク質の結合が、ＡＡのＣＭを切断することができる切断剤（たとえば酵素）の存在下において、切断剤の非存在下よりも高い程度で起こる（たとえば優勢的に起こる）ように、より望ましい切替表現型を示す。

【００９２】

ＡＡは、様々な構造的立体配置で提供することができる。ＡＡの例示的な式を以下に提供する。ＡＢ、ＭＭおよびＣＭのＮからＣ末端の順序をＡＡ内で逆行させ得ることが具体的に企図される。また、ＣＭおよびＭＭが、たとえばＣＭがＭＭ内に含有されるようにア

ミノ酸配列中で重なり得ることも具体的に企図される。

【００９３】

たとえば、ＡＡは、以下の式（アミノ（Ｎ）末端領域からカルボキシル（Ｃ）末端領域への順序：

（ＭＭ）－（ＣＭ）－（ＡＢ）

（ＡＢ）－（ＣＭ）－（ＭＭ）

によって表すことができ、ＭＭはマスキング部分であり、ＣＭは切断可能な部分であり、ＡＢは抗体またはその断片である。ＭＭおよびＣＭは上記式中で明確な構成要素として示すが、本明細書中に開示するすべての例示的な実施形態（式が含まれる）において、ＭＭおよびＣＭのアミノ酸配列が、たとえばＣＭが完全にまたは部分的にＭＭ内に含有されるように重なることができることが企図されることに注意されたい。さらに、上記式は、ＡＡ要素のＮ末端またはＣ末端側に位置し得るさらなるアミノ酸配列を提供する。

【００９４】

多くの実施形態では、柔軟性を提供するために１つまたは複数のリンカー、たとえば柔軟なリンカーをＡＡ構築体内に、ＭＭ－ＣＭの接合部、ＣＭ－ＡＢの接合部または、両方のうちの１つまたは複数で挿入することが望ましい場合がある。たとえば、ＡＢ、ＭＭ、および／またはＣＭは、所望の柔軟性を提供するために十分な数の残基（たとえば、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ、Ａｓｐ、Ａｓｎ、特にＧｌｙおよびＳｅｒ、特にＧｌｙ）を含有していない場合がある。したがって、そのようなＡＡ構築体の切替可能な表現型は、柔軟なリンカーを提供するために１つまたは複数のアミノ酸を導入することから利点を得る場合がある。さらに、以下に記載のように、ＡＡをコンホメーションが束縛された構築体として提供する場合、切断されていないＡＡ中の環状構造の形成および維持を容易にするために柔軟なリンカーを作動可能に挿入することができる。

【００９５】

たとえば、特定の実施形態では、ＡＡは、以下の式（以下の式は、ＮからＣ末端の方向またはＣからＮ末端の方向のどちらかのアミノ酸配列を表す）：

（ＭＭ）－$Ｌ_{1}$－（ＣＭ）－（ＡＢ）

（ＭＭ）－（ＣＭ）－$Ｌ_{1}$－（ＡＢ）

（ＭＭ）－$Ｌ_{1}$－（ＣＭ）－$Ｌ_{2}$－（ＡＢ）

シクロ［$Ｌ_{1}$－（ＭＭ）－$Ｌ_{2}$－（ＣＭ）－$Ｌ_{3}$－（ＡＢ）］

のうちの１つを含み、ＭＭ、ＣＭ、およびＡＢは上記定義したとおりであり、$Ｌ_{1}$、$Ｌ_{2}$、および$Ｌ_{3}$は、それぞれ独立してかつ任意選択で存在するまたは存在せず、少なくとも１つの柔軟なアミノ酸（たとえばＧｌｙ）が含まれる、同じまたは異なる柔軟なリンカーであり、シクロが存在する場合は、ＡＡは、ＡＡ中の１対のシステインの間にジスルフィド結合が存在することが原因で環状構造の形態である。さらに、上記式は、ＡＡ要素のＮ末端またはＣ末端側に位置し得るさらなるアミノ酸配列を提供する。式シクロ［$Ｌ_{1}$－（ＭＭ）－$Ｌ_{2}$－（ＣＭ）－$Ｌ_{3}$－（ＡＢ）］中、ジスルフィド結合を司っているシステインがＡＡ中に位置して１つまたは２つのテイルを可能にし、それにより、ＡＡがジスルフィド結合された構造（したがってコンホメーションが束縛された状態）にある場合にラッソまたはオメガ構造を生じる場合があることを理解されたい。テイルのアミノ酸配列は、標的受容体と結合してＡＡの局在化を促進すること、ＡＡの血清半減期を増加させることなどの、ＡＡのさらなる特長を提供することができる。標的化部分（たとえば、標的組織中に存在する細胞の受容体のリガンド）および血清半減期延長部分（たとえば、免疫グロブリン（たとえばＩｇＧ）または血清アルブミン（たとえばヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）などの血清タンパク質と結合するポリペプチド。

【００９６】

改変した活性化可能な抗体の要素

（ａ）抗体または抗体断片（ＡＢと総称する）

本発明によれば、任意の抗原またはハプテンに対して向かわせたＡＢを使用し得る。本発明で使用するＡＢは、任意の決定要因、たとえば、腫瘍、細菌、真菌、ウイルス、寄生

生物、マイコプラズマ、組織適合性、分化および他の細胞膜抗原、病原体表面抗原、毒素、酵素、アレルゲン、薬物、細胞内標的、ならびに任意の生物活性のある分子に対して向かわせたものであり得る。さらに、異なる抗原決定基に対して反応性のＡＢの組合せを使用し得る。

【００９７】

本明細書中で使用するＡＢとは、目的の標的、通常は目的のタンパク質標的と結合、特に特異的結合することができる、完全長抗体または抗原結合ドメインを含有する抗体断片である。ＡＡの模式図を図１に提供する。そのような実施形態では、ＡＢは、それだけには限定されないが、抗体の軽鎖および／もしくは重鎖の可変もしくは超可変領域（$Ｖ_{Ｌ}$、$Ｖ_{Ｈ}$）、可変断片（Ｆｖ）、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、Ｆａｂ断片、単鎖抗体（ｓｃＡｂ）、単鎖可変領域（ｓｃＦｖ）、相補性決定領域（ＣＤＲ）、ドメイン抗体（ｄＡｂ）、ＢＨＨもしくはＢＮＡＲ型の単一ドメイン重鎖免疫グロブリン、単一ドメイン軽鎖免疫グロブリン、または、標的タンパク質もしくは標的タンパク質上のエピトープと結合することができるＡＢを含有する、当分野で公知の他のポリペプチドであることができる。さらなる実施形態では、ＡＢは、それぞれのＡＢが同じまたは異なる標的と結合することができるような複数のＡＢ、たとえば第１のＡＢおよび第２のＡＢを含有する、キメラまたはハイブリッドの組合せであり得る。一部の実施形態では、ＡＢは、２つの異なる抗原と結合するように設計された二重特異性抗体またはその断片である。一部の実施形態では、それぞれ第１のＡＢおよび第２のＡＢと活性化可能な形態でカップリングした第１のＭＭおよびＣＭならびに／または第２のＭＭおよびＣＭが存在する。

【００９８】

ＡＢの起源は、天然に存在する抗体もしくはその断片、天然に存在しない抗体もしくはその断片、合成抗体もしくはその断片、ハイブリッド抗体もしくはその断片、または操作した抗体もしくはその断片であることができる。抗体はヒト化抗体またはその断片であることができる。

【００９９】

特定の実施形態では、複数のＡＢがＡＡ中に含有される。一部の実施形態では、ＡＢは二重特異性抗体またはその断片に由来することができる。他の実施形態では、ＡＡは、合成によって操作して、２つの異なる抗体またはその断片に由来するＡＢを組み込むことができる。そのような実施形態では、ＡＢは、２つの異なる標的、２つの異なる抗原、または同じ標的上の２つの異なるエピトープと結合するように設計することができる。複数の標的部位と結合することができる複数のＡＢを含有するＡＢは、通常、ＡＡの第１のＡＢの結合がＡＡの第２のＡＢと標的との結合を実質的に妨害しないように、目的の標的または複数の標的上の異なる結合部位と結合するように設計する。複数のＡＢを含有するＡＡには、複数のＡＢ－ＭＭ単位がさらに含まれる場合があり、これは、任意選択で、修飾剤に曝露した際にＡＢがもはやその標的と特異的に結合することから阻害されなくなる、すなわち「マスキングされていない」ようになるように、追加のＣＭによって分離されていてもよい。

【０１００】

一部の実施形態では、ＡＢの供給源としての抗体断片の使用により、増加した速度での標的部位の透過が可能となる。ＩｇＧ免疫グロブリンのＦａｂ’断片は、抗体をペプシン［１つの二価断片、（Ｆａｂ’）２を生じる］またはパパイン［２つの一価断片、（２Ｆａｂ）を生じる］で切断することによって得られる。Ｐａｒｈａｍ、１９８３年、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１３１巻：２８９５～２９０２頁、ＬａｍｏｙｉおよびＮｉｓｏｎｏｆｆ、１９８３年、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．、５６巻：２３５～２４３頁。二価（Ｆａｂ’）２断片を１個または数個のジスルフィド結合の穏和な還元によって分割して、一価Ｆａｂ’断片を得ることができる。Ｆａｂおよび（Ｆａｂ’）２断片は全抗体よりも小さく、依然としてＡＢを含有しており、したがって、ＡＢとして使用した際に、より容易に標的部位または組織を透過することができる。多くのそのような断片は胎盤障壁を横切らないため、このことは、特定の実施形態においてｉｎ　ｖｉｖｏ送達に利点を

提供し得る。その結果、本発明のこの実施形態を使用して、ＡＡを胎児に曝露させずに妊娠した女性にｉｎ　ｖｉｖｏ部位（腫瘍など）へ送達し得る。

【０１０１】

所定の標的に対する抗体（またはその断片）を作製する方法は当分野で周知である。抗体およびその断片、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域（V_HおよびV_L）、Ｆｖ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ断片、単鎖抗体（ｓｃＡｂ）、単鎖可変領域（ｓｃＦｖ）、相補性決定領域（ＣＤＲ）、ならびにドメイン抗体（ｄＡｂ）の構造は十分に理解されている。標的抗原の所望の抗原結合ドメインを有するポリペプチドを作製する方法は当分野で公知である。

【０１０２】

抗体または抗体断片を改変して追加のポリペプチドをカップリングさせる方法も、当分野で周知である。たとえば、ＭＭ、ＣＭまたはリンカーなどのペプチドをカップリングさせて抗体を改変して、本開示の改変したＡＢおよびＡＡを作製し得る。図３の模式図に記載のように、プロテアーゼで活性化されるＡＢを含有するＡＡを、標準の方法で開発および産生することができる。

【０１０３】

抗体またはその断片（ＡＢと総称する）はタンパク質標的と特異的に結合することができる。本発明のＡＢは、１０００ｎＭ、１００ｎＭ、５０ｎＭ、１０ｎＭ、５ｎＭ、１ｎＭ、５００ｐＭ、４００ｐＭ、３５０ｐＭ、３００ｐＭ、２５０ｐＭ、２００ｐＭ、１５０ｐＭ、１００ｐＭ、５０ｐＭ、２５ｐＭ、１０ｐＭ、５ｐＭ、１ｐＭ、．５ｐＭ、または．１ｐＭ以下の解離定数（K_d）でその標的と特異的に結合することができる。

【０１０４】

ＡＢの標的の例示的なクラスには、必ずしもそれだけには限定されないが、細胞表面受容体および分泌された結合タンパク質（たとえば成長因子）、可溶性酵素、構造タンパク質（たとえば、コラーゲン、フィブロネクチン）などが含まれる。一部の実施形態では、本開示によって企図されるＡＡは、細胞外標的、通常は細胞外タンパク質標的と結合することができるＡＢを有するものである。他の実施形態では、ＡＡは、細胞取り込みが可能であるように設計することができ、細胞内で切替可能であるように設計される。

【０１０５】

例示的な実施形態では、いかなる様式でも限定はしないが、ＡＢは表１に記載の任意の標的の結合パートナーである。具体的な例示的な実施形態では、ＡＢは、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４の結合パートナーである。具体的な一実施形態では、ＡＢはＣＤ５２の結合パートナーではない。

【０１０６】

例示的な実施形態では、いかなる様式でも限定はしないが、ＡＢの例示的な供給源を表２に記載する。具体的な例示的な実施形態では、本発明のＡＢの供給源は、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Ｈｕ５ｃ８、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである。具体的な一実施形態では、ＡＢの供給源はアレムツズマブではないまたはＣａｍｐａｔｈ（商標）ではない。

【０１０７】

【表１】

表1：例示的な標的

1-92-LFA-3	cMet	HGF	IL4	PSMA
抗ルイス-Y	コラーゲン	hGH	IL4R	RAAG12
アペリンＪ受容体	CSFR	ヒアルロニダーゼ	IL6	スフィンゴシン1リン酸
C5 補体	CSFR-1	IFN アルファ	インスリン受容体	TGF ベータ
CD11a	CTLA-4	IFN ベータ	Jagged リガンド	TNF アルファ
CD172A	CXCR4	IFN ガンマ	Jagged 1	TNF アルファ
CD19	DL44	IgE	Jagged 2	TNFR
CD20	DLL4	IgE 受容体	MUC1	TRAIL-R1
CD22	EGFR	IGF	Na/K ATPase	TRAIL-R2
CD25	EpCAM	IGF1R	NGF	トランスフェリン
CD28	EPHA2	IL11	Notch 受容体	トランスフェリン受容体
CD3	ERBB3	IL12	Notch 1	TRK-A
CD30	RSVのFタンパク質	IL13	Notch 2	TRK-B
CD33	FAP	IL15	Notch 3	VCAM-1
CD40	FGF-2	IL17	Notch 4	VEGF
CD40L	FGFR1	IL18	PDGF-AA	VEGF-A
CD41	FGFR2	IL1B	PDGF-BB	VEGF-B
CD44	FGFR3	IL1R	PDGFR アルファ	VEGF-C
CD52	FGFR4	IL2	PDGFR アルファ	VEGF-D
CD64	葉酸受容体	IL21	PDGFR ベータ	VEGFR1
CD80	GP IIb/IIIa 受容体	IL23	PDGFR ベータ	VEGFR2
CD86	Gp130	IL23R	ホスファチジルセリン	VEGFR3
CLAUDIN-3	GPIIB/IIIA	IL29	PlGF	アルファ4ベータ1インテグリン
CLAUDIN-4	HER2/neu	IL2R	PSCA	アルファ4ベータ7インテグリン

【０１０８】

【表２】

表2:ABの例示的な供給源

抗体商品名(抗体名)	標的
Avastin™ (ベバシズマブ)	VEGF
Lucentis™ (ラニビズマブ)	VEGF
Erbitux™ (セツキシマブ)	EGFR
Vectibix™ (パニツムマブ)	EGFR
Remicade™ (インフリキシマブ)	TNFα
Humira™ (アダリムマブ)	TNFα
Tysabri™ (ナタリズマブ)	インテグリンα4
Simulect™ (バシリキシマブ)	IL2R
Soliris™ (エクリズマブ)	補体 C5
Raptiva™ (エファリズマブ)	CD11a
Bexxar™ (トシツモマブ)	CD20
Zevalin™ (イブリツモマブチウキセタン)	CD20
Rituxan™ (リツキシマブ)	CD20
Zenapax™ (ダクリズマブ)	CD25
Myelotarg™ (ゲムツズマブ)	CD33
Mylotarg™ (ゲムツズマブオゾガマイシン)	CD33
Campath™ (アレムツズマブ)	CD52
ReoPro™ (アブシキシマブ(abiciximab))	糖タンパク質受容体 IIb/IIIa
Xolair™ (オマリズマブ)	IgE
Herceptin™ (トラスツズマブ)	Her2
Synagis™ (パリビズマブ)	RSVのFタンパク質
(イピリムマブ)	CTLA-4
(トレメリムマブ)	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(ペルツズマブ)	Her2-neu
(エルツマキソマブ)	CD3/Her2-neu
Orencia™ (アバタセプト)	CTLA-4
(タネズマブ)	NGF
(バビツキシマブ)	ホスファチジルセリン
(ザルツムマブ)	EGFR
(マパツムマブ)	EGFR
(マツズマブ)	EGFR
(ニモツズマブ)	EGFR
ICR62	EGFR
mAb 528	EGFR
CH806	EGFR
MDX-447	EGFR/CD64
(エドレコロマブ)	EpCAM
RAV12	RAAG12
huJ591	PSMA
Enbrel™ (エタネルセプト)	TNF-R
Amevive™ (アレファセプト)	1-92-LFA-3
Antril™, Kineret™ (アナキンラ(ankinra))	IL-1Ra
GC1008	TGF ベータ
	Notch 1
	Jagged 1
(アデカツムマブ)	EpCAM
(フィギツムマブ)	IGF1R
(トシリズマブ)	IL-6

表２に記載のＡＢの一部の例示的な供給源は、参照したＡＢ供給源のうちの１つまたは

複数の説明について本明細書中に参考として組み込まれている以下の参考文献中に詳述されている：Ｒｅｍｉｃａｄｅ（商標）（インフリキシマブ）：米国特許第６，０１５，５５７号、Ｎａｇａｈｉｒａ Ｋ、Ｆｕｋｕｄａ Ｙ、Ｏｙａｍａ Ｙ、Ｋｕｒｉｈａｒａ Ｔ、Ｎａｓｕ Ｔ、Ｋａｗａｓｈｉｍａ Ｈ、Ｎｏｇｕｃｈｉ Ｃ、Ｏｉｋａｗａ Ｓ、Ｎａｋａｎｉｓｈｉ Ｔ.、Ｈｕｍａｎｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｍｏｕｓｅ ｎｅｕｔｒａｌｉｚｉｎｇ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ａｇａｉｎｓｔ ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ－ａｌｐｈａ （ＴＮＦ－ａｌｐｈａ）.、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ.、１９９９年1月1日；２２２巻（１～２号）：８３～９２頁）。Ｋｎｉｇｈｔ ＤＭ、Ｔｒｉｎｈ Ｈ、Ｌｅ Ｊ、Ｓｉｅｇｅｌ Ｓ、Ｓｈｅａｌｙ Ｄ、ＭｃＤｏｎｏｕｇｈ Ｍ、Ｓｃａｌｌｏｎ Ｂ、Ｍｏｏｒｅ ＭＡ、Ｖｉｌｃｅｋ Ｊ、Ｄａｄｄｏｎａ Ｐら、Ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｉｎｉｔｉａｌ ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｍｏｕｓｅ－ｈｕｍａｎ ｃｈｉｍｅｒｉｃ ａｎｔｉ－ＴＮＦ ａｎｔｉｂｏｄｙ.、Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ.、１９９３年１１月；３０巻（１６号）：１４４３～５３頁。Ｈｕｍｉｒａ（商標）（アダリムマブ）：米国特許第６２５８５６２号中の配列。Ｒａｐｔｉｖａ（商標）（エファリズマブ）：Ｗｅｒｔｈｅｒ ＷＡ、Ｇｏｎｚａｌｅｚ ＴＮ、Ｏ’Ｃｏｎｎｏｒ ＳＪ、ＭｃＣａｂｅ Ｓ、Ｃｈａｎ Ｂ、Ｈｏｔａｌｉｎｇ Ｔ、Ｃｈａｍｐｅ Ｍ、Ｆｏｘ ＪＡ、Ｊａｒｄｉｅｕ ＰＭ、Ｂｅｒｍａｎ ＰＷ、Ｐｒｅｓｔａ ＬＧ.、Ｈｕｍａｎｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ａｎ ａｎｔｉ－ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ｆｕｎｃｔｉｏｎ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ａｎｔｉｇｅｎ （ＬＦＡ）－１ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ａｎｄ ｒｅｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ ｔｈｅ ｈｕｍａｎｉｚｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｆｏｒ ｂｉｎｄｉｎｇ ｔｏ ｒｈｅｓｕｓ （ＬＦＡ）－１.、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ.、１９９６年１２月1日；１５７巻（１１号）：４９８６～９５頁に記載の配列。Ｍｙｌｏｔａｒｇ（商標）（ゲムツズマブオゾガマイシン）：（ＣＯＭＳ、Ａｖｄａｌｏｖｉｃ ＮＭ、Ｃａｒｏｎ ＰＣ、Ａｖｄａｌｏｖｉｃ ＭＶ、Ｓｃｈｅｉｎｂｅｒｇ ＤＡ、Ｑｕｅｅｎ Ｃ：Ｃｈｉｍｅｒｉｃ ａｎｄ ｈｕｍａｎｉｚｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｗｉｔｈ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ｆｏｒ ｔｈｅ ＣＤ３３ ａｎｔｉｇｅｎ.、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ、１４８巻：１１４９頁、１９９１年に記載の配列）（Ｃａｒｏｎ ＰＣ、Ｓｃｈｗａｒｔｚ ＭＡ、Ｃｏ ＭＳ、Ｑｕｅｅｎ Ｃ、Ｆｉｎｎ ＲＤ、Ｇｒａｈａｍ ＭＣ、Ｄｉｖｇｉ ＣＲ、Ｌａｒｓｏｎ ＳＭ、Ｓｃｈｅｉｎｂｅｒｇ ＤＡ.、Ｍｕｒｉｎｅ ａｎｄ ｈｕｍａｎｉｚｅｄ ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｓ ｏｆ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｍ １９５ （ａｎｔｉ－ＣＤ３３） ｆｏｒ ｔｈｅ ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ ａｃｕｔｅ ｍｙｅｌｏｇｅｎｏｕｓ ｌｅｕｋｅｍｉａ.、Ｃａｎｃｅｒ.、１９９４年2月1日；７３巻（補遺３）：１０４９～５６頁）。Ｓｏｌｉｒｉｓ（商標）（エクリズマブ）：＿Ｈｉｌｌｍｅｎ Ｐ、Ｙｏｕｎｇ Ｎ、Ｓｃｈｕｂｅｒｔ Ｊ、Ｂｒｏｄｓｋｙ Ｒ、Ｓｏｃｉｅ Ｇ、Ｍｕｕｓ Ｐ、Ｒｏｔｈ Ａ、Ｓｚｅｒ Ｊ、Ｅｌｅｂｕｔｅ Ｍ、Ｎａｋａｍｕｒａ Ｒ、Ｂｒｏｗｎｅ Ｐ、Ｒｉｓｉｔａｎｏ Ａ、Ｈｉｌｌ Ａ、Ｓｃｈｒｅｚｅｎｍｅｉｅｒ Ｈ、Ｆｕ Ｃ、Ｍａｃｉｅｊｅｗｓｋｉ Ｊ、Ｒｏｌｌｉｎｓ Ｓ、Ｍｏｊｃｉｋ Ｃ、Ｒｏｔｈｅｒ Ｒ、Ｌｕｚｚａｔｔｏ Ｌ（２００６年）、Ｔｈｅ ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｅｃｕｌｉｚｕｍａｂ ｉｎ ｐａｒｏｘｙｓｍａｌ ｎｏｃｔｕｒｎａｌ ｈｅｍｏｇｌｏｂｉｎｕｒｉａ.、Ｎ ＥｎｇｌＪ Ｍｅｄ、３５５巻（１２号）：１２３３～４３頁。Ｔｙｓａｂｒｉ（商標）（ナタリズマブ）：Ｌｅｇｅｒ ＯＪ、Ｙｅｄｎｏｃｋ ＴＡ、Ｔａｎｎｅｒ Ｌ、Ｈｏｍｅｒ ＨＣ、Ｈｉｎｅｓ ＤＫ、Ｋｅｅｎ Ｓ、Ｓａｌｄａｎｈａ Ｊ、Ｊｏｎｅｓ ＳＴ、Ｆｒｉｔｚ ＬＣ、Ｂｅｎｄｉｇ ＭＭ.、Ｈｕｍａｎｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｍｏｕｓｅ ａｎｔｉｂｏｄｙ ａｇａｉｎｓｔ ｈｕｍａｎ ａｌｐｈａ－４ ｉｎｔｅｇｒｉｎ： ａ ｐｏｔｅｎｔｉａｌ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｆｏｒ ｔｈｅ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｓｃｌｅｒｏｓｉｓ.、Ｈｕｍ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ.、１９９７年；８巻（１号）：３～１６頁に記載の配列。Ｓｙｎａｇｉｓ（商標）（パリビズマブ）

：Ｊｏｈｎｓｏｎ Ｓ、Ｏｌｉｖｅｒ Ｃ、Ｐｒｉｎｃｅ ＧＡ、Ｈｅｍｍｉｎｇ ＶＧ、Ｐｆａｒｒ ＤＳ、Ｗａｎｇ ＳＣ、Ｄｏｒｍｉｔｚｅｒ Ｍ、Ｏ’Ｇｒａｄｙ Ｊ、Ｋｏｅｎｉｇ Ｓ、Ｔａｍｕｒａ ＪＫ、Ｗｏｏｄｓ Ｒ、Ｂａｎｓａｌ Ｇ、Ｃｏｕｃｈｅｎｏｕｒ Ｄ、Ｔｓａｏ Ｅ、Ｈａｌｌ ＷＣ、Ｙｏｕｎｇ ＪＦ.、Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ａ ｈｕｍａｎｉｚｅｄ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ （ＭＥＤＩ－４９３） ｗｉｔｈ ｐｏｔｅｎｔ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ａｎｄ ｉｎ ｖｉｖｏ ａｃｔｉｖｉｔｙ ａｇａｉｎｓｔ ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ ｓｙｎｃｙｔｉａｌ ｖｉｒｕｓ.、Ｊ Ｉｎｆｅｃｔ Ｄｉｓ.、１９９７年１１月；１７６巻（５号）：１２１５～２４頁に記載の配列。イピリムマブ：Ｊ. Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ：２００７年；３０巻（８号）：８２５～８３０頁、Ｉｐｉｌｉｍｕｍａｂ （Ａｎｔｉ－ＣＴＬＡ４ Ａｎｔｉｂｏｄｙ） Ｃａｕｓｅｓ Ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ Ｍｅｔａｓｔａｔｉｃ Ｒｅｎａｌ Ｃｅｌｌ Ｃａｎｃｅｒ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ Ｗｉｔｈ Ｅｎｔｅｒｉｔｉｓ ａｎｄ Ｈｙｐｏｐｈｙｓｉｔｉｓ；Ｊａｍｅｓ Ｃ. Ｙａｎｇ、Ｍａｒｙｂｅｔｈ Ｈｕｇｈｅｓ、Ｕｄａｉ Ｋａｍｍｕｌａ、Ｒｉｃｈａｒｄ Ｒｏｙａｌ、Ｒｉｃｈａｒｄ Ｍ. Ｓｈｅｒｒｙ、Ｓｕｚａｎｎｅ Ｌ. Ｔｏｐａｌｉａｎ、Ｋｉｍｂｅｒｌｙ Ｂ. Ｓｕｒｉ、Ｃａｔｈｅｒｉｎｅ Ｌｅｖｙ、Ｔａｍｉｋａ Ａｌｌｅｎ、Ｓｈａｒｏｎ Ｍａｖｒｏｕｋａｋｉｓ、Ｉｓｒａｅｌ Ｌｏｗｙ、Ｄｏｎａｌｄ Ｅ. Ｗｈｉｔｅ、ａｎｄ Ｓｔｅｖｅｎ Ａ. Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ。トレメリムマブ：Ｏｎｃｏｌｏｇｉｓｔ、２００７年；１２巻；１５３～８８３頁；Ｂｌｏｃｋｉｎｇ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｉｎ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｆｏｒ Ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ Ｃａｎｃｅｒ；Ａｎｔｏｎｉ Ｒｉｂａｓ、Ｄｏｕｇｌａｓ Ｃ. Ｈａｎｓｏｎ、Ｄｅｎｎｉｓ Ａ. Ｎｏｅ、Ｒｏｂｅｒｔ Ｍｉｌｌｈａｍ、Ｄｅｂｏｒａｈ Ｊ. Ｇｕｙｏｔ、Ｓｔｅｖｅｎ Ｈ. Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ、Ｐａｕｌ Ｃ. Ｃａｎｎｉｆｆ、Ａｍａｒｎａｔｈ ＳｈａｒｍａおよびＪｅｓｕｓ Ｇｏｍｅｚ－Ｎａｖａｒｒｏ。

【０１０９】

（ｂ）マスキング部分（ＭＭ）

本開示のマスキング部分（ＭＭ）とは、一般に、ＡＢとカップリングしており、その標的と特異的に結合するＡＢの能力を低下させるように位置するアミノ酸配列をいう。一部の例では、ＭＭはリンカーによってＡＢとカップリングしている。

【０１１０】

ＡＢがＭＭで修飾されており、標的の存在下にある場合、ＡＢとその標的との特異的結合は、標的とＭＭで修飾されていないＡＢとの特異的結合または親ＡＢとの特異的結合と比較して、低下または阻害されている。

【０１１１】

ＡＢの標的に対するＭＭで修飾されたＡＢのK_dは、一般に、ＭＭで修飾されていないＡＢのK_dまたは標的に対する親ＡＢのK_dよりも高い。逆に、標的に対するＭＭで修飾されたＡＢの結合親和性は、一般に、標的に対するＭＭで修飾されていないＡＢまたは親ＡＢの結合親和性よりも低い。

【０１１２】

ＡＢに対するＭＭの解離定数（K_d）は、一般に標的に対するＡＢのK_dよりも高い。逆に、ＡＢに対するＭＭの結合親和性は、一般に標的に対するＡＢの結合親和性よりも低い。

【０１１３】

ＡＢがＭＭで修飾されており、標的の存在下にある場合、ＡＢとその標的との特異的結合は、標的とＭＭで修飾されていないＡＢとの特異的結合または親ＡＢとの特異的結合と比較して、低下または阻害されている場合がある。ＡＢがＣＭおよびＭＭで修飾されており、標的の存在下にあるが、ＣＭを切断するために十分な酵素または酵素活性の存在下にない場合、改変したＡＢと標的との特異的結合が、標的およびＣＭを切断するために十分な酵素または酵素活性の存在化におけるＣＭおよびＭＭで改変したＡＢの特異的結合と比

較して、低下または阻害される。

【０１１４】

ＭＭはＡＢと標的との結合を阻害することができる。ＭＭは、ＡＢの抗原結合ドメインと結合してＡＢとその標的との結合を阻害することができる。ＭＭは、ＡＢと標的との結合を立体的に阻害することができる。ＭＭは、ＡＢとその標的との結合をアロステリックに阻害することができる。ＡＢが修飾されているまたはＭＭとカップリングしており、標的の存在下にあるこれらの実施形態では、本明細書中に記載のようにｉｎ　ｖｉｖｏまたは標的置換ｉｎ　ｖｉｔｒｏの免疫吸着アッセイで測定した際に、ＡＢと標的との結合が存在しないもしくは結合が実質的に存在しない、または、標的とＭＭで修飾されていないＡＢとの結合、親ＡＢとの結合、またはＭＭとカップリングしていないＡＢとの結合と比較して、．００１％、．０１％、．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、もしくは５０％以下のＡＢと標的との結合のみが、少なくとも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、１２カ月間もしくはそれより長くの間存在する。

【０１１５】

特定の実施形態では、ＭＭはＡＢの天然の結合パートナーではない。ＭＭは、ＡＢとの結合の親和性および／または結合力を少なくともわずかに減少させるアミノ酸変化を含有する、ＡＢの改変された結合パートナーであり得る。一部の実施形態では、ＭＭは、ＡＢの天然の結合パートナーとの相同性を含有しないまたは実質的に含有しない。他の実施形態では、ＭＭは、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、または８０％以下しか、ＡＢの天然の結合パートナーと類似でない。

【０１１６】

ＡＢが「マスキングされた」状態にある場合、さらにはＡＢの標的の存在下にある場合、ＭＭはＡＢと標的との結合を妨害または阻害する。しかし、ＡＢのマスキングされていない状態では、ＭＭの、ＡＢとの標的結合の妨害は低下し、それにより、ＡＢが標的により接近することが可能となり、標的結合をもたらす。

【０１１７】

たとえば、改変抗体がＡＡでありＣＭを含む場合、ＡＢは、酵素、好ましくは疾患に特異的な酵素の存在下で、ＣＭの切断の際に脱マスキングすることができる。したがって、ＭＭは、ＡＡが切断されていない場合に標的結合からのＡＢのマスキングを提供するが、ＡＡが切断されたコンホメーションにある場合に、標的とＡＢとの結合を実質的にまたは顕著に妨害しないまたはそれと競合しないものである。したがって、ＭＭおよびＣＭの組合せは切替可能／活性化可能な表現型を容易にし、ＭＭはＡＡが切断されていない場合に標的の結合を減少させ、プロテアーゼによるＣＭの切断は標的の結合の増加をもたらす。

【０１１８】

ＭＭの構造的特性は、ＡＢと標的との結合の妨害に必要な最小のアミノ酸配列、目的の標的タンパク質－ＡＢの結合対、ＡＢの大きさ、ＣＭの長さ、ＣＭがＭＭ内に位置し、切断されていないＡＡ中のＡＢをマスキングする役割も果たすかどうか、リンカーの存在または非存在、システイン－システインジスルフィド結合のＣＭを提供するために適切なＡＢ内またはそれに隣接するシステインの存在または非存在などの、様々な要因に応じて変動する。

【０１１９】

ＡＡ中の抗体またはその断片（ＡＢ）をマスキングするための一戦略は、ＡＢに対する標的の接近を立体的に邪魔するループ中でＡＡを提供することである。この戦略では、システイン間にジスルフィド結合が形成される際にＡＢがマスキングされるように、システインがＡＡのＮ末端、Ｃ末端、またはＡＢの近くに位置する。

【０１２０】

一部の実施形態では、ＭＭは共有結合によってＡＡとカップリングしている。別の実施形態では、ＡＡ組成物は、ＭＭをＡＡのＮ末端と結合させることによって、標的との結合が妨げられている。さらに別の実施形態では、ＡＡは、ＭＭとＡＡとの間のシステイン－システインジスルフィド橋によってＭＭとカップリングしている。

【０１２１】

ＭＭは様々な異なる形態で提供することができる。特定の実施形態では、ＭＭは、ＡＢの公知の結合パートナーであるように選択することができるが、ただし、ＭＭは、標的－ＡＢの結合におけるＭＭの妨害を低下させるために、ＡＢがＣＭの切断後に結合するように設計されている標的タンパク質よりも低い親和性および／または結合力でＡＢと結合する。つまり、上述のように、ＭＭは、ＡＡが切断されていない場合にＡＢを標的結合からマスキングするが、ＡＡが切断されたコンホメーションにある場合に、標的に対する結合を実質的または顕著に妨害しないまたはそれと競合しないものである。具体的な実施形態では、ＡＢおよびＭＭは、ＡＢおよびＭＭのうちの少なくとも１つが天然に存在する結合パートナーのメンバーのアミノ酸配列を有さないように、天然に存在する結合パートナー対のアミノ酸配列を含有しない。

【０１２２】

カップリングした際のＡＢとその標的との結合を阻害するＭＭの効率は、本開示の実施例セクションにおいて本明細書中に記載されているように、免疫吸着標的置換アッセイを用いたマスキング効率の尺度によって測定することができる。ＭＭのマスキング効率は、少なくとも２つのパラメータ、すなわち、抗体またはその断片に対するＭＭの親和性、およびＡＢとその標的との結合の妨害に対するＭＭの空間的な関係性によって決定される。

【０１２３】

親和性に関して、例として、１つのＭＭは、高い親和性を有するがＡＢ上の結合部位を部分的にのみ阻害し得る一方で、別のＭＭは、ＡＢに対してより低い親和性を有するが標的結合を完全に阻害し得る。短期間の間は、より低い親和性のＭＭは十分なマスキングを示し得るが、その一方で、時間とともに、同じＭＭは標的によって置き換えられ得る（ＡＢに対する不十分な親和性が原因）。

【０１２４】

同様の様式で、同じ親和性を有する２つのＭＭは、これらが、どれほど良好にＡＢ上の結合部位の阻害またはＡＢがその標的と結合することの防止を促進するかに基づいて、異なる程度のマスキングを示し得る。別の例では、高い親和性を有する１つのＭＭは、その標的との結合が完全に阻害されるように、ＡＢと結合してその構造を変化させ得る一方で、高い親和性を有する別のＭＭは、結合を部分的にのみ阻害し得る。その結果、有効なＭＭの発見は親和性のみに基づくことができず、マスキング効率の経験的尺度が含まれる場合がある。ＡＡ中のＭＭの時間依存性の標的置換は、ＭＭについて最適化および選択するために測定することができる。この目的のために新規標的置換アッセイが本明細書中に記載されている。

【０１２５】

一部の実施形態では、ＭＭは、スクリーニング手順によって、可変のＭＭを有する候補ＡＡのライブラリから同定することができる。たとえば、ＡＢおよびＣＭを選択して所望の酵素／標的の組合せを提供することができ、ＭＭのアミノ酸配列を以下に記載のスクリーニング手順によって同定して、切替可能な表現型を提供するＭＭを同定することができる。たとえば、ランダムペプチドライブラリ（たとえば、約２～約４０個以上のアミノ酸）を本明細書中に開示するスクリーニング方法で使用して、適切なＭＭを同定し得る。具体的な実施形態では、抗体またはその断片（ＡＢ）に対して特異的結合親和性を有するＭＭは、候補ＭＭからなるペプチド足場のライブラリであって、それぞれの足場が膜貫通タンパク質および候補ＭＭから構成されるライブラリを提供することが含まれる、スクリーニング手順によって同定することができる。その後、ライブラリを、完全長抗体、天然に存在する抗体断片、またはＡＢを含有する天然に存在しない断片（やはり目的の標的と結合することができる）などのＡＢの全体または一部分と接触させ、検出可能に結合したＡ

Ｂを有する１つまたは複数の候補ＭＭを同定する。スクリーニングには、さらに１回の磁気活性化分別（ＭＡＣＳ）または蛍光活性化分別（ＦＡＣＳ）のラウンドが含まれる場合がある。また、スクリーニングには、ＡＢに対するＭＭの解離定数（K_d）の決定および続くマスキング効率の決定も含まれる場合がある。

【０１２６】

このようにして、切断されていない状態でＡＢと標的との結合を阻害し、切断された状態でＡＢと標的との結合を可能にするＭＭを有するＡＡを同定することができ、さらに、切替可能な表現型の最適な動作範囲を有するＡＡの選択を提供することができる。望ましい切替表現型を有するＡＡを同定する方法を以下にさらに詳述する。

【０１２７】

あるいは、ＭＭはＡＢと特異的に結合せず、むしろ、立体障害などの非特異的な相互作用を介してＡＢ－標的の結合を妨害し得る。たとえば、ＭＭは、ＡＡの三次または四次構造によりＭＭが荷電に基づいた相互作用を介してＡＢをマスキングすることが可能となるように、切断されていないＡＡ中に位置して、それにより、ＭＭを固定して標的のＡＢへの接近を妨害し得る。

【０１２８】

また、ＡＡは、切替可能な表現型を容易にするために、環状構造などのコンホメーションが束縛された構造で提供することもできる。これは、システイン対の間のジスルフィド結合の形成によりＡＡがループまたは環状構造となるように、ＡＡ構築体中に１対のシステインを含めることによって達成できる。したがって、ＡＡは、所望のプロテアーゼによって切断可能に保たれる一方で、標的とＡＢとの結合の阻害を提供する。ＣＭが切断された後、環状構造は開かれ、ＡＢに対する標的の接近が可能となる。

【０１２９】

システイン対は、コンホメーションが束縛されたＡＡを提供するが、ＣＭの還元の後は標的とＡＢとの結合を実質的または顕著に妨害しない、ＡＡ中の任意の位置に位置することができる。たとえば、システイン対のシステイン残基は、ＭＭならびにＭＭおよびＡＢに隣接するリンカー中、ＭＭおよびＡＢに隣接するリンカー内、または他の適切な立体配置中に位置する。たとえば、ＭＭまたはＭＭに隣接するリンカーには１つまたは複数のシステイン残基が含まれることができ、システイン残基は、ＡＡが折り畳まれた状態にある場合にＭＭの向かいに位置するシステイン残基とジスルフィド橋を形成する。一般に、ＡＡの切断後に標的結合を妨害することを回避するために、システイン対のシステイン残基がＡＢの外側に位置することが望ましい。ジスルフィド結合させるシステイン対のシステインがＡＢ内に位置する場合、これが、還元剤に曝露した後にＡＢ－標的の結合の妨害を回避するように位置することが望ましい。

【０１３０】

システイン間のジスルフィド結合によって環状構造を形成することができる例示的なＡＡは、一般式（ＮからＣ末端またはＣからＮ末端の方向のどちらであってもよい）：

X_{n1}－（Cys_1）－X_m－ＣＭ－ＡＢ－（Cys_2）－X_{n2}

X_{n1}－シクロ［（Cys_1）－X_m－ＣＭ－ＡＢ－（Cys_2）］－X_{n2}

［式中、X_{n1}およびX_{n2}は、独立して、任意選択で存在するまたは存在せず、存在する場合は、独立して任意のアミノ酸を表し、柔軟なリンカーのアミノ酸配列（たとえば、少なくとも１つのＧｌｙ、Ｓｅｒ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、通常は少なくとも１つのＧｌｙまたはＳｅｒ、通常は少なくとも１つのＧｌｙ）が任意選択で含まれることができ、n_1およびn_2は、独立して、０または任意の整数、通常は１、２、３、４、５、６、７、８、９もしくは１０以下から選択され、

Cys_1およびCys_2は、ジスルフィド結合を形成することができる対の第１および第２のシステインを表し、

X_mはマスキングモチーフ（ＭＭ）のアミノ酸を表し、Ｘは任意のアミノ酸であり、X_mには、柔軟なリンカー（たとえば、少なくとも１つのＧｌｙ、Ｓｅｒ、Ａｓｎ、Ａｓｐ、通常は少なくとも１つのＧｌｙまたはＳｅｒ、通常は少なくとも１つのＧｌｙ）が任

意選択で含まれることができ、ｍは、１より大きい整数、通常は２、３、４、５、６、７、８、９、１０以上（上述）であり、
ＣＭは切断可能な部分を表し（本明細書中に記載）、
ＡＢは抗体またはその断片を表す（本明細書中に記載）］
のものであることができる。

【０１３１】

上記式中で使用するシクロは、ＡＡの環状構造を提供するＡＡ中のジスルフィド結合を示す。さらに、上記式は、ＭＭがＡＢ１をいい、ＡＢがＡＢ２をいい、ＡＢ１およびＡＢ２が第１および第２のＡＢの任意の指定であり、ＡＢと結合することができる標的が同じもしくは異なる標的、または同じ標的の同じもしくは異なる結合部位であり得る、二重標的結合ＡＡを企図する。そのような実施形態では、ＡＢ１および／またはＡＢ２は、標的と切断されていない二重標的結合ＡＡとの結合を妨害するマスキング部分として作用する。

【０１３２】

したがって、上に例示したように、システインは、ＡＡ中に位置して１つまたは２つのテイル（上記にX_{n1}およびX_{n2}によって表す）を可能にし、それにより、ＡＡがジスルフィド結合された構造（したがってコンホメーションが束縛された状態）にある場合にラッソまたはオメガ構造を生じる場合がある。テイルのアミノ酸配列は、標的受容体と結合してＡＡの局在化を促進することなどの、ＡＡのさらなる特長を提供することができる。

【０１３３】

特定の具体的な実施形態では、ＭＭはＡＡの細胞進入を阻害しない。

【０１３４】

（ｃ）切断可能な部分（ＣＭ）

一部の実施形態では、ＡＡの切断可能な部分（ＣＭ）には、プロテアーゼ、通常は細胞外プロテアーゼの基質として役割を果たすことができるアミノ酸配列が含まれ得る。他の実施形態では、ＣＭは、ジスルフィド結合を形成することができるシステイン－システイン対を含み、これは還元剤の作用によって切断することができる。他の実施形態では、ＣＭは、光分解の際に切断することができる基質を含む。

【０１３５】

ＣＭは、ＣＭが切断剤によって（たとえば、ＣＭのプロテアーゼ基質がプロテアーゼによって切断されるおよび／もしくはシステイン－システインジスルフィド結合が還元剤への曝露による還元を介して破壊される）または光誘導性の光分解によって切断され、標的の存在下で、切断された状態がもたらされた場合、ＡＢが標的と結合し、切断されていない状態では、標的の存在下で、ＡＢと標的との結合がＭＭによって阻害されるように、ＡＡ中に位置する（図２）。ＡＡが阻害されていないまたは切断されていないまたはマスキングされていないコンホメーションにある場合にＣＭの全体または一部分がＡＢのマスキングを促進するように、ＣＭのアミノ酸配列がＭＭと重複するまたはそれ中に含まれていてもよいことに注意されたい。

【０１３６】

ＣＭは、ＡＡのＡＢの所望の標的と共に組織中に共局在化しているプロテアーゼに基づいて選択し得る。プロテアーゼの基質が当分野で公知である、目的の標的がプロテアーゼと共に共局在化している様々な異なる条件は、公知である。癌の例では、標的組織は癌組織、特に固形腫瘍の癌組織であることができる。いくつかの癌、たとえば固形腫瘍において公知の基質を有するプロテアーゼのレベルが増加しているという報告が文献に存在する。たとえばＬａ　Ｒｏｃｃａら（２００４年）　Ｂｒｉｔｉｓｈ　Ｊ．　ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ、９０巻（７号）：１４１４～１４２１頁を参照されたい。疾患の非限定的な例には、すべての種類の癌（乳房、肺、結腸直腸、前立腺、頭頸部、膵臓等）、関節リウマチ、クローン病、黒色腫、ＳＬＥ、心血管損傷、虚血などが含まれる。さらに、ＶＥＧＦなどの抗血管形成標的が公知である。したがって、ＶＥＧＦなどの抗血管形成標的と結合でき

るようにＡＡのＡＢを選択した場合は、適切なＣＭは、癌の処置部位に存在するプロテアーゼ、特に非癌組織と比較して癌の処置部位に上昇したレベルで存在するものによって切断可能なペプチド基質を含むものである。例示的な一実施形態では、ＡＡのＡＢはＶＥＧＦと結合することができ、ＣＭはマトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）基質であり、したがってＭＭＰによって切断可能であることができる。他の実施形態では、ＡＡのＡＢは目的の標的と結合することができ、ＣＭは、たとえば、レグマイン、プラスミン、ＴＭＰＲＳＳ－３／４、ＭＭＰ－９、ＭＴ１－ＭＭＰ、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、ｕＰＡ、またはＰＳＡであることができる。他の実施形態では、ＡＡは、多発性硬化症または関節リウマチなどの癌以外の疾患において他の疾患に特異的なプロテアーゼによって活性化される。

【０１３７】

改変されていないまたは切断されていないＣＭは、ＭＭをＡＢに繋留することによって、ＡＢの効率的な阻害またはマスキングを可能にすることができる。ＣＭが改変（切断、還元、光分解）されている場合、ＡＢはもはや阻害またはマスキングされておらず、その標的と結合することができる。

【０１３８】

ＡＡは、ＡＡがたとえば第１のＣＭ（ＣＭ１）および第２のＣＭ（ＣＭ２）を含むように、複数のＣＭを含むことができる。ＣＭ１およびＣＭ２は、同じ酵素の異なる基質（たとえば酵素に対して異なる結合親和性を示す）、もしくは異なる酵素の異なる基質であることができ、または、ＣＭ１は酵素基質であることができ、ＣＭ２は光分解基質であることができるか、もしくはＣＭ１は酵素基質であることができ、ＣＭ２は還元の基質であることができるか、もしくはＣＭ１は光分解の基質であることができ、ＣＭ２は還元の基質などであることができる。

【０１３９】

ＣＭは、薬剤（すなわち、酵素、還元剤、光）によって、約．００１～１５００×$10^{4}$$M^{-1}$$S^{-1}$または少なくとも．００１、．００５、．０１、．０５、．１、．５、１、２．５、５、７．５、１０、１５、２０、２５、５０、７５、１００、１２５、１５０、２００、２５０、５００、７５０、１０００、１２５０、もしくは１５００×$10^{4}$$M^{-1}$$S^{-1}$の速度で特異的に修飾される（切断、還元または光分解）ことができる。

【０１４０】

酵素による特異的切断には、酵素とＣＭとの間の接触を行わせる。ＡＡがＭＭとカップリングしたＡＢを含み、ＣＭが標的および十分な酵素活性の存在下にある場合、ＣＭを切断することができる。十分な酵素活性とは、ＣＭと接触して切断をもたらす、酵素の能力をいうことができる。他の細胞性因子または酵素のタンパク質修飾が原因で、酵素がＣＭの近傍にあるが切断できない場合があることが、容易に想定されるであろう。

【０１４１】

例示的な基質には、それだけには限定されないが、表３の以下の酵素またはプロテアーゼのうちの１つまたは複数によって切断可能な基質が含まれることができる。

【０１４２】

【表３】

表3－例示的な酵素／プロテアーゼ

ADAM10	ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 8	ｶﾃﾌﾟｼﾝ S	MMP 8
ADAM12	ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 9	FAP	MMP 9
ADAM17	ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 10	ｸﾞﾗﾝｻﾞｲﾑ B	MMP-13
ADAMTS	ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 11	ｸﾞｱﾆｼﾞﾉﾍﾞﾝｿﾞｱﾀｰｾﾞ (GB)	MMP 14
ADAMTS5	ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 12	ヘプシン	MT-SP1
BACE	ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 13	ヒト好中球エラスターゼ (HNE)	ネプリライシン
カスパーゼ類	ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 14	レグマイン(Legumain)	NS3/4A
ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 1	カテプシン類	マトリプターゼ 2	プラスミン
ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 2	ｶﾃﾌﾟｼﾝ A	メプリン	PSA
ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 3	ｶﾃﾌﾟｼﾝ B	MMP 1	PSMA
ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 4	ｶﾃﾌﾟｼﾝ D	MMP 2	TACE
ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 5	ｶﾃﾌﾟｼﾝ E	MMP 3	TMPRSS 3 / 4
ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 6	ｶﾃﾌﾟｼﾝ K	MMP 7	uPA
ｶｽﾊﾟｰｾﾞ 7	MT1-MMP		

あるいは、またはそれに加えて、ＡＡのＡＢは目的の標的と結合するものであることができ、ＣＭは、システイン対のジスルフィド結合を含むことができ、したがって、たとえば、それだけには限定されないが、固形腫瘍の組織またはその周辺に大量に存在する場合がある、グルタチオン（ＧＳＨ）、チオレドキシン、ＮＡＤＰＨ、フラビン、アスコルベートなどの細胞性還元剤等の還元剤によって切断可能である。

【０１４３】

（ｄ）リンカー

本明細書中に記載の組成物での使用に適したリンカーは、ＡＢと標的との結合の阻害を容易にするために、一般に、改変したＡＢまたはＡＡの柔軟性を提供するものである。そのようなリンカーは、一般に柔軟なリンカーと呼ばれる。適切なリンカーは容易に選択することができ、様々な長さの適切なもののうちの任意のものであることができ、たとえば、１個のアミノ酸（たとえばＧｌｙ）から２０個のアミノ酸、２個のアミノ酸から１５個のアミノ酸、３個のアミノ酸から１２個のアミノ酸であり、４個のアミノ酸から１０個のアミノ酸、５個のアミノ酸から９個のアミノ酸、６個のアミノ酸から８個のアミノ酸、または７個のアミノ酸から８個のアミノ酸が含まれ、１、２、３、４、５、６、または７個のアミノ酸であり得る。

【０１４４】

例示的な柔軟なリンカーには、グリシンポリマー（Ｇ）$_n$、グリシン－セリンポリマー（たとえば、（ＧＳ）$_n$、（ＧＳＧＧＳ）$_n$および（ＧＧＧＳ）$_n$［式中、ｎは少なくとも１の整数である］が含まれる）、グリシン－アラニンポリマー、アラニン－セリンポリマー、ならびに当分野で公知の他の柔軟なリンカーが含まれる。グリシンおよびグリシン－セリンポリマーは比較的組織化されておらず、したがって、構成要素間の中性の繋留として役割を果たし得る。グリシンはアラニンよりも顕著にファイ－ファイ空間で接近し、より長い側鎖を有する残基よりもはるかに制限が少ない（Ｓｃｈｅｒａｇａ、Ｒｅｖ．Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｃｈｅｍ．、１１１７３～１４２頁（１９９２年）を参照）。例示的な柔軟なリンカーには、それだけには限定されないが、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ、Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ、Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙなどが含まれる。ＡＡの設計には、リンカーに柔軟なリンカーおよび柔軟性がより低い構造を与える１つまたは複数の部分が含まれて所望のＡＡ構造が提供されるように、全体的にまたは部分的に柔軟なリンカーが含まれることができることが、当業者には理解されよう。

【０１４５】

（ｅ）さらなる要素

上述の要素に加えて、改変したＡＢおよびＡＡは、追加の要素、たとえば、ＡＡのＮま

たはＣ末端側のアミノ酸配列などを含有することができる。たとえば、目的の細胞または組織への送達を容易にするために、ＡＡには標的化部分が含まれることができる。さらに、以下にさらに記述するＡＡライブラリのコンテキストでは、細胞表面上でのＡＡの表示を容易にするために、ＡＡを足場タンパク質のコンテキストで提供することができる。

【０１４６】

例示的な実施形態

本明細書中に提供する組成物およびＡＡは、治療学および診断学を含めた様々な目的に有用な場合がある。

【０１４７】

本明細書中に提供する例示的なＡＡは、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗ＥＧＦＲ、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗ＥＧＦＲ、ＭＭとカップリングした、ＴＭＰＲＳＳ－３／４で活性化可能な抗ＥＧＦＲ、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能なセツキシマブ、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能なセツキシマブ、ＭＭとカップリングした、ＴＭＰＲＳＳ－３／４で活性化可能なセツキシマブ、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能なｖｅｃｔｉｂｉｘ、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能なｖｅｃｔｉｂｉｘ、またはＭＭとカップリングした、ＴＭＰＲＳＳ－３／４で活性化可能なｖｅｃｔｉｂｉｘであることができる。一部の実施形態では、これらのＡＡは、頭頸部癌、または結腸、肺、もしくは膵臓の癌の診断の処置に有用な場合がある。

【０１４８】

本明細書中に提供する例示的なＡＡは、ＭＭとカップリングした、ＭＭＰ９で活性化可能な抗ＴＮＦアルファ、ＭＭとカップリングした、ＭＴ１－ＭＭＰで活性化可能な抗ＴＮＦアルファ、ＭＭとカップリングした、カテプシンで活性化可能な抗ＴＮＦアルファ、ＭＭとカップリングした、ＭＭＰ９で活性化可能なインフリキシマブ、ＭＭとカップリングした、ＭＴ１－ＭＭＰで活性化可能なインフリキシマブ、ＭＭとカップリングした、カテプシンで活性化可能なインフリキシマブ、ＭＭとカップリングした、ＭＭＰ９で活性化可能なアダリムマブ、ＭＭとカップリングした、ＭＴ１－ＭＭＰで活性化可能なアダリムマブ、またはＭＭとカップリングした、カテプシンで活性化可能なアダリムマブであることができる。一部の実施形態では、これらのＡＡは、関節リウマチまたは多発性硬化症の診断の処置に有用な場合がある。

【０１４９】

本明細書中に提供する例示的なＡＡは、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗ＣＤ１１ａ、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗ＣＤ１１ａ、ＭＭとカップリングした、カスパーゼで活性化可能な抗ＣＤ１１ａ、ＭＭとカップリングした、カテプシンで活性化可能な抗ＣＤ１１ａ、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能なエファリズマブ、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能なエファリズマブ、ＭＭとカップリングした、カスパーゼで活性化可能なエファリズマブ、ＭＭとカップリングした、カテプシンで活性化可能なエファリズマブ、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗ＣＳＦＲ、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗ＣＳＦＲ、ＭＭとカップリングした、カスパーゼで活性化可能な抗ＣＳＦＲ、またはＭＭとカップリングした、カテプシンで活性化可能な抗ＣＳＦＲであることができる。一部の実施形態では、これらのＡＡは、癌腫の腫瘍関連マクロファージの処置または診断に有用な場合がある。

【０１５０】

本明細書中に提供する例示的なＡＡは、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗ＣＴＬＡ－４、ＭＭとカップリングした、カスパーゼで活性化可能な抗ＣＴＬＡ－４、ＭＭとカップリングした、ＭＴ１－ＭＭＰで活性化可能な抗ＣＴＬＡ－４、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能なイピリムマブ、ＭＭとカップリングした、カスパーゼで活性化可能なイピリムマブであることができる。

【０１５１】

ＭＭとカップリングした、ＭＴ１－ＭＭＰで活性化可能なイピリムマブ、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能なトレメリムマブ、ＭＭとカップリングした、カスパーゼで活性化可能なトレメリムマブ、またはＭＭとカップリングした、ＭＴ１－ＭＭＰで活性化可能なトレメリムマブ。一部の実施形態では、これらのＡＡは、悪性黒色腫の処置または診断に有用な場合がある。

【０１５２】

本明細書中に提供する例示的なＡＡは、ＭＭとカップリングした、ＰＳＡで活性化可能な抗ＥＰＣＡＭ、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗ＥＰＣＡＭ、ＭＭとカップリングした、ＰＳＡで活性化可能なアデカツムマブ、またはＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能なアデカツムマブであることができる。一部の実施形態では、これらのＡＡは、前立腺癌の処置または診断に有用な場合がある。

【０１５３】

本明細書中に提供する例示的なＡＡは、ＭＭとカップリングした、ヒト好中球エラスターゼで活性化可能な抗ＣＤ４０Ｌ、またはＭＭとカップリングした、ヒト好中球エラスターゼで活性化可能なＨｕ５ｃ８であることができる。一部の実施形態では、これらのＡＡは、リンパ腫の処置または診断に有用な場合がある。

【０１５４】

本明細書中に提供する例示的なＡＡは、ＭＭとカップリングした、ベーターセクレターゼで活性化可能な抗Ｎｏｔｃｈ１、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗Ｎｏｔｃｈ１、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗Ｎｏｔｃｈ１、ＭＭとカップリングした、ｕＰＡで活性化可能な抗Ｎｏｔｃｈ１、ＭＭとカップリングした、ベーターセクレターゼで活性化可能な抗Ｎｏｔｃｈ３、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗Ｎｏｔｃｈ３、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗Ｎｏｔｃｈ３、ＭＭとカップリングした、ｕＰＡで活性化可能な抗Ｎｏｔｃｈ３、ＭＭとカップリングした、ベーターセクレターゼで活性化可能な抗Ｊａｇｇｅｄ１、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗Ｊａｇｇｅｄ１、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗Ｊａｇｇｅｄ１、ＭＭとカップリングした、ｕＰＡで活性化可能な抗Ｊａｇｇｅｄ１、ＭＭとカップリングした、ベーターセクレターゼで活性化可能な抗Ｊａｇｇｅｄ２、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗Ｊａｇｇｅｄ２、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗Ｊａｇｇｅｄ２、またはＭＭとカップリングした、ｕＰＡで活性化可能な抗Ｊａｇｇｅｄ２であることができる。一部の実施形態では、これらのＡＡは、三重陰性（ＥＲ、ＰＲおよびＨｅｒ２に陰性）の乳房、頭頸部、結腸および他の癌腫の処置または診断に有用な場合がある。

【０１５５】

本明細書中に提供する例示的なＡＡは、ＭＭとカップリングした、ＭＭＰで活性化可能な抗ＣＤ５２、またはＭＭとカップリングした、ＭＭＰで活性化可能な抗ｃａｍｐａｔｈであることができる。一部の実施形態では、これらのＡＡは、多発性硬化症の処置または診断に有用な場合がある。

【０１５６】

本明細書中に提供する例示的なＡＡは、ＭＭとカップリングした、ＭＭＰで活性化可能な抗ＭＵＣ１、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗ＭＵＣ１、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗ＭＵＣ１、またはＭＭとカップリングした、ｕＰＡで活性化可能な抗ＭＵＣ１であることができる。一部の実施形態では、これらのＡＡは、上皮由来の腫瘍の処置または診断に有用な場合がある。

【０１５７】

本明細書中に提供する例示的なＡＡは、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗ＩＧＦ１Ｒ、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗ＩＧＦ１Ｒ、ＭＭとカップリングした、カスパーゼで活性化可能な抗ＩＧＦ１Ｒ、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗フィギツムマブ、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗フィギツムマブ、またはＭＭとカップリングした、カスパーゼで活

性化可能な抗フィギツムマブであることができる。一部の実施形態では、これらのＡＡは、非小細胞肺、および他の上皮の腫瘍の処置または診断に有用な場合がある。

【０１５８】

本明細書中に提供する例示的なＡＡは、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗トランスフェリン受容体、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗トランスフェリン受容体、またはＭＭとカップリングした、カスパーゼで活性化可能な抗トランスフェリン受容体であることができる。一部の実施形態では、これらのＡＡは、固形腫瘍、膵臓腫瘍の処置または診断に有用な場合がある。

【０１５９】

本明細書中に提供する例示的なＡＡは、ＭＭとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗ｇｐ１３０、ＭＭとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗ｇｐ１３０、またはＭＭとカップリングした、ｕＰＡで活性化可能な抗ｇｐ１３０であることができる。一部の実施形態では、これらのＡＡは、固形腫瘍の処置または診断に有用な場合がある。

【０１６０】

特定の他の非限定的な例示的な実施形態では、活性化可能な抗体組成物には、Ｎｏｔｃｈ１に特異的なレグマインのマスキングされたＡＢ、Ｊａｇｇｅｄ１に特異的なｕＰＡで活性化可能なマスキングされたＡＢ、プラスミンで活性化可能なマスキングされた抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ、ＭＭＰ－９で活性化可能なマスキングされた抗ＶＣＡＭ　ｓｃＦｖ、およびＭＭＰ－９で活性化可能なマスキングされた抗ＣＴＬＡ４が含まれる。

【０１６１】

これらのＡＡは例としてのみ提供し、そのような酵素で活性化可能なマスキングされた抗体のＡＡは、それだけには限定されないが表１に記載の任意の標的に対して、かつそれだけには限定されないが表２に記載の任意の抗体を用いることによって、設計することができる。

【０１６２】

活性化可能な抗体複合体

図３４～３６に示すように、本発明の一態様では、ＡＡは２つ以上のＡＢを含む複合体（ＡＡＣ）として存在する。本開示は、１つまたは複数の標的タンパク質に対して活性化可能／切替可能な結合を示す、活性化可能な抗体の複合体（ＡＡＣ）を提供する。一般に、ＡＡＣには、１つまたは複数の抗体または抗体断片（ＡＢ）、マスキング部分（ＭＭ）、および切断可能な部分（ＣＭ）が含まれる。一部の実施形態では、ＣＭは、目的のプロテアーゼの基質として役割を果たすアミノ酸配列を含有する。他の実施形態では、ＣＭは、還元によって切断可能なシステイン－システインジスルフィド結合を提供する。ＡＡＣは、少なくとも１つのＡＢが、改変されていない場合に、ＣＭの改変後、たとえば、切断剤（たとえばＣＭの切断部位を認識するプロテアーゼ）または還元剤（たとえばＣＭ中のジスルフィド結合を還元する還元剤）の存在下よりも、標的に対する接近可能性が低いような、活性化可能なコンホメーションを示す。

【０１６３】

ＡＡＣのＣＭおよびＡＢは、ＡＢが目的の標的の結合部分を表し、ＣＭが被験体内の処置部位で標的と共に共局在化しているプロテアーゼの基質を表すように、選択し得る。一部の実施形態では、ＡＡＣは、これらがマスキングされていない場合に、そうでなければ非処置部位でのＡＢの結合の結果もたらされ得る毒性および／または有害な副作用の低下を提供することができる。一部の実施形態では、ＡＡＣは、検出可能な部分または診断剤をさらに含むことができる。特定の実施形態では、ＡＡＣは、抗原結合領域の外に配置された治療剤と結合体化している。また、ＡＡＣは、診断および／もしくはイメージング方法において、または試料中の切断剤の存在もしくは非存在を検出するために使用することもできる。

【０１６４】

ＡＡＣの模式図を図４３に提供する。例示したように、ＡＡＣの要素は、ＣＭが、切断

された状態（または比較的活性の状態）で標的の存在下にある場合はＡＢが標的と結合する一方で、切断されていない状態（または比較的不活性の状態）で標的の存在下にある場合は、複合体中のＭＭによるＡＢのマスキングが原因でＡＢと標的との結合が阻害されるように位置するように、配置されている。本明細書中で使用する用語、切断された状態とは、プロテアーゼによるＣＭの切断および／またはＣＭのシステイン－システインジスルフィド結合の還元後の、ＡＡＣの状態をいう。本明細書中で使用する用語、切断されていない状態とは、プロテアーゼによるＣＭの切断の非存在下および／またはＣＭのシステイン－システインジスルフィド結合の還元の非存在下における、ＡＡＣの状態をいう。上述のように、本明細書中で使用する用語ＡＡＣとは、その切断されていない（ネイティブ）状態およびその切断された状態の両方のＡＡＣをいう。一部の実施形態では、切断されたＡＡＣはプロテアーゼによるＣＭの切断が原因でＭＭを欠き、少なくともＭＭの放出をもたらし得ることが、当業者には明らかであろう（たとえば、ＭＭが共有結合によってＡＡＣと結合していない場合）。

【０１６５】

活性化可能または切替可能とは、ＡＡＣが、ネイティブまたは切断されていない状態（すなわち第１のコンホメーション）にある場合に標的との結合の第１のレベルを示し、切断された状態（すなわち第２のコンホメーション）にある場合に標的との結合の第２のレベルを示し、第２の標的結合レベルは第１の結合レベルよりも高いことを意味する。一般に、ＡＡＣのＡＢに対する標的の接近は、ＣＭを切断することができる切断剤の存在下において、そのような切断剤の非存在下よりも高い。したがって、ネイティブまたは切断されていない状態では、ＡＢは標的結合からマスキングされており（すなわち、第１のコンホメーションとは、ＡＢに対する標的の接近を妨害することである）、切断された状態では、ＡＢは標的結合に関してマスキングされていない。

【０１６６】

一般に、ＡＡＣは、コンホメーションが束縛された場合にＭＭがＡＢのマスキングを提供するように、目的のＡＢ（複数可）を選択し、ＡＡＣの残りの部分を構築することによって設計することができる。二重標的結合ＡＡＣは、同じまたは異なる標的と結合し得る２つのＡＢを含有する。具体的な実施形態では、二重標的化ＡＡＣは、二重特異性抗体または抗体断片を含有する。

【０１６７】

特定の実施形態では、複合体は２つの活性化可能な抗体（ＡＡ）からなり、そのそれぞれは、相互マスキングが起こる、すなわち、一方のＡＡ上のＭＭが他方のＡＡ上のＡＢによる標的結合を妨害するように、ＡＢ、ＣＭ、およびＭＭを含有する（図３４Ａ）。他の実施形態では、複合体は２つのＡＡからなり、それぞれのＡＡがＡＢを含有し、１つが、普遍的相互マスキングが起こる、すなわち、ＭＭが複合体の形成をもたらし、両方のＡＡ上のＡＢによる標的結合を妨害するように、ＣＭおよびＭＭを含有する（図３４Ｂ）。他の実施形態では、複合体は２つのＡＡからなり、そのそれぞれは、相互マスキングが起こる、すなわち、一方のＡＡ上のＭＭが他方のＡＡ上のＡＢによる標的結合を妨害するように、２つずつのＡＢ、ＣＭ、およびＭＭを含有する（図３４Ｃ）。他の実施形態では、複合体は２つのＡＡからなり、１つのＡＡは、普遍的相互マスキングが起こる、すなわち、ＭＭが両方のＡＡ上のＡＢによる標的結合を妨害するように、２つずつのＡＢ、ＣＭ、およびＭＭを含有する（図３４Ｄ）。他の実施形態では、複合体は２つの二重特異性ＡＡの分子からなり、二重特異性ＡＡは、複合体中で相互マスキングが起こる、すなわち、ＭＭ１が向かいの分子上のＡＢ１による標的結合を妨害し、ＭＭ２が向かいの分子上のＡＢ２による標的結合を妨害するように、２つずつのＡＢ、ＣＭ、およびＭＭを含有する（図３４Ｅ）。他の実施形態では、複合体は２つの二重特異性ＡＡの分子からなり、二重特異性ＡＡは、複合体中で普遍的相互マスキングが起こる、すなわち、ＭＭが両方のＡＢによる標的結合を妨害するように、２つのＡＢ、１つのＣＭ、および１つのＭＭを含有する（図３４Ｆ）。

【０１６８】

一般に、ＡＡＣの分解およびＡＡＣのＡＢのうちの少なくとも１つに対する標的の接近は、ＣＭを切断することができる切断剤の存在下において、そのような切断剤の非存在下よりも高い（図３５）。複合体の２つのＡＡは、異なる標的と結合するＡＢ、または同じ標的上の異なるエピトープと結合するＡＢを含有し得る。

【０１６９】

複合体のＭＭ／ＡＢ対のうちの１つを安定した複合体形成に使用してよく、これはそれ自体では治療的標的を有さない。非治療的ＡＢに対して高い親和性のＭＭにより、治療的ＡＢに対してより低い親和性のＭＭとさえも、安定した複合体の形成が可能となる。多価複合体のコンテキストにおいては、治療的ＡＢに対して低い親和性のＭＭが治療的ＡＢをマスキングするために十分であるが、切断後は、これはより容易に分解する。切断された状態での最大の標的結合のためには、ＡＢに対するＭＭおよび標的の親和性の差異を最大にするべきである。

【０１７０】

他の実施形態では、ＡＢは複合体の向かいの分子上のＭＭと共有結合を形成し得る。切断剤の存在下では、他のＡＢのうちの少なくとも１つがその標的と結合するように、複合体が分解する（図３６）。そのような共有結合は、ＭＭおよびＡＢ中の反応性アミノ酸側鎖間で形成され得る、たとえばシステイン間のジスルフィド結合、または、反応基のＭＭおよび触媒的ＡＢへの化学結合体化によって形成され得る。共有結合抗体の例には、Ｃｈｍｕｒａ Ａ．Ｊ．ら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．、２００１年７月１７日、９８巻（１５号）：８４８０～８４８４頁、Ｒａｄｅｒ，Ｃ．ら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．、２００３年４月２９日、１００巻（９号）：５３９６～５４００頁、Ａｒｍｅｎｔａｎｏ，Ｆ．ら、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｌｅｔｔｅｒｓ、２００６年２月２８日、１０３巻（１号）：５１～５７頁を参照されたい。

【０１７１】

ＭＭおよびＣＭは明確な構成要素として示すが、ＭＭおよびＣＭのアミノ酸配列が、たとえばＣＭが完全にまたは部分的にＭＭ内に含有されるように重なることができることが企図されることに注意されたい。多くの実施形態では、柔軟性を提供するために１つまたは複数のリンカー、たとえば柔軟なリンカーをＡＡＣ構築体内に、ＭＭ－ＣＭの接合部、ＣＭ－ＡＢの接合部、または両方のうちの１つまたは複数で挿入することが望ましい場合がある。上述の要素に加えて、ＡＡＣは、たとえばＡＡＣのＮまたはＣ末端側のアミノ酸配列などの追加の要素を含有することができる。

【０１７２】

活性化可能な抗体結合体

本発明の一態様では、ＡＡのＡＢは治療剤などの薬剤とさらに結合体化しており、したがって、具体的な種類のＡＡである活性化可能な抗体結合体（ＡＡＣＪ）が生成される。薬剤は、直接またはリンカーを介してＡＢと付着させる。そのような薬剤またはリンカーは、分子の抗原結合部位の一部ではなく、それに直接関与してもいないＡＢの領域と選択的に付着させる。例示的なＡＡＣＪを図２０に示す。

【０１７３】

本発明の一実施形態によれば、薬剤をＡＢと結合体化させ得る。ＡＢと結合体化した薬剤の送達および放出を所望する場合、補体を活性化することが公知の免疫グロブリンクラスを使用する。他の応用では、補体を活性化することができない担体免疫グロブリンを使用し得る。そのような免疫グロブリン担体には、特定の抗体クラス、たとえば、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、特定のＩｇＧのサブクラス、あるいは免疫グロブリンの特定の断片、たとえば、半ＡＢ（単一の重鎖：軽鎖の対）、またはＦａｂ、Ｆａｂ’もしくは（Ｆａｂ’）２断片が含まれ得る。

【０１７４】

例示的なＡＡＣＪは、治療剤とカップリングしたＡＡであって、ＡＢがＥＧＦＲ、ＣＤ４４、Ｎｏｔｃｈ１、２、３もしくは４、Ｊａｇｇｅｄ１もしくは２、ＥｐＣＡＭ、また

はＩＧＦ－１Ｒに向けられたものである。
【０１７５】
本明細書中に記載の化学連結方法は、生じるＡＡＣＪが抗原と結合して補体カスケードを活性化する能力を保持することを可能にする（結合体化していないＡＡもそのような能力を有していた場合）。その結果、ＡＡＣＪを個体に投与した場合、続くｉｎ　ｖｉｖｏでの標的抗原との免疫複合体の形成は、個体の血清補体系を活性化することができる。リンカーは補体による切断に感受性があるように設計されており、したがって、薬剤は、補体カスケードの酵素のうちの１つまたは複数によって標的部位によって切断することができる。薬剤の放出の大部分は標的部位への投与の後に起こる。
【０１７６】
例示的な一実施形態では、腫瘍のすべての細胞がそれぞれ標的抗原決定基を保有するわけではないことは公知である。したがって、標的細胞内への内部移行を要する送達系において、抗原決定基を保有し、結合体を内部移行させることができる腫瘍細胞への送達が成功する。抗原決定基を保有する、またはこの内部移行ができない腫瘍細胞は、処置を免れる。本発明の方法によれば、ＡＡＣＪは薬剤を標的細胞へと送達する。しかし、より重要なことに、標的細胞に付着した後は、本発明に記載した方法により、活性または活性化可能な治療剤の放出または活性化が可能となる。放出または活性化は、それだけには限定されないが以下によって活性化される個々、すなわち、補体酵素、組織プラスミノーゲン活性化因子、ウロキナーゼ、プラスミンもしくはタンパク質分解活性を有する別の酵素によって、または光増感剤の活性化もしくは基質修飾によって媒介され得る。放出された後、薬剤は自由に標的部位、たとえば腫瘍塊を透過する。その結果、薬剤は、抗原決定基を保有しないまたは結合体を内部移行させることができない腫瘍細胞に作用する。さらに、プロセス全体は結合体の内部移行に依存しない。
【０１７７】
（ａ）薬剤を結合体化させる方法
本発明は薬剤をＡＢ（抗体およびその断片が含まれる）に付着させるためにいくつかの方法を利用し、２つの例示的な方法は、ＡＢの炭水化物部分への付着、またはＡＢのスルフヒドリル基への付着である。特定の実施形態では、付着は免疫特異性および免疫反応性などのＡＢまたはＡＡ自体の本質的な特徴を顕著に変化させない。さらなる考慮事項には、反応の単純性および生成される抗体結合体の安定性が含まれる。特定の実施形態では、ＡＢを最初に１つまたは複数の目的の薬剤と結合体化させ、次いでＭＭおよびＣＭを付着させてＡＡＣＪを生成する。他の実施形態では、ＡＢを最初にＭＭおよびＣＭに付着させ、次いで目的の薬剤をさらに結合体化させて、ＡＡＣＪを生成する。
【０１７８】
ｉ．酸化した炭水化物部分への付着
特定の実施形態では、薬剤をＡＢの炭水化物部分と結合体化させ得る。一部の炭水化物部分は免疫グロブリンのＦｃ領域上に配置されており、Ｃｌ結合が起こるために必要である。免疫グロブリンのＦｃ領域の炭水化物部分は、ＡＢが、Ｆｃ領域の少なくとも一部が含まれる抗体または抗体断片である実施形態において、本明細書中に記載のスキームで利用し得る。あるいは、炭水化物部分を含有する任意の免疫グロブリンのＦａｂまたはＦａｂ’断片を、本明細書中に記載の反応スキームで利用し得る。そのような免疫グロブリンの一例は、Ｐｕｔｎａｍら（１９７３年、Ｓｃｉｅｎｃｅ、１８２巻：２８７頁）によって配列決定されたヒトＩｇＭである。
【０１７９】
抗体、ＦａｂもしくはＦａｂ’断片またはＡＢを含有する他の断片の炭水化物側鎖を選択的に酸化してアルデヒドを生じ得る。過ヨウ素酸、パラ過ヨウ素酸、ナトリウムメタ過ヨウ素酸およびメタ過ヨウ素酸カリウムなどの様々な酸化剤を使用することができる。その後、生じるアルデヒドをアミン基（たとえば、第一級アミン、第二級アミン、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン、ヒドラジド、フェニルヒドラジン、セミカルバジドまたはチオセミカルバジドなどのアンモニア誘導体）と反応させて、シッフ塩基または還元シッフ塩

基（たとえば、イミン、エナミン、オキシム、ヒドラゾン、フェニルヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾンまたはその還元形態）を形成し得る。抗体を酸化させる化学的方法はＵＳ４，８６７，９７３号中に提供されており、この特許はその全体が参考として組み込まれている。これらの酸化剤を用いた抗体の酸化は、公知の方法によって実施することができる。酸化では、ＡＢは一般に水溶液の形態で使用し、その濃度は一般に１００ｍｇ／ｍｌ未満、好ましくは１～２０ｍｇ／ｍｌである。酸素酸またはその塩を酸化剤として使用する場合は、これは一般に水溶液の形態で使用し、その濃度は一般に０．００１～１０ｍＭ、場合によっては１．０～１０ｍＭである。酸素酸またはその塩の量はＡＢの種類に依存するが、一般に過剰で、たとえば酸化可能な炭水化物の量の２～１０倍までもを使用する。しかし、最適な量は日常的な実験によって決定することができる。

【０１８０】

ＡＢを酸素酸またはその塩で酸化するプロセスにおいて、任意選択の範囲には、約４～８のｐＨ、０°～３７℃の温度、および約１５分間～１２時間の反応期間が含まれる。酸素酸またはその塩を用いた酸化中、過酸化を防止するために反応を最小限の光中で実施することができる。

【０１８１】

あるいは、ＡＢ炭水化物部分は、他の化学基への付着またはそれとの反応を可能にするために、酵素的技法によって修飾し得る。そのような酵素の一例は、酸素の存在下でガラクトースを酸化してアルデヒドを形成するガラクトースオキシダーゼである。また、ＡＢの炭水化物部分の酸化は、酵素ガラクトースオキシダーゼを用いても行い得る（Ｃｏｏｐｅｒら、１９５９年、Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．、２３４巻：４４５～４４８頁）。抗体は水溶液中で使用し、その濃度は一般に０．５～２０ｍｇ／ｍｌである。酵素は一般に約５～１００単位／ｍｌの溶液で使用し、ｐＨの範囲は約５．５～約８．０である。酵素反応に対するｐＨ、基質濃度、緩衝液および緩衝液濃度の影響は、Ｃｏｏｐｅｒら、上記中に報告されている。

【０１８２】

本発明のＡＢ結合体、ＡＡ結合体、またはＡＢリンカーの中間体は、酸化したＡＢを、第一級アミン、第二級アミン、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、フェニルヒドラジン、セミカルバジドおよびチオセミカルバジド基からなる群より選択される、利用可能なアミン基を有する任意のリンカーまたは薬剤と反応させることによって生成し得る。例示的な方法では、約０．５～２０ｍｇ／ｍｌの濃度の酸化したＡＢまたはＡＢリンカーの溶液を薬剤またはリンカーと混合し（反応性アミン基対抗体アルデヒドのモル比の範囲は約１～約１０，０００である）、溶液を約１～１８時間インキュベーションする。適切な温度は０°～３７℃であり、ｐＨは約６～８であり得る。結合体が形成された後、これらをシアノボロ水素化ナトリウムまたは水素化ホウ素ナトリウムなどの適切な還元剤を用いて任意選択で安定化することができる。

【０１８３】

ｉｉ．スルフヒドリル基の付着

ＡＢが完全長抗体であるか、または重鎖の少なくとも一部が含まれる場合、遊離スルフヒドリル基は免疫グロブリン（ｉｍｍｕｎｏｇｌｕｂｕｌｉｎ）分子のジスルフィド結合から生じさせることができる。これは抗体の穏和な還元によって達成される。一般に還元に感受性のあるＩｇＧのジスルフィド結合は、２つの重鎖を連結しているものである。抗体の抗原結合領域の付近に配置されているジスルフィド結合は比較的影響を受けないままである。そのような還元は、補体を固定する能力の損失をもたらすが、抗体－抗原の結合能力を妨害しない（Ｋａｒｕｓｈら、１９７９年、Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１８巻：２２２６～２２３２頁）。その後、重鎖内領域中で生じた遊離スルフヒドリル基は、リンカーまたは薬剤の反応基と反応して、免疫グロブリンの抗原結合部位の妨害を低下させる共有結合を形成することができる。そのような反応基には、それだけには限定されないが、反応性ハロアルキル基（たとえばハロアセチル基が含まれる）、ｐ－安息香酸水銀基ならびにマイケル型付加反応が可能な基（たとえば、マレイミドおよびＭｉｔｒａおよびＬａｗｔｏ

ｎ、１９７９年、Ｊ．　Ａｍｅｒ．　Ｃｈｅｍ．　Ｓｏｃ．、１０１巻：３０９７～３１１０頁に記載の種類の基が含まれる）が含まれる。ハロアルキルは、臭素、ヨウ素または塩素で置換された任意のアルキル基であることができる。

【０１８４】

本明細書中に一般に記載した抗体および抗体断片の穏和な還元に適切な条件、方法および材料の詳細は、ＳｔａｎｗｏｒｔｈおよびＴｕｒｎｅｒ、１９７３年、Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、第１巻、第２版、Ｗｅｉｒ編、第１０章、Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｌｏｎｄｏｎ中に見つかる場合があり、その章は本明細書中に参考として組み込まれている。

【０１８５】

還元された免疫グロブリンまたは還元された抗体断片の遊離スルフヒドリル基への付着によって生成されたＡＢ－薬剤の結合体（またはＡＢ－リンカーの中間体）は、補体を活性化しない、または無視できる程度にしか活性化しない。したがって、これらの結合体は、薬剤の切断および放出が望ましくないｉｎ　ｖｉｖｏ系（たとえば、特異的な基質に作用する酵素）で使用し得る。また、そのような結合体は、補体に媒介されない放出が所望される場合にも使用し得る。そのような実施形態では、薬剤は、還元されたＡＢ上のスルフヒドリル基に、それだけには限定されないがトリプシン、ウロキナーゼ、プラスミン、組織プラスミノーゲン（ｐｌａｓｍｉｎｉｏｇｅｎ）活性化剤などを含めたタンパク質分解活性を有する酵素による切断に感受性のあるリンカーを介して連結し得る。

【０１８６】

薬剤をＡＢのスルフヒドリル基に付着させることで結合体の補体固定能力が低下するが、そのような付着方法を使用して、補体に媒介される放出系で使用するためのＡＡ結合体を作製し得る。そのような実施形態では、補体感受性基質リンカーと結合した薬剤を、還元されたＡＢまたはＡＡのスルフヒドリルと付着させ、補体を活性化することができる結合体化していないＡＡとの混合物中の標的に送達することができる。後者は補体を活性化させ、これにより薬剤が前者から切断される。

【０１８７】

本発明の一実施形態によれば、還元されたＡＢまたはＡＡのスルフヒドリル基への付着には、ヨードアルキル基をリンカーの一方の末端に付着させることによって、基質リンカーまたは薬剤を修飾する。リンカー上の修飾されていない部位は、薬剤と共有結合していても、していなくてもよい。たとえば、薬剤とエステルまたはアミド結合している基質リンカーは、ヨードアルキル基を付加することによって修飾し、したがってヨードアルキル誘導体を形成する。前述のように、リンカーは、活性化した補体、トリプシン、プラスミン、組織プラスミノーゲン活性化因子、ウロキナーゼまたはタンパク質分解活性を有する別の特定の酵素による切断に感受性または耐性を有するものであり得る。

【０１８８】

（ｂ）ＡＢと結合体化させるための薬剤

ＡＢは、ＡＢと反応した後にその本質的な特性を保持し、ＡＢが免疫特異性および免疫反応性を実質的に保持することを可能にしてＡＡが適切に機能することを可能にする、任意の薬剤に付着させ得る。薬剤には、その生物活性を実質的に保持する薬剤のすべての化学修飾体および誘導体が含まれることができる。

【０１８９】

ＡＢの酸化した炭水化物部分のアルデヒドを薬剤に付着させることが所望される場合は、薬剤は、第一級アミン、第二級アミン、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、フェニルヒドラジン、セミカルバジドおよびチオセミカルバジド基からなる群より選択されるアミン基を含有するべきである。薬剤がそのようなアミノ基をどれも含有しない場合は、薬剤を改変して、カップリングに利用可能な適切なアミン基を導入することができる。

【０１９０】

ＡＡ中で使用するＡＢに付着させる薬剤は、意図する用途の目的（すなわち、死滅、細胞増殖の予防、ホルモン療法または遺伝子治療）に従って選択する。そのような薬剤には、それだけには限定されないが、たとえば、製薬、毒素、毒素の断片、アルキル化剤、酵素、抗生物質、代謝拮抗剤、抗増殖剤、ホルモン、神経伝達物質、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、オリゴヌクレオチド、アンチセンスＲＮＡ、アプタマー、診断剤、放射線不透過色素、放射性同位元素、蛍光発生化合物、磁気標識、ナノ粒子、マーカー化合物、レクチン、細胞膜透過性を変更する化合物、光化学物質、小分子、リポソーム、ミセル、遺伝子治療ベクター、ウイルスベクターなどが含まれ得る。非限定的な表４に、本明細書中に記載の本発明で用い得る例示的な製薬の一部を記載するが、これはいかなる様式でも網羅的な記載ではない。最後に、薬剤の組合せまたは様々な薬剤クラスの組合せを使用し得る。

【０１９１】

本発明の一実施形態によれば、光増感剤および光熱分解剤を含めた光化合物を薬剤として使用し得る。効率的な光増感剤には、それだけには限定されないが、ポルフィリンおよび修飾ポルフィリン（たとえば、ヘマトポルフィリン、ヘマトポルフィリンジヒドラジド（ｄｉｈｙｄｄｒａｚｉｄｅ）、ジュウテロポルフィリンジヒドラジドおよびプロトポルフィリンジヒドラジド）、ローズベンガル、アクリジン、チアジン、キサンテン、アントラキノン、アジン、フラビンおよび金属非含有ポルフィリン、ポルフィリン様化合物、メチレンブルー、エオシン、ソラレン（ｐｓｏｒａｌｉｎ）などが含まれる。他の光増感剤には、それだけには限定されないが、テトラサイクリン（たとえばジメチルクロロ（ｄｉｍｅｔｈｙｌｃｈｌｏｒ）テトラサイクリン）、スルホンアミド（たとえばスルファニルアミド）、グリセオフルビン、フェノチアジン（たとえばクロルプロマジン）、チアジド、スルホニル尿素、および多くの他のものが含まれる。光化合物は、特定の波長の光を吸収するように設計または合成により調製し得る。光源によって作用部位で活性化されるアズールＡなどの光熱分解剤（ＡｎｄｅｒｓｏｎおよびＰａｒｒｉｓｈ、１９８３年、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２２０巻：５２４～５２７頁を参照）を薬剤として利用し得る。

【０１９２】

本発明の別の実施形態によれば、細胞毒性がある副産物の生成を伴って基質修飾を触媒する酵素を、薬剤として使用し得る。そのような酵素の例には、それだけには限定されないが、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、キサンテンオキシダーゼなどが含まれる。

【０１９３】

【表４】

表4:結合体化のための例示的な製薬

名称／クラス	連結	製造者(複数可)
	I. 抗菌剤	
アミノグリコシド		
ストレプトマイシン	エステル／アミド	
ネオマイシン	エステル／アミド	Dow, Lilly, Dome, Pfipharmics
カナマイシン	エステル／アミド	Bristol
アミカシン	エステル	Bristol
ゲンタマイシン	エステル／アミド	Upjohn, Wyeth, Schering
トブラマイシン	エステル／アミド	Lilly
ストレプトマイシンB	エステル／アミド	Squibb
スペクチノマイシン	エステル	Upjohn
アンピシリン	アミド	Squibb, Parke-Davis, Comer, Wyeth, Upjohn, Bristol, SKF
スルファニルアミド	アミド	Merrell-National
ポリミキシン	アミド	Burroughs-Wellcome, Dow, Parke-Davis
クロラムフェニコール	エステル	Parke-Davis
	II. 抗ウイルス剤	
アシクロビル		Burroughs-Wellcome
Vira A	エステル／アミド	Parke-Davis
シンメトレル	アミド	Endo
	III. 抗真菌剤	
ナイスタチン	エステル	Squibb, Primo, Lederle, Pfizer, Holland-Rantor
	IV. 抗腫瘍剤	
アドリアマイシン	エステル／アミド	Adria
セルビジン (Cerubidine)	エステル／アミド	Ives
ブレオマイシン	エステル／アミド	Bristol
Alkeran	アミド	Burroughs-Wellcome
Velban	エステル	Lilly
Oncovin	エステル	Lilly
フルオロウラシル	エステル	Adria, Roche, Herbert
メトトレキサート	アミド	Lederle
チオテパ	—	Lederle
ビサントレン	—	Lederle
ノバントロン	エステル	Lederle
チオグアニン	アミド	Burroughs-Wellcome
プロカルビジン(Procarabizine)	—	Hoffman La Roche
シタラビン	—	Upjohn
	V.放射性医薬品	
^{125}I		
^{131}I		
^{99m}Tc (テクネチウム)		
	VI. 重金属	
バリウム		
金		
白金		
	VII. 抗マイコプラズマ剤	
タイロシン (Tylosine)		
スペクチノマイシン		

（ｃ）薬剤を結合体化させるためのリンカー

本発明は、薬剤をＡＢに付着させるいくつかの方法、すなわち、（ａ）ＡＢの炭水化物部分への付着、または（ｂ）ＡＢのスルフヒドリル基への付着を利用する。本発明によれば、ＡＢは、１つはＡＢと反応し、１つは薬剤と反応する、少なくとも２つの反応基を有する中間体リンカーを介して、薬剤と共有結合させ得る。任意の適合性のある有機化合物が含まれ得るリンカーは、ＡＢ（または薬剤）との反応がＡＢの反応性および選択性に有

害な影響を与えないように選択することができる。さらに、リンカーと薬剤との付着は薬剤の活性を破壊しない。酸化した抗体または酸化した抗体断片と反応させるための適切なリンカーには、第一級アミン、第二級アミン、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、フェニルヒドラジン、セミカルバジドおよびチオセミカルバジド基からなる群より選択されるアミンを含有するものが含まれる。そのような反応性官能基は、リンカーの構造の一部として存在し得るか、またはそのような基を含有しないリンカーの適切な化学修飾によって導入し得る。

【０１９４】

本発明によれば、還元されたＡＢと付着させるための適切なリンカーには、還元された抗体または断片のスルフヒドリル基と反応することができる特定の反応基を有するものが含まれる。そのような反応基には、それだけには限定されないが、反応性ハロアルキル基（たとえばハロアセチル基が含まれる）、ｐ－安息香酸水銀基ならびにマイケル型付加反応が可能な基（たとえば、マレイミドおよびＭｉｔｒａおよびＬａｗｔｏｎ、１９７９年、Ｊ．　Ａｍｅｒ．　Ｃｈｅｍ．　Ｓｏｃ．、１０１巻：３０９７～３１１０頁に記載の種類の基が含まれる）が含まれる。

【０１９５】

薬剤は、リンカーをＡＢと付着させる前または後にリンカーに付着させ得る。特定の応用では、リンカーが会合した薬剤を有さない、ＡＢ－リンカーの中間体を最初に生成することが望ましい場合がある。特定の応用に応じて、その後、特定の薬剤をリンカーと共有結合させ得る。他の実施形態では、ＡＢを最初にＭＭ、ＣＭおよび会合したリンカーに付着させ、その後、結合体化させる目的でリンカーに付着させる。

【０１９６】

（ｉ）分枝状リンカー：

具体的な実施形態では、薬剤と付着するための複数の部位を有する分枝状リンカーを利用する。複数部位のリンカーでは、ＡＢとの単一の共有結合により、いくつかの部位で薬剤と結合することができるＡＢ－リンカーの中間体がもたらされる。部位は、アルデヒドもしくはスルフヒドリル基または薬剤が付着できる任意の化学部位であり得る。

【０１９７】

あるいは、より高い特異的活性（またはより高い薬剤対ＡＢの比）は、単一の部位リンカーをＡＢ上の複数の部位に付着させることによって達成できる。この複数の部位は、２つの方法のうちのどちらかによってＡＢ内に導入し得る。第１に、複数のアルデヒド基および／またはスルフヒドリル基を同じＡＢ中に作製し得る。第２に、ＡＢのアルデヒドまたはスルフヒドリルに、続いてリンカーに付着させるための複数の官能部位を有する「分枝状リンカー」を付着させ得る。分枝状リンカーまたは複数部位のリンカーの官能部位は、アルデヒドもしくはスルフヒドリル基、またはリンカーが付着し得る任意の化学部位であり得る。これら２つの手法を組み合わせることによって、すなわち、複数部位のリンカーをＡＢ上のいくつかの部位に付着させることによって、さらに高い特異的活性が得られ得る。

【０１９８】

（ｉｉ）切断可能なリンカー：

それだけには限定されないが、ウロキナーゼ、組織プラスミノーゲン活性化因子、トリプシン、プラスミン、またはタンパク質分解活性を有する別の酵素などの、補体系の酵素による切断に感受性のあるペプチドリンカーを、本発明の一実施形態で使用し得る。本発明の一方法によれば、補体による切断に感受性のあるリンカーを介して薬剤を付着させる。抗体は補体を活性化することができるクラスから選択される。したがって、抗体－薬剤の結合体は補体カスケードを活性化し、標的部位で薬剤を放出する。本発明の別の方法によれば、ウロキナーゼ、組織プラスミノーゲン（ｐｌａｓｉｍｏｇｅｎ）活性化剤、プラスミン、またはトリプシンなどのタンパク質分解活性を有する酵素による切断に感受性のあるリンカーを介して薬剤を付着させる。切断可能なリンカー配列の非限定的な例を表５に提供する。

【０１９９】
【表５】
表5:結合体化のための例示的なリンカー配列

切断可能な配列の型	アミノ酸配列
プラスミンで切断可能な配列	
プロウロキナーゼ	PRFKIIGG
	PRFRIIGG
TGFβ	SSRHRRALD
プラスミノーゲン	RKSSIIIRMRDVVL
スタフィロキナーゼ	SSSFDKGKYKKGDDA
	SSSFDKGKYKRGDDA
第Xa因子で切断可能な配列	IEGR
	IDGR
	GGSIDGR
MMPで切断可能な配列	
ゼラチナーゼA	PLGLWA
コラゲナーゼで切断可能な配列	
仔ウシ皮膚コラーゲン(α1(I)鎖)	GPQGIAGQ
仔ウシ皮膚コラーゲン(α2(I)鎖)	GPQGLLGA
ウシ軟骨コラーゲン(α1(II)鎖)	GIAGQ
ヒト肝臓コラーゲン(α1(III)鎖)	GPLGIAGI
ヒト α_2M	GPEGLRVG
ヒト PZP	YGAGLGVV
	AGLGVVER
	AGLGISST
ラット α_1M	EPQALAMS
	QALAMSAI
ラット α_2M	AAYHLVSQ
	MDAFLESS
ラット α_1I_3(2J)	ESLPVVAV
ラット α_1I_3(27J)	SAPAVESE
ヒト線維芽細胞コラゲナーゼ	DVAQFVLT
(自己分解切断)	VAQFVLTE
	AQFVLTEG
	PVQPIGPQ

さらに薬剤は、ジスルフィド結合（たとえばシステイン分子上のジスルフィド結合）を介してＡＢと付着させ得る。多くの腫瘍が高いレベルのグルタチオン（還元剤）を天然に放出するため、これによりジスルフィド結合が還元され、続いて送達部位で薬剤が放出することができる。特定の具体的な実施形態では、ＣＭを改変させる還元剤は結合体化したＡＡのリンカーも改変させる。
【０２００】
（ｉｉｉ）スペーサーおよび切断可能な要素：
さらに別の実施形態では、薬剤とＡＡのＡＢとの間の間隔を最適化するような様式でリンカーを構築する必要があり得る。これは、一般構造：
Ｗ－－（ＣＨ２）ｎ－－Ｑ
［式中、Ｗは、－－ＮＨ－－ＣＨ２－－または－－ＣＨ２－－のどちらかであり、Ｑは、アミノ酸、ペプチドであり、ｎは、０～２０の整数である］のリンカーを使用することによって達成し得る。
【０２０１】

さらに他の実施形態では、リンカーはスペーサー要素および切断可能な要素を含み得る。スペーサー要素は、切断可能な要素が切断を司る酵素により接近可能性となるように、切断可能な要素をＡＢのコアから離して配置する役割を果たす。上述の分枝状リンカーのうちの特定のものがスペーサー要素として役割を果たし得る。

【０２０２】

本記述全体にわたって、リンカーと薬剤（またはスペーサー要素と切断可能な要素、もしくは切断可能な要素と薬剤）との付着は、特定の様式の付着または反応である必要がないことを理解されたい。適切な安定性および生物学的適合性の生成物を提供する任意の反応が許容される。

【０２０３】

（ｉｖ）血清補体およびリンカーの選択：

本発明の一方法によれば、薬剤の放出が所望される場合は、補体を活性化することができるクラスの抗体であるＡＢを使用する。生じる結合体は、抗原と結合する能力および補体カスケードを活性化する能力をどちらも保持している。したがって、本発明の本実施形態によれば、薬剤が切断可能なリンカーまたは切断可能な要素の一方の末端に結合しており、リンカー基の他方の末端はＡＢ上の特異的部位に付着している。たとえば、薬剤がヒドロキシ基またはアミノ基を有する場合、これは、それぞれエステルまたはアミド結合を介してペプチド、アミノ酸または他の適切に選択されたリンカーのカルボキシ末端に付着させ得る。たとえば、そのような薬剤は、カルボジイミド（ｃａｒｂｏｄｉｍｉｄｅ）反応を介してリンカーペプチドに付着させ得る。薬剤がリンカーとの付着を妨害する官能基を含有する場合、これらの妨害官能基は、付着前に遮断し、生成物の結合体または中間体が作製された後に脱遮断することができる。その後、リンカーの反対またはアミノ末端を、直接またはさらなる修飾後に、補体を活性化することができるＡＢとの結合に使用する。

【０２０４】

リンカー（またはリンカーのスペーサー要素）は任意の所望の長さであってよく、その一方の末端はＡＡのＡＢ上の特異的部位と共有結合させることができる。リンカーまたはスペーサー要素の他方の末端はアミノ酸またはペプチドリンカーに付着させ得る。

【０２０５】

したがって、これらの結合体が補体の存在下で抗原と結合する際、薬剤をリンカーに付着させているアミドまたはエステル結合が切断され、薬剤のその活性型での放出がもたらされる。これらの結合体は、被験体に投与した際、標的部位での薬剤の送達および放出を達成し、それだけには限定されないが表４に表示するように、製薬、抗生物質、代謝拮抗剤、抗増殖剤などのｉｎ　ｖｉｖｏ送達に特に有効である。

【０２０６】

（ｖ）補体の活性化なしに放出させるためのリンカー：

標的化送達のさらに別の応用では、補体カスケードの活性化は最終的に標的細胞を溶解させるため、補体活性化なしに薬剤を放出させることが所望される。したがって、この手法は、標的細胞を死滅させずに薬剤の送達および放出を達成すべき場合に有用である。このことは、ホルモン、酵素、コルチコステロイド、神経伝達物質、遺伝子または酵素などの細胞媒介物質を標的細胞に送達することが所望される場合の目的である。これらの結合体は、薬剤を、補体を活性化することができないＡＢに、血清プロテアーゼによる切断に対して穏やかに感受性のあるリンカーを介して付着させることによって、調製し得る。この結合体を個体に投与した場合、抗原－抗体の複合体は急速に形成される一方で、薬剤の切断はゆっくりと起こり、したがって標的部位での化合物の放出がもたらされる。

【０２０７】

（ｖｉ）生化学的架橋剤：

他の実施形態では、ＡＡは、特定の生化学的架橋剤を用いて１つまたは複数の治療剤と結合体化させ得る。架橋試薬は、２つの異なる分子の官能基を一緒に結びつける分子橋を形成する。２つの異なるタンパク質を段階的な様式で連結させるためには、望まないホモ

ポリマーの形成を排除するヘテロ二官能性架橋剤を使用することができる。例示的なヘテロ二官能性架橋剤を表６に参照する。

【０２０８】

【表６】

表6:例示的なヘテロ二官能性架橋剤

ヘテロ二官能性架橋剤			
リンカー	反応性の対象	利点および適用	架橋後のスペーサーアームの長さ
SMPT	第一級アミン スルフヒドリル	より高い安定性	11.2 A
SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	チオール化 切断可能な架橋	6.8 A
LC-SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	伸長されたスペーサーアーム	15.6 A
スルホ-LC-SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	伸長させるスペーサーアーム 水溶性	15.6 A
SMCC	第一級アミン スルフヒドリル	安定したマレイミド反応基 酵素－抗体の結合体化 ハプテン－担体タンパク質の結合体化	11.6 A
スルホ-SMCC	第一級アミン スルフヒドリル	安定したマレイミド反応基 水溶性 酵素－抗体の結合体化	11.6 A
MBS	第一級アミン スルフヒドリル	酵素－抗体の結合体化 ハプテン－担体タンパク質の結合体化	9.9 A
スルホ-MBS	第一級アミン スルフヒドリル	水溶性	9.9 A
SIAB	第一級アミン スルフヒドリル	酵素－抗体の結合体化	10.6 A
スルホ-SIAB	第一級アミン スルフヒドリル	水溶性	10.6 A
SMPB	第一級アミン スルフヒドリル	伸長されたスペーサーアーム 酵素－抗体の結合体化	14.5 A
スルホ-SMPB	第一級アミン スルフヒドリル	伸長されたスペーサーアーム 水溶性	14.5 A
EDE/スルホ-NHS	第一級アミン カルボキシル基	ハプテン－担体タンパク質の結合体化	0
ABH	炭水化物 非選択的	糖基と反応する	11.9 A

（ｖｉｉ）切断不可能なリンカーまたは直接付着：

本発明のさらに他の実施形態では、結合体は、薬剤が標的に送達されるが放出されないように設計し得る。これは、薬剤をＡＢに、直接または切断不可能なリンカーを介して付着させることによって達成し得る。

【０２０９】

これらの切断不可能なリンカーには、アミノ酸、ペプチド、Ｄ－アミノ酸、または、続いて本明細書中に記載の方法によってＡＢへの付着に利用することができる官能基が含まれるように修飾し得る他の有機化合物が含まれ得る。そのような有機リンカーの一般式は、

Ｗ－－（ＣＨ２）ｎ－－Ｑ

であることができ、式中、Ｗは、－－ＮＨ－－ＣＨ２－－または－－ＣＨ２－－のどちらかであり、Ｑは、アミノ酸、ペプチドであり、ｎは、０～２０の整数である。

【０２１０】

（ｖｉｉｉ）切断不可能な結合体：

あるいは、化合物は、補体を活性化しないＡＢに付着させ得る。補体を活性化することができないＡＢを用いる場合、この付着は、活性化させた補体による切断に感受性のあるリンカーを用いて、または活性化させた補体による切断に感受性のないリンカーを用いて達成し得る。

【０２１１】

（ｄ）活性化可能な抗体結合体の使用

本発明のＡＡ－薬剤の結合体（ＡＡＣＪ）は、治療学、診断学、基質修飾などにおいて有用である。

【０２１２】

本発明のＡＡＣＪは、それだけには限定されないが、癌、腺腫、および過形成を含めた新生物、自己免疫疾患、移植片対宿主病（たとえば骨髄移植後）、免疫抑制性疾患、たとえば腎臓または骨髄移植後を含めた、特定の免疫学的障害の処置などの、様々な治療的なｉｎ　ｖｉｖｏの応用において有用である。たとえば骨髄移植に関与するそのような細胞障害の処置には、所望しない細胞、たとえば悪性細胞または成熟Ｔリンパ球を取り除くこと（死滅させることによって）が含まれ得る。

【０２１３】

治療的応用は、一般に、有効量の本発明の抗体－薬剤の結合体を投与することによる、幅広く上述したものを含めた様々な細胞障害の処置を中心とする。抗体の特性は、特定の抗原に対して免疫特異的かつ免疫反応性があることで、それを、薬剤を特定の細胞、組織、器官またはその特定の抗原を有する任意の他の部位に送達するために理想的に適しているようにする。

【０２１４】

本発明のこの態様によれば、ＡＡＣＪは、結合体を標的部位に送達するように機能する。

【０２１５】

ＡＡＣＪを作製するために使用されるＡＢ、リンカー、および薬剤の選択は、送達の目的に依存する。特定の標的部位での薬剤の送達および放出または活性化は、腫瘍細胞、癌細胞、真菌、細菌、寄生生物、またはウイルスの選択的な死滅または増殖の阻害をもたらし得る。選択した部位へのホルモン、酵素、または神経伝達物質の標的化送達も達成し得る。最終的には、本発明の方法は、ＤＮＡまたは特定の遺伝子を、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏで、その特定の遺伝子を欠く標的細胞へと送達し得る、遺伝子治療プログラムにおいて応用を有し得る。さらに、結合体は、ｍｙｃ、ｒａｓなどの癌遺伝子の活性化を低下または予防するために使用し得る。

【０２１６】

Ｉｎ　ｖｉｖｏ投与は、ヒト血清アルブミンなどの別のタンパク質を含むまたは含まない、血清または生理食塩水を含めた任意の適切なアジュバント中のＡＡＣＪの薬剤の使用を含み得る。結合体の用量は当業者によって容易に決定されてよく、細胞障害および使用する薬剤の性質に応じて異なり得る。投与経路は非経口であってよく、静脈内投与が一般に好ましい。

【０２１７】

（ｉ）基質修飾

本発明の代替実施形態では、薬剤による基質の活性化を用いて、一重項酸素またはペルオキシドの形成を媒介し、細胞の死滅を誘導するために使用し得る。この特定の実施形態では、薬剤は酵素である。たとえば、ガラクトースオキシダーゼは、ガラクトースおよび一部のガラクトース誘導体をＣ６位置で酸化する。酸化反応の過程で、分子酸素は、隣接する細胞に対して毒性がある過酸化水素へと変換される。また、フラボ酵素である酵素グルコースオキシダーゼも本発明の実施形態で使用し得る。この酵素はβ－Ｄ－グルコースに対する特異性が高く、ペルオキシドの形成が原因で抗生物質として作用することができる。この酵素は、直接または切断不可能なリンカーを介してＡＢに付着させ得る。被験体に有効な用量のこのＡＡＣＪを与え、その後、基質で灌流する。細胞の死滅は上述の方法

によるペルオキシドの形成によって媒介される。ペルオキシドの毒性効果は、好ましくはヒト起源である第２の酵素を投与することによって、そのペルオキシドをより毒性がある次亜塩素酸へと変換することによって増幅させ得る。適切な酵素の例には、それだけには限定されないが、ミエロペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼおよびクロロペルオキシダーゼが含まれる。

ＡＡを同定および／または最適化するためのディスプレイ方法および組成物

ＡＡを同定および最適化する方法、ならびにそのような方法において有用な組成物を以下に記載する。

【０２１８】

（ａ）複製可能な生物学的実体上に表示されるＡＡまたは候補ＡＡのライブラリ

一般に、切替可能な表現型についてＡＡを同定するおよび／またはＡＡを最適化するためのスクリーニング方法は、その表面上に複数の異なる候補ＡＡを表示する複製可能な生物学的実体のライブラリの生成を含む場合がある。その後、これらのライブラリをスクリーニング方法に供して、ＡＡの１つまたは複数の所望の特徴を有する候補ＡＡを同定することができる。

【０２１９】

候補ＡＡライブラリは、ＭＭ、リンカー（ＭＭの一部であり得る）、ＣＭ（ＭＭの一部であり得る）、およびＡＢのうちの１つまたは複数が異なる候補ＡＡを含有することができる。一実施形態では、ライブラリ中のＡＡは、ＭＭおよび／またはリンカーが可変であり、ＡＢおよびＣＭは事前に選択される。ＡＡ中にジスルフィド結合を提供するために、ＡＡ中にシステイン残基の対を含める場合は、ＡＡ中のシステインの相対的な位置を変動させることができる。

【０２２０】

スクリーニングのためのライブラリは、一般に、その表面上に様々な候補ＡＡを表示する複製可能な生物学的実体のライブラリとして提供する。たとえば、候補ＡＡのライブラリには、複製可能な生物学的実体の集団の表面上に表示された複数の候補ＡＡが含まれることができ、前記複数の候補ＡＡのそれぞれのメンバーは、（ａ）抗体またはその断片（ＡＢ）、（ｂ）切断可能な部分（ＣＭ）、（ｃ）候補マスキング部分（候補ＭＭ）を含み、ＡＢ、ＣＭおよび候補ＭＭは、切断されていない状態でＡＢと標的との結合を阻害し、切断された状態でＡＢと標的との結合を可能にする、候補ＭＭの能力が決定できるように配置されている。適切な複製可能な生物学的実体には、細胞（たとえば、細菌（たとえばＥ．ｃｏｌｉ）、酵母（たとえばＳ．ｃｅｒｅｖｅｓｉａｅ）、原虫細胞、哺乳動物細胞）、バクテリオファージ、およびウイルスが含まれる。抗体ディスプレイ技術は当分野で周知である。

【０２２１】

（ｂ）複製可能な生物学的実体の表面上での候補ＡＡの表示

複製可能な生物学的実体を用いた様々なディスプレイ技術が当分野で公知である。これらの方法および実体には、それだけには限定されないが、ｍＲＮＡおよびリボソームディスプレイ、真核ウイルスディスプレイ、ならびに細菌、酵母、および哺乳動物細胞表面ディスプレイなどのディスプレイ方法が含まれる。Ｗｉｌｓｏｎ，　Ｄ．　Ｓ．ら、２００１年、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ、９８巻（７号）：３７５０～３７５５頁、Ｍｕｌｌｅｒ，　Ｏ．　Ｊ．ら（２００３年）　Ｎａｔ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、３巻：３１２頁、Ｂｕｐｐ，　Ｋ．およびＭ．　Ｊ．　Ｒｏｔｈ（２００２年）Ｍｏｌ．　Ｔｈｅｒ．、５巻（３号）：３２９～３５１３頁、Ｇｅｏｒｇｉｏｕ，　Ｇ．ら（１９９７年）Ｎａｔ．　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、１５巻（１号）：２９～３４１４頁、ならびにＢｏｄｅｒ，　Ｅ．　Ｔ．およびＫ．　Ｄ．　Ｗｉｔｔｒｕｐ（１９９７年）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ．、１５巻（６号）：５５３～５５７頁を参照されたい。表面ディスプレイ方法は、ライブラリの分析およびスクリーニングのための蛍光活性化細胞分取（ＦＡＣＳ）の応用を可能にするため、魅力的である。Ｄａｕｇｈｅｒｔｙ，　Ｐ．　Ｓ．ら（２０００年）Ｊ．　Ｉｍｍｕｕｎｏｌ．　Ｍｅｔｈｏｄｓ、２４３巻（１～２号）：２１１～２７１６頁

、Ｇｅｏｒｇｉｏｕ，Ｇ．（２０００年）Ａｄｖ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｈｅｍ．、５５巻：２９３～３１５頁、Ｄａｕｇｈｅｒｔｙ，Ｐ．Ｓ．ら（２０００年）ＰＮＡＳ ＵＳＡ、９７巻（５号）：２０２９～３４１８頁、Ｏｌｓｅｎ，Ｍ．Ｊ．ら（２００３年）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２３０巻：３２９～３４２頁、Ｂｏｄｅｒ，Ｅ．Ｔ．ら（２０００年）ＰＮＡＳ ＵＳＡ、９７巻（２０号）：１０７０１～１０７０５頁、Ｍａｔｔｈｅａｋｉｓ，Ｌ．Ｃら（１９９４年）ＰＮＡＳ ＵＳＡ、９１巻（１９号）：９０２２～９０２６頁、ならびにＳｈｕｓｔａ，Ｅ．Ｖ．ら（１９９９年）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．、１０巻（２号）：１１７～１２２頁を参照されたい。目的の生物学的標的と結合することができるペプチドを同定するために使用し得るさらなるディスプレイ方法は、その開示が本明細書中に参考として組み込まれている米国特許第７，２５６，０３８号に記載されている。

【０２２２】

ディスプレイ足場とは、宿主細胞中で発現された場合に、宿主細胞の細胞外から接近可能性な表面上に表示され、作動可能に連結した異種ポリペプチドの提示を提供するポリペプチドをいう。たとえば、ディスプレイ足場は本明細書中に開示する方法において使用が見つかり、候補ＡＡのスクリーニングを容易にする。ディスプレイ足場は、たとえば、ディスプレイ足場からの融合タンパク質の切断および候補ＡＡの放出を促進するプロテアーゼの作用によって、目的の異種ポリペプチドがディスプレイ足場から容易に放出することができるように、提供することができる。

【０２２３】

ファージディスプレイは、コートタンパク質、たとえば、バクテリオファージ粒子のｐＩＩＩ、ｐＩＩＶとの末端融合体としてのペプチドの局在化を含む。Ｓｃｏｔｔ，Ｊ．Ｋ．およびＧ．Ｐ．Ｓｍｉｔｈ（１９９０年）Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４９巻（４９６７号）：３８６～３９０頁、ならびにＬｏｗｍａｎ，Ｈ．Ｂ．ら（１９９１年）Ｂｉｏｃｈｅｍ．、３０巻（４５号）：１０８３２～１０８３８頁を参照されたい。一般に、特定の結合機能を有するポリペプチドは、標的と共にインキュベートし、結合していないファージを洗い流し、結合したファージを溶出させ、その後、細菌の新鮮な培養物を感染させることによってファージ集団を再度増幅させることによって単離する。

【０２２４】

例示的なファージディスプレイおよび細胞ディスプレイの組成物および方法は、米国特許第５，２２３，４０９号、第５，４０３，４８４号、第７，１１８，１５９号、第６，９７９，５３８号、第７，２０８，２９３号、第５５７１６９８号、および第５，８３７，５００号に記載されている。

【０２２５】

さらなる例示的なディスプレイ足場および方法には、２００７年３月２２日公開の米国特許出願公開第２００７／００６５１５８号に記載のものが含まれる。

【０２２６】

任意選択で、ディスプレイ足場には、宿主細胞の表面からのＡＡまたは候補ＡＡの切断を可能にするために、プロテアーゼ切断部位（ＣＭのプロテアーゼ切断部位とは異なる）が含まれることができる。

【０２２７】

複製可能な生物学的実体が細菌細胞である一実施形態では、適切なディスプレイ足場には、Ｒｉｃｅら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉ（２００６年）１５巻：８２５～８３６頁によって記載されている円順列Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ外膜タンパク質ＯｍｐＸ（ＣＰＸ）が含まれる。２００７年８月１４日に発行の米国特許第７，２５６，０３８号も参照されたい。

【０２２８】

（ｃ）ＡＡをコードしている構築体

本開示は、ＡＡおよび／または候補ＡＡをコードしている配列が含まれる核酸構築体をさらに提供する。適切な核酸構築体には、それだけには限定されないが、原核または真核

細胞中で発現することができる構築体が含まれる。発現構築体は、一般に、それらを使用する宿主細胞と適合性があるように選択する。

【０２２９】

たとえば、ＡＡまたは候補ＡＡをコードしているＤＮＡの複製および／または宿主細胞中での発現をもたらすプラスミドを含めた、非ウイルスおよび／またはウイルス構築体ベクターを調製して使用し得る。ベクターの選択は、繁殖を所望する細胞の種類および繁殖の目的に依存する。特定の構築体は、大量の所望のＤＮＡ配列を増幅および作製するために有用である。他のベクターは、培養中の細胞中での発現に適している。適切なベクターの選択は、十分に当分野の技術範囲内にある。多くのそのようなベクターが販売されている。構築体を作製する方法は、当分野で周知の方法を用いて達成することができる。

【０２３０】

宿主細胞中での発現をもたらすために、ＡＡまたは候補ＡＡをコードしているポリヌクレオチドは、必要に応じて、所望の発現特性を促進するための調節配列と作動可能に連結させる。これらの調節配列には、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、オペレーター、リプレッサー、サイレンサー、誘導因子、および３’または５’ＵＴＲが含まれることができる。また、発現構築体は、一般に、必要または所望に応じて転写および翻訳開始領域も提供し、これは誘導性または構成的であってよく、コード領域は、転写開始領域、ならびに転写および翻訳終結領域の転写制御下で、作動可能に連結している。これらの制御領域は、核酸が得られた種にネイティブであってもよく、または外因性の供給源に由来してもよい。

【０２３１】

プロモーターは構成的または調整可能のどちらかであり得る。一部の状況では、誘導性プロモーター、たとえば温度感受性プロモーターなどの条件的に活性となるプロモーターを使用することが望ましい場合がある。誘導性要素とは、プロモーターと一緒に作用し、リプレッサー（たとえばＥ．ｃｏｌｉ中のｌａｃＯ／ＬＡＣ　Ｉｑリプレッサー系）または誘導因子（たとえば酵母中のｇａｌ１／ＧＡＬ４誘導因子系）のどちらかと結合し得るＤＮＡ配列要素である。そのような場合、転写は事実上停止され、プロモーターがリプレッション解除または誘導された時点で転写は作動する。

【０２３２】

また、発現構築体を含めた構築体には、たとえば目的の構築体を含有する宿主細胞の成長を促進するために宿主中で作動的な選択マーカーも含まれることができる。そのような選択マーカー遺伝子は、真核細胞培養物用のジヒドロ葉酸レダクターゼまたはネオマイシン耐性などの、形質転換させた宿主細胞を選択するための表現型形質を提供することができる。

【０２３３】

発現構築体には、ＡＡおよび／または候補ＡＡをコードしている核酸配列の挿入および除去を提供するための、好都合な制限部位が含まれることができる。あるいは、またはそれに加えて、発現構築体には、目的のＡＡコード配列の核酸増幅（たとえばＰＣＲに基づいた増幅）を促進するためのプライマーの基礎として役割を果たすことができるフランキング配列が含まれることができる。

【０２３４】

上述の発現系を、発現の目的に応じて、慣用の様式に従って原核生物または真核生物で用い得る。一部の実施形態では、Ｅ．ｃｏｌｉ、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、バキュロウイルスベクターと組み合わせた昆虫細胞などの単細胞生物、または、たとえばＣＯＳ７細胞、ＨＥＫ２９３、ＣＨＯ、Ｘｅｎｏｐｕｓ卵母細胞などの脊椎動物等の高等生物の細胞を、発現宿主細胞として使用し得る。これらの宿主細胞のクラスおよび種類のそれぞれの発現系が当分野で公知である。

【０２３５】

（ｄ）複製可能な生物学的実体上に表示されるＡＡ／候補ＡＡのライブラリを作製する方法

本開示は、本明細書中に記載のＡＡおよび／または候補ＡＡのライブラリを作製する方法を企図する。

【０２３６】

一実施形態では、ＡＡライブラリおよび／または候補ＡＡライブラリを作製する方法は、（ａ）複数のＡＡおよび／または候補ＡＡをコードしている１組の組換えＤＮＡベクターを本明細書中に記載のように構築するステップと、（ｂ）宿主細胞をステップ（ａ）のベクターで形質転換させるステップと、（ｃ）ステップ（ｂ）で形質転換させた宿主細胞を、融合ポリペプチドの発現および表示に適した条件下で培養するステップとを含む。

【０２３７】

（ｅ）候補ＡＡをコードしている核酸配列の生成

スクリーニング方法で使用するための候補ＡＡの生成は、当分野で公知の方法を用いて達成することができる。ポリペプチドディスプレイ、単鎖抗体ディスプレイ、抗体ディスプレイおよび抗体断片ディスプレイは当分野で周知の方法である。一般に、候補ＡＡライブラリ中で変動させるＡＡの要素、たとえばＭＭを、ランダム化について選択する。ライブラリ中の候補ＡＡは、たとえばヌクレオチド／残基の頻度一般または要素内のアミノ酸（複数可）の位置が、完全にランダム化されているまたはそのランダム化が偏っていることができる。

【０２３８】

ＡＡをスクリーニングする方法

本開示は、酵素的に活性化されたＡＡ、還元剤に感受性のあるＡＡ、または酵素的活性化もしくは還元剤に基づいた活性化のどちらかもしくは両方によって活性化可能なＡＡであることができる、ＡＡを同定する方法を提供する。一般に、この方法には、多数性（ｐｌｕｒａｌｉｔｙ）の候補ＡＡを、ＡＡのＡＢと結合することができる標的およびＡＡのＣＭを切断することができるプロテアーゼと接触させることと、プロテアーゼに曝露された場合に標的と結合する前記多数性の第１のメンバー集団を選択することと、プロテアーゼの非存在下で前記第１の集団を標的と接触させることと、前記第１の集団メンバーからプロテアーゼの非存在下で標的と結合するものを枯渇させることによって、前記第１の集団から第２のメンバー集団を選択することとが含まれ、前記方法は、プロテアーゼの存在下における標的結合と比較して減少した、プロテアーゼの非存在下における標的との結合を示す候補ＡＡの選択を提供する。

【０２３９】

一般に、所望の切替可能な表現型を有する候補ＡＡをスクリーニングする方法は、陽性スクリーニングステップ（プロテアーゼに曝露した後に標的と結合するメンバーを同定するため）および陰性スクリーニングステップ（プロテアーゼに曝露されていない場合に標的と結合しないメンバーを同定するため）によって達成する。陰性スクリーニングステップは、たとえば、集団メンバーからプロテアーゼの非存在下で標的と結合するものを枯渇させることによって達成できる。本明細書中に記載のライブラリスクリーニング方法は、最初に、酵素処理の非存在下で標識した標的と結合しない（すなわち、切断されていない場合に標識した標的と結合しない）候補を選択する陰性スクリーニングを実施し、その後、陽性スクリーニング（すなわち、酵素で処理し、切断された状態で標識した標的と結合するメンバーを選択する）を実施することによって開始できることに注意されたい。しかし、利便上、陽性選択を第１のステップとして、スクリーニング方法を以下に記載する。

【０２４０】

陽性および陰性スクリーニングステップは、好都合にフローサイトメトリーを用いて実施して、検出可能に標識した標的の結合に基づいて候補ＡＡを分別することができる。スクリーニング手順の１回のラウンドまたはサイクルは、陽性選択ステップおよび陰性選択ステップをどちらも含む。複数回のサイクル（完全および部分サイクル、たとえば、１．５サイクル、２．５サイクルなどが含まれる）が行われるように、１つのライブラリで方法を繰り返し得る。このようにして、ＡＡの切替特徴を示す複数の候補ＡＡのメンバーを生じる集団中で濃縮し得る。

【０２４１】
一般に、スクリーニング方法は、最初に、複数の候補ＡＡをコードしている核酸ライブラリをディスプレイ足場中で作製し、立ち代ってそれを複製可能な生物学的実体の表面上で発現させるためのディスプレイ足場内に導入することによって実施する。本明細書中で使用する複数の候補ＡＡとは、候補ＡＡをコードしているアミノ酸配列を有する複数のポリペプチドをいい、多数性のメンバーは、ＡＡの構成要素のうちの少なくとも１つのアミノ酸配列に関して可変である、たとえば、多数性は、ＭＭ、ＣＭまたはＡＢ、通常はＭＭのアミノ酸配列に関して可変である。
【０２４２】
たとえば、候補ＡＡのＡＢおよびＣＭを固定して保ち、ライブラリの候補ＡＡはＭＭのアミノ酸配列に関して可変である。別の例では、ライブラリは、候補ＡＡ中の別のシステインとのジスルフィド結合形成が好まれるようにシステイン残基を配置するように設計されたＭＭを有する（他の残基は、それ以外は完全に、または少なくとも部分的にランダム化されたアミノ酸配列を有するＭＭを提供するように選択される）、候補ＡＡが含まれるように作製できる。別の例では、ライブラリは、ＭＭに完全にランダム化されたアミノ酸配列が含まれる候補ＡＡが含まれるように作製することができる。そのようなライブラリは、これらの基準のうちの１つまたは複数によって設計された候補ＡＡを含有することができる。前記多数性のメンバーを本明細書中に記載の方法にしたがってスクリーニングすることによって、所望の切替可能な表現型を提供する候補ＭＭを有するメンバーを同定することができる。
【０２４３】
本方法の一実施形態では、複数の候補ＡＡのそれぞれのメンバーは、複製可能な生物学的実体（ここでは細菌細胞によって例示）の表面上に表示させる。多数性のメンバーを、候補ＡＡのＣＭを切断することができるプロテアーゼに曝露させ、候補ＡＡのＡＢの結合パートナーである標的と接触させる。プロテアーゼに曝露させた後に標的と結合するＡＢを含むメンバーを表示する細菌細胞を、標的結合の検出（たとえば標的－ＡＢの複合体の検出）によって同定および／または分離する。その後、プロテアーゼ曝露（ＣＭの切断をもたらすことができる）の後に標的と結合するＡＢを含むメンバーを、標的と、プロテアーゼの非存在下で接触させる。切断の非存在下において減少したまたは検出不可能な標的との結合を示すＡＢを含むメンバーを表示する細菌細胞を、結合した標的を欠く細胞の検出によって同定および／または分離する。このようにして、切断された状態で標的と結合し、切断されていない状態で減少したまたは検出不可能な標的結合を示す、複数の候補ＡＡのメンバーを同定および／または選択する。
【０２４４】
上述のように、候補ＡＡライブラリは、ＡＡ構築体の１つまたは複数の側面についてスクリーニングするために、たとえば、ＭＭ、ＣＭ、およびＡＢのうちの１つまたは複数の切替可能な表現型の最適化を提供するために、構築することができる。最適化を促進するために、ＡＡの１つまたは複数の他の要素を変動させることができる。たとえば、切断剤（たとえば酵素）の非存在下でシステインもしくはＡＡの異なるコンホメーション特徴を提供することができる他の残基の数もしくは位置を変動させることを含めた、ＭＭを変動させること、１つもしくは複数の所望の特徴（たとえば酵素切断の特異性など）について最適化された基質を同定するためにＣＭを変動させること、および／または切替可能な標的結合の最適化を提供するためにＡＢを変動させることである。
【０２４５】
一般に、候補ＡＡライブラリの要素は目的の標的タンパク質に従って選択し、ＡＡは活性化されて、ＣＭを切断する切断剤（たとえば酵素）の存在下において増強された標的結合を提供する。たとえば、ＣＭおよびＡＢをライブラリメンバー間で固定して保つ場合、ＣＭは、目的の標的と共に共局在化している切断剤（たとえば酵素）によって切断可能であるように選択し、目的の標的はＡＢの結合パートナーである。このようにして、ＡＡは、適切な生体条件下、したがって適切な生物学的位置で選択的に活性化されるように選択

することができる。たとえば、抗血管形成化合物として使用し、ＶＥＧＦ結合の切替可能な表現型を示すＡＡを開発することが所望される場合、候補ＡＡのＣＭは、ＶＥＧＦと共に共局在化している酵素の基質および／または還元剤であるように選択される（たとえば、マトリックス－メタロプロテアーゼによって切断可能なＣＭ）。別の例として、抗血管形成化合物をして使用し、Ｎｏｔｃｈ受容体結合、Ｊａｇｇｅｄリガンド結合、またはＥＧＦＲ結合の切替可能な表現型を示すＡＡを開発することが所望される場合、候補ＡＡのＣＭは、Ｎｏｔｃｈ受容体、Ｊａｇｇｅｄリガンド、またはＥＧＦＲと共に共局在化している酵素の基質および／または還元剤であるように選択される（たとえば、ｕＰＡまたはプラスミンによって切断可能なＣＭ）。

【０２４６】

上述のように、ＡＢは、一般に目的の標的に応じて選択される。多くの標的が当分野で公知である。目的の生物学的標的には、疾患において役割を果たすと同定されたタンパク質標的が含まれる。そのような標的には、それだけには限定されないが、細胞表面受容体および分泌された結合タンパク質（たとえば成長因子）、可溶性酵素、構造タンパク質（たとえば、コラーゲン、フィブロネクチン）、細胞内標的などが含まれる。例示的な非限定的な標的を表１に提示するが、他の適切な標的が当業者によって容易に識別可能であろう。さらに、目的の標的と共に共局在化する多くのプロテアーゼが当分野で公知である。したがって、当業者は、上記方法で使用するための適切な酵素および酵素基質を容易に同定できるであろう。

【０２４７】

（ａ）ＡＡスクリーニング前の、細胞表面ディスプレイの任意選択の濃縮

スクリーニング方法の前に、細胞表面上で適切なペプチドディスプレイ足場を発現する細胞を濃縮することが望ましい場合がある。任意選択の濃縮により、細胞ライブラリから（１）細胞外膜上にペプチドディスプレイ足場を発現しない、または（２）細胞外膜上に非機能的ペプチドディスプレイ足場を発現する細胞を除去することが可能となる。非機能的ペプチドディスプレイ足場は、たとえばストップコドンまたは欠失突然変異の結果、候補ＡＡを正しく表示しない。

【０２４８】

細胞の濃縮は、細胞集団を成長させ、ペプチドディスプレイ足場の発現を誘導することによって達成できる。その後、たとえば、足場内に組み込まれた検出可能なシグナルもしくは部分の検出に基づいて、または、ディスプレイ足場もしくはＡＡの共有部分と結合する検出可能に標識した抗体を使用することによって、細胞を分別する。これらの方法は、２００７年３月２２日公開の米国特許出願公開第２００７／００６５１５８号に詳述されている。

【０２４９】

（ｂ）切断されたＡＡによる標的結合のスクリーニング

スクリーニングの前に候補ＡＡライブラリを拡大することができる（たとえば、適切な条件下で適切な培地中の培養で成長させることによる）。任意選択の拡大に続いて、または最初のステップとして、ライブラリを第１のスクリーニングに供して、プロテアーゼに曝露した後に標的と結合する候補ＡＡを同定する。したがって、このステップは、しばしば本明細書中で陽性選択ステップと呼ぶ。

【０２５０】

プロテアーゼ切断後に標的と結合するメンバーを同定するために、候補ＡＡライブラリを、表示された候補ＡＡのＣＭを切断することができるプロテアーゼと、十分な時間の間、ＣＭのプロテアーゼ基質の切断をもたらすために適した条件下で接触させる。様々なプロテアーゼ－ＣＭの組合せが当業者によって容易に確認可能であり、プロテアーゼは、ＣＭを切断することができ、ｉｎ　ｖｉｖｏで目的の標的（ＡＢの結合パートナーである）と共に共局在化するものである。たとえば、目的の標的が固形腫瘍に関連する標的（たとえばＶＥＧＦ）である場合は、適切な酵素には、たとえば、マトリックス－メタロプロテアーゼ（たとえばＭＭＰ－２）、ディスインテグリンおよびメタロプロテアーゼ（複数可

）（ＡＤＡＭｓ）／トロンボスポンジン様モチーフを有するＡＤＡＭ（ＡＤＡＭＴＳ）、カテプシンならびにカリクレインが含まれる。本明細書中に記載のＡＡ中のＣＭとして有用な基質のアミノ酸配列は当分野で公知であり、所望する場合は、本明細書中に記載の方法を適応させることによってＣＭとして使用するために適した最適な配列を同定するためにスクリーニングすることができる。例示的な基質には、それだけには限定されないが、表３に記載の酵素によって切断可能な基質が含まれることができる。

【０２５１】

また、候補ＡＡライブラリを、十分な時間の間、標的結合に適切な、標的とＡＢとの結合が予測される条件に従って選択することができる条件下で、標的に曝露させる。候補ＡＡライブラリは標的に曝露させる前（たとえば、切断されたＡＡが含まれる候補ＡＡの集団を提供するため）、または標的への曝露と組み合わせて、プロテアーゼに曝露させることができ、通常は、プロテアーゼおよび標的の両方が同じ環境中に存在する予測されるｉｎ　ｖｉｖｏ状況を最良にモデリングするために、後者である。プロテアーゼおよび標的の両方に曝露させた後、ライブラリをスクリーニングして、標的－ＡＢの複合体中の候補ＡＡが含まれる、結合した標的を有するメンバーを選択する。

【０２５２】

標的と結合した候補ＡＡの検出は、様々な様式で達成することができる。たとえば、標的を検出可能に標識してよく、標的と結合した候補ＡＡの第１の集団を検出可能な標識の検出によって選択して、結合した標的を有する第２の集団を作製してよい（たとえば、標的と結合した候補ＡＡの陽性選択）。

【０２５３】

（ｃ）プロテアーゼ切断の非存在下で標的と結合しない候補ＡＡのスクリーニング

その後、プロテアーゼに曝露した後の標的結合について選択された候補ＡＡの集団を拡大し（たとえば、適切な条件下で適切な培地中での培養で成長させることによる）、拡大したライブラリを第２のスクリーニングに供して、プロテアーゼ曝露の非存在下で標的との結合が減少したまたは検出不可能であるメンバーを同定することができる。この第２のスクリーニングから生じる集団には、切断されていない場合に有意にまたは検出可能なレベルまで標的と結合しない候補ＡＡが含まれる。したがって、このステップは、しばしば本明細書中で陰性選択ステップと呼ぶ。

【０２５４】

第１のスクリーニングから生じた集団を、プロテアーゼの非存在下、十分な時間の間、標的結合に適切な、標的とＡＢとの結合が予測される条件に従って選択することができる条件下で、標的と接触させる。その後、陰性選択を行って、検出可能に標的結合を示さないものを含めた、標的結合が比較的減少している候補ＡＡを同定することができる。この選択は、たとえば、検出可能に標識した標的を使用し、標的に曝露させた集団を、検出可能な標的結合を示さないおよび／または比較的より低い検出可能なシグナルを示す候補ＡＡを表示する細胞を別の部分集団へと分別するためのフローサイトメトリー分析に供することによって、達成できる。したがって、この部分集団は、切断の非存在下で標的に対して減少したまたは検出不可能な結合を示す候補ＡＡを有する細胞について濃縮されている。

【０２５５】

（ｄ）検出可能な標識

検出可能な標識および検出可能な部分は互換性があるように使用し、それだけには限定されないが、放射性同位元素、蛍光剤、化学発光剤、発色団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、発色団、色素、金属イオン、金属ゾル、リガンド（たとえば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン（ｓｔｒｅｐａｖｉｄｉｎ）またはハプテン）などを含めた、検出が可能な分子をいう。用語、蛍光剤とは、検出可能な範囲の蛍光を示すことができる物質またはその一部分をいう。標的の標識としての使用に適した例示的な検出可能な部分には、親和性タグおよび蛍光タンパク質が含まれる。

【０２５６】

本明細書中で使用する用語、親和性タグとは、親和性タグと結合して検出可能なシグナル（たとえば、蛍光化合物またはタンパク質）を提供する分子を用いて検出することができる、標的に付着させることができるペプチドセグメントを示す。原理的には、抗体または他の特異的結合剤がそれに対して利用可能な任意のペプチドまたはタンパク質を親和性タグとして使用することができる。使用に適した例示的な親和性タグには、それだけには限定されないが、単球性アダプタータンパク質（ＭＯＮＡ）結合ペプチド、Ｔ７結合ペプチド、ストレプトアビジン結合ペプチド、ポリヒスチジントラクト、タンパク質Ａ（Ｎｉｌｓｓｏｎら、ＥＭＢＯ Ｊ．、４巻：１０７５頁（１９８５年）、Ｎｉｌｓｓｏｎら、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．、１９８巻：３頁（１９９１年））、グルタチオンＳトランスフェラーゼ（ＳｍｉｔｈおよびＪｏｈｎｓｏｎ、Ｇｅｎｅ、６７巻：３１頁（１９８８年））、Ｇｌｕ－Ｇｌｕ親和性タグ（Ｇｒｕｓｓｅｎｍｅｙｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８２巻：７９５２頁（１９８５年））、物質Ｐ、ＦＬＡＧペプチド（Ｈｏｐｐら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、６巻：１２０４頁（１９８８年））、または他の抗原性エピトープもしくは結合ドメインが含まれる。一般に、Ｆｏｒｄら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎｄ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ、２巻：９５頁（１９９１年）を参照されたい。親和性タグをコードしているＤＮＡ分子は、商業的供給者（たとえばＰｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ．）から入手可能である。

【０２５７】

当分野で周知の任意の蛍光ポリペプチド（本明細書中で蛍光標識とも呼ぶ）が、本明細書中に記載のペプチドディスプレイ足場の検出可能な部分として、または親和性タグと共に使用するために適している。適切な蛍光ポリペプチドは、細菌細胞または哺乳動物細胞などの所望の宿主細胞中で発現させることができ、定性的（陽性／陰性）および定量的（蛍光の比較による度合）に評価することができる検出可能なシグナルを容易に提供するものである。例示的な蛍光ポリペプチドには、それだけには限定されないが、黄色蛍光タンパク質（ＹＦＰ）、シアン蛍光タンパク質（ＣＦＰ）、ＧＦＰ、ｍＲＦＰ、ＲＦＰ（ｔｄｉｍｅｒ２）、ＨＣＲＥＤなど、あるいはその任意の突然変異体（たとえば、増強した蛍光もしくはシフトされた発光スペクトルを提供するように改変された蛍光タンパク質）、類似体、または誘導体が含まれる。さらなる適切な蛍光ポリペプチド、および本明細書中に記載したものの具体的な例は、当分野で提供されており、かつ周知である。

【０２５８】

ビオチンに基づいた標識も本明細書中に開示する方法において使用が見つかる。標的分子および基質のビオチン化は周知であり、たとえば、タンパク質、核酸、炭水化物、カルボン酸をビオチン化するためのアミン反応性剤およびチオール反応性剤を含めた多数のビオチン化剤が公知である。たとえば、本明細書中に参考として組み込まれている第４章、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ Ｃａｔａｌｏｇ、Ｈａｕｇｌａｎｄ、第６版、１９９６年を参照されたい。ビオチン標識した基質は、アビジンまたはストレプトアビジンなどの検出可能に標識したビオチン結合パートナーの結合によって検出することができる。同様に、多数のハプテン化試薬も公知である。

【０２５９】

（ｅ）スクリーニング方法

目的のＡＡの分離および回収をもたらす任意の適切な方法を利用し得る。たとえば、目的のＡＡを表示する細胞は、ＦＡＣＳ、免疫クロマトグラフィー、または、検出可能な標識が磁気である場合は磁気分離によって分離し得る。分離の結果、集団は、所望の特徴を示す、たとえば、切断後に標的に対する結合を示す、または切断の非存在下で標的に対して減少したもしくは検出不可能な結合を有する細胞について濃縮されている。

【０２６０】

たとえば、結合した検出可能に標識した標的を有する候補ＡＡの選択は、当分野で公知の様々な技法を用いて達成することができる。たとえば、フローサイトメトリー（たとえばＦＡＣＳ（登録商標））方法を用いて、検出可能に標識した候補ＡＡを標識されていな

い候補ＡＡから分別することができる。フローサイトメトリー（ｃｙｏｍｔｅｒｙ）方法は、たとえば、第２の集団へと分離してさらにスクリーニングするために、より暗い細胞集団を可能にするまたはより明るい細胞集団を必要とするようにゲーティングを改変することによって、候補ＡＡの集団の分離において多かれ少なかれストリンジェントな要件を提供するために、実行することができる。

【０２６１】

別の例では、免疫親和性クロマトグラフィーを用いて、標的と結合した候補ＡＡを標的と結合しないものから分離することができる。たとえば、抗標的抗体が結合した支持体（たとえば、カラム、磁気ビーズ）を、プロテアーゼおよび標的に曝露させた候補ＡＡと接触させることができる。標的が結合した候補ＡＡは抗標的抗体と結合し、したがって、結合した標的を欠く候補ＡＡからの分離が容易となる。スクリーニングステップが、比較的減少した標的結合を有するまたは検出可能な標的結合を有さない（たとえば他の候補ＡＡと比較して）、切断されていない候補ＡＡについて濃縮された集団を提供するためである場合は、目的の部分集団は、結合した標的について検出可能なシグナルが比較的減少したまたはそれを欠くメンバーである。たとえば、免疫親和性技法を結合した標的のそのような陰性選択で使用する場合、目的の部分集団は、抗標的支持体によって結合されないものである。

【０２６２】

（ｆ）二重標的結合ＡＡのスクリーニング

本明細書中に開示するスクリーニング方法は、２つのＡＢを有する二重標的結合ＡＡを同定するために容易に適応され得る。一般に、この方法は複数の候補ＡＡを含有するライブラリを含み、前記多数性のそれぞれのメンバーは、第１のＡＢ、第２のＡＢ、第１のＣＭおよび／もしくは第２のＣＭ、第１のＭＭ、ならびに／または第２のＭＭを含む。ライブラリを、少なくとも第１のＡＢと結合することができる標的および第１のＣＭを切断することができる切断剤と接触させる。ライブラリの第１のメンバー集団を、切断剤の存在下（たとえばＣＭのプロテアーゼ）における標的との結合について選択する。その後、この選択された集団を上記陰性スクリーニングに供して、切断剤の非存在下における標的とライブラリメンバーとの結合を評価する。その後、切断剤の非存在下で前記標的と結合する部分メンバー集団を枯渇させることによって、第２のメンバー集団が生じる。これは、たとえば、検出可能に標識した標的の検出によって決定されるように、標的と結合していないメンバーを標的と結合しているものから離して分別することによって達成できる。したがって、この方法は、切断剤の存在下における前記標的との結合と比較して減少した、切断剤の非存在下における標的との結合を示す候補ＡＡの選択を提供する。この方法は両方の標的で繰り返すことができる。

【０２６３】

候補ＡＡを選択するスクリーニング方法の例示的な変化

上記方法は、所望の特徴を実証する集団およびライブラリメンバーを選択するために改変し得る。

【０２６４】

（ａ）ＭＭのマスキング効率の決定

ＭＭのマスキング効率は、少なくとも２つのパラメータ、すなわち、抗体またはその断片に対するＭＭの親和性、およびＡＢとその標的との結合の妨害に対するＭＭの空間的な関係性によって決定される。

【０２６５】

親和性に関して、例として、１つのＭＭは、高い親和性を有するがＡＢ上の結合部位を部分的にのみ阻害し得る一方で、別のＭＭは、ＡＢに対してより低い親和性を有するが標的結合を完全に阻害し得る。短期間の間は、より低い親和性のＭＭは十分なマスキングを示し得るが、その一方で、時間とともに、同じＭＭは標的によって置き換えられ得る（ＡＢに対する不十分な親和性が原因）。

【０２６６】

同様の様式で、同じ親和性を有する２つのＭＭは、これらが、どれほど良好にＡＢ上の結合部位の阻害またはＡＢがその標的と結合することの防止を促進するかに基づいて、異なる程度のマスキングを示し得る。別の例では、高い親和性を有する１つのＭＭは、その標的との結合が完全に阻害されるように、ＡＢと結合してその構造を変化させ得る一方で、高い親和性を有する別のＭＭは、結合を部分的にのみ阻害し得る。その結果、有効なＭＭの発見は親和性のみに基づくことができず、マスキング効率の経験的尺度が含まれる場合がある。ＡＡ中のＭＭの時間依存性の標的置換は、ＭＭについて最適化および選択するために測定することができる。この目的のために新規標的置換アッセイ（ＴＤＡ）が本明細書中に記載されている。

【０２６７】

ＴＤＡアッセイは、効率的にマスキングされたＡＡの発見および妥当性確認に使用することができ、マスキング効率の経験的に決定すること、標的の存在下で標的と結合するマスキングされたＡＢの能力を、標的の存在下で標的と結合するマスキングされていないおよび／または親ＡＢの能力と比較することを含む。結合効率は、マスキングされていない／親ＡＢの結合と比較した、平衡結合の％として表すことができる。ＡＢがＭＭで修飾されており、標的の存在下にある場合、ＡＢとその標的との特異的結合は、ＭＭで修飾されていないＡＢまたは親ＡＢと標的との特異的結合と比較して、低下または阻害されている場合がある。本明細書中に記載のようにｉｎ　ｖｉｖｏまたは標的置換ｉｎ　ｖｉｔｒｏの免疫吸着アッセイで測定した際に、ＭＭで修飾されていないＡＢまたは親ＡＢと標的との結合と比較した場合、ＭＭで修飾した場合に標的と結合するＡＢの能力は、少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、さらには１００％、少なくとも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、１２カ月間もしくはそれより長くの間、低下する場合がある。

【０２６８】

（ｂ）ＡＡ要素を同定および／または最適化するための反復スクリーニング

本明細書中に記載の方法および候補ＡＡライブラリは、ＡＡの１つまたは複数の要素の同定および／または最適化をもたらすために容易に適応させることができる。たとえば、ＡＢ、ＣＭ、リンカーなどのうちの任意の１つまたは複数に関して変動する候補ＡＡを生成し、本明細書中に記載のスクリーニング方法に供することができる。

【０２６９】

（ｃ）還元剤で活性化可能なＡＡ

上記方法はＡＡを同定するためのスクリーニング方法を記載しているが、ＡＡ中のシステイン－システインジスルフィド結合の形成を促進することができるＣＭを有するＡＡまたは候補ＡＡも、本明細書中に開示するスクリーニング方法に供することができることを理解されたい。そのようなＡＡには、プロテアーゼ基質を含んでいても含んでいなくてもよいＣＭ（同じまたは異なるＣＭであり得る）がさらに含まれていても含まれていなくてもよい。これらの実施形態では、上述の陽性スクリーニングは、ＡＡのシステイン－システイン対のジスルフィド結合を切断することができるＡＡまたは候補ＡＡを還元剤（たとえば還元条件）に曝露することによって実施し得る。その後、陰性スクリーニングを還元条件の非存在下で実施することができる。したがって、生じるライブラリは、ジスルフィド結合還元条件への曝露によって活性化可能なＡＡについて濃縮されている場合がある。

【０２７０】

（ｄ）光で活性化可能なＡＡ

上記方法はＡＡを同定するためのスクリーニング方法を記載しているが、光感受性であるＣＭを有しており、光分解の際に活性化することができるＡＡまたは候補ＡＡも提供されることを理解されたい。これらの実施形態では、上述の陽性スクリーニングは、ＡＡまたは候補ＡＡを露光させることによって実施し得る。その後、陰性スクリーニングを光の非存在下で実施することができる。したがって、生じるライブラリは露光によって活性化

可能なＡＡについて濃縮されている場合がある。

【０２７１】

（ｅ）サイクル回数およびＡＡの足場なしのスクリーニング

上記方法のサイクル回数を増やすことによって、向上した切替特徴を実証する集団およびライブラリメンバーを同定することができる。多数のサイクルのスクリーニングを行うことができる。

【０２７２】

さらに、候補ＡＡの動作範囲を決定するために、候補ＡＡの個々のクローンを単離し、スクリーニングに供することができる。また、候補ＡＡを足場とは別々に所望の切替可能な表現型について試験することもできる、すなわち、候補ＡＡをディスプレイ足場とは別々に発現または他の様式で作製し、候補ＡＡの切替可能な表現型を足場の非存在下で、かつ所望する場合は無細胞系で（たとえば可溶化したＡＡを用いて）評価することができる。

【０２７３】

（ｆ）ＡＡの構成要素および切替活性の最適化

ＡＡ、たとえば本明細書中に記載のスクリーニング方法で同定したＡＡの性能を最適化するために、上記方法を改変し得る。たとえば、たとえば切断されていない状態においてＡＢの標的結合の阻害の向上を提供するために、マスキング部分の性能を最適化することが望ましい場合は、ＡＢおよびＣＭのアミノ酸配列を候補ＡＡライブラリ中で固定し、ライブラリのメンバーが互いに対して可変のＭＭを有するようにＭＭを変動させ得る。ＭＭは、ＭＭを構成するアミノ酸の数およびまたは種類の変更を含めた様々な様式で最適化し得る。たとえば、複数の候補ＡＡのそれぞれのメンバーが候補ＭＭを含んでいてよく、候補ＭＭは少なくとも１つのシステインアミノ酸残基を含み、残りのアミノ酸残基は多数性のメンバー間で変動する。さらなる例では、複数の候補ＡＡのそれぞれのメンバーが候補ＭＭを含んでいてよく、候補ＭＭは、システインアミノ酸残基およびアミノ酸残基のランダム配列、たとえば５個のアミノ酸のランダム配列を含む。

【０２７４】

（ｇ）拡大した動作範囲の選択

上述のように、マスキングされていない／切断された対マスキングされた／切断されていない状態の標的結合に関して所望の動作範囲を有するＡＡも目的である。そのようなＡＡは、たとえば、標的の存在下、被験体中の処置および非処置部位で見つかる生理的レベルで検出可能な結合を有さないが、プロテアーゼによって切断された後は、標的に対して高い親和性および／または高い結合力の結合を示すものである。ＡＡの動作範囲が大きければ大きいほど、ＡＡの切替可能な表現型はより良好になる。したがって、ＡＡは、切断剤の存在および非存在下で標的結合について拡大された動作範囲を有するものの選択について最適化することができる。

【０２７５】

本明細書中に記載のスクリーニング方法は、所望のおよび／または最適化された動作範囲を有するＡＡの選択を増強するように改変することができる。一般に、これは、プロテアーゼに曝露されたＡＡ（すなわち切断されたＡＡが含まれるスクリーニング集団）の標的結合のスクリーニングが、切断されていないＡＡの標的結合のスクリーニングよりも比較的低い標的濃度を用いて行われるように、方法の陽性選択および陰性選択ステップで利用する標的の濃度を改変することによって達成できる。したがって、標的濃度をステップ間で変動させて、切替可能な表現型に対する選択圧を提供する。所望する場合は、陽性および陰性選択ステップで使用する標的濃度の差異を、サイクル数の増加に伴って増加させることができる。

【０２７６】

陽性選択ステップで比較的より低濃度の標的を使用することは、切断された状態にある場合に標的結合が向上したＡＡメンバーの選択を駆動する役割を果たすことができる。たとえば、プロテアーゼに曝露させたＡＡを含むスクリーニングは、ＡＢ－標的の相互作用

のＫｄの約２～約１００分の１、約２～５０分の１、約２～２０分の１、約２～１０分の１、または約２～５分の１である標的濃度で行うことができる。その結果、標的と結合したＡＡについて集団を選択した後、選択された集団は、集団中の他のＡＡよりも高い親和性および／または結合力の結合を示すＡＡについて濃縮されている。

【０２７７】

陰性選択ステップで比較的より高い濃度の標的を使用することは、切断されていない状態にある場合に検出可能な標的結合が減少したまたは存在しないＡＡメンバーの選択を駆動する役割を果たすことができる。たとえば、プロテアーゼに曝露していないＡＡ（陰性選択ステップで）を含むスクリーニングは、ＡＢ－標的の相互作用のＫｄよりも約２～約１００倍高い、約２～５０倍高い、約２～２０倍高い、約２～１０倍高い、または約２～５倍高い標的濃度で行うことができる。その結果、標的と検出可能に結合しないＡＡについて集団を選択した後、選択された集団は、切断されていない状態で標的に対して集団中の他の切断されていないＡＡよりも低い結合を示すＡＡについて濃縮されている。つまり、標的と検出可能に結合しないＡＡについて集団を選択した後、選択された集団は、標的とＡＢとの結合が、たとえば標的結合からのＡＢのマスキングが原因で阻害される、ＡＡについて濃縮されている。

【０２７８】

ＡＡが二重標的結合ＡＡである場合、上述のスクリーニング方法を、第１のＡＢと結合することができる第１の標的および第２のＡＢと結合することができる第２の標的について所望の動作範囲を有するＡＡを提供するように適応させることができる。ディスプレイ足場上に提示されるＡＡから切り離されるＡＡの一部分上に配置されているＡＢとの標的結合は、溶液中（たとえば培地中）での標的－ＡＢの複合体の形成を評価する、たとえば、切断された断片を捕捉するための抗ＡＡ断片抗体を有する免疫クロマトグラフィーを行い、その後、カラム上に捕捉された結合した検出可能に標識した標的を検出することによって、評価することができる。

【０２７９】

（ｈ）可溶性ＡＡの試験

候補ＡＡを、可溶形にある間に切替可能な表現型を維持するその能力について試験することができる。１つのそのような方法は、標的を支持体（たとえば、アレイ、たとえばＢｉａｃｏｒｅ（商標）ＣＭ５センサーチップの表面）上に固定することを含む。目的の標的の固定は、任意の適切な技法（たとえば標準のアミンカップリング）を用いて達成することができる。支持体の表面を遮断して、非特異的結合を低下させることができる。任意選択で、この方法は、対照（たとえば、固定した標的を含有しない支持体（たとえば支持体とのバックグラウンド結合を評価するため）の使用を含むことができ、および／または陰性対照として役割を果たす化合物（たとえば、標的対非標的の候補ＡＡとの結合の特異性を評価するため）を含有できる。

【０２８０】

標的を共有的に固定した後、候補ＡＡを、固定した標的との特異的結合を可能にするために適切な条件下で、支持体と接触させる。切替可能な表現型を評価するために、候補ＡＡを支持体に固定した標的と、適切な切断剤の存在下および非存在下で接触させることができる。切断剤の非存在下と比較した、および任意選択で陰性対照における結合と比較した、切断剤の存在下における候補ＡＡの結合の評価により結合応答が提供され、立ち代ってこれは切替可能な表現型の指標である。

【０２８１】

（ｉ）候補ＡＡで使用するための個々の部分のスクリーニング

候補ＡＡを切替可能な表現型について試験する前に、候補ＡＡの部分、たとえば、ＡＢ、ＭＭまたはＣＭのうちの１つまたは複数について別々にスクリーニングすることが望ましい場合がある。たとえば、特定のプロテアーゼによって切断可能なペプチド基質を同定するための公知の方法を利用して、そのようなプロテアーゼによって活性化されるように設計されたＡＡで使用するＣＭを同定することができる。さらに、様々な方法が目的の標

的と結合するペプチド配列の同定に利用可能である。これらの方法は、たとえば、特定の標的と結合するＡＢを同定するため、または特定のＡＢと結合するＭＭを同定するために使用することができる。

【０２８２】

上記方法には、たとえば、候補ＡＡの部分、たとえば、ＡＢ、ＭＭまたはＣＭを、複製可能な生物学的実体を用いて表示させる方法が含まれる。

【０２８３】

（ｊ）自動スクリーニング方法

特定の実施形態では、本明細書中に記載のスクリーニング方法は、ＡＡのライブラリを所望の切替可能な活性についてスクリーニングするための便利な、リアルタイムの、高容量の方法を提供するために、自動化されている。自動方法は、陽性および陰性選択の反復ラウンドを提供し、選択された集団が所望のサイクル回数の間分離されて自動的に次のスクリーニングに供されるように設計することができる。

【０２８４】

集団中の候補ＡＡの評価は、陽性選択ステップ、陰性選択ステップ、または両方が完了した後に、経時的に反復的に実施し得る。さらに、陽性および陰性選択ステップ中で選択された標的濃度での候補ＡＡの集団の平均動作範囲に関する情報を監視し、後に分析するため、たとえば様々な標的濃度の選択圧の効果を評価するために、保存することができる。

【０２８５】

一部の実施形態では、コンピュータソフトウェア製品などの実行可能なプラットフォームが検出および／または測定手段の動作を制御することができ、上述のステップに関する数値演算を行い、所望の出力（たとえばフローサイトメトリー分析など）を生じることができる。コンピュータプログラム製品はコンピュータ読取可能ストレージ媒体を含み、媒体中にコンピュータ読取可能プログラムコード手段が実装されている。そのような自動装置での使用に適したハードウェアは当業者に明らかであり、コンピュータコントローラー、自動試料ハンドラー、蛍光測定ツール、プリンターおよび光ディスプレイが含まれ得る。測定ツールは、蛍光によって検出可能な分子を利用する場合に試料からの蛍光シグナルを測定するための、１つまたは複数の光検出器を含有し得る。また、測定ツールは、それぞれの対照および／または試験試料を試料のアレイとして配置し、蛍光強度を測定するステップ中に光検出器の向かいに自動的かつ繰り返して配置されるように、コンピュータ制御のステッピングモーターも含有し得る。

【０２８６】

測定ツール（たとえばＦＡＣＳ）は、一般目的または用途に特異的なコンピュータコントローラーに作動可能に連結させることができる。コントローラーは、測定ツールの動作を制御し、上述のステップに関する数値演算を行うように生成されたコンピュータプログラムを含むことができる。コントローラーは、ファイル、ディスク入力またはデータバスを介して設定および他の関連するデータを読み込み得る。また、ディスプレイおよびプリンターも、コントローラーによって行われる動作を視覚的に表示するために提供し得る。コントローラーによって行われる機能は、その全体または一部分が、一般目的のコンピュータシステム上で実行されるソフトウェアモジュールとして実現し得ることが、当業者には理解されよう。あるいは、上述の機能および動作を行うための、用途に特異的に組み込まれた回路を有する専用の独立型のシステムを提供し得る。

【０２８７】

治療においてＡＡを使用する方法

ＡＡは、たとえば、治療上有効な量の目的のＡＡおよび薬学的に許容される賦形剤である担体（薬学的に許容される担体とも呼ばれる）を含有する医薬組成物内に組み込むことができる。多くの薬学的に許容される賦形剤が当分野で公知であり、一般に、投与経路、処置する状態、および当分野で十分に理解されている他のそのような可変のものに従って選択される。薬学的に許容される賦形剤は、たとえば、Ａ．　Ｇｅｎｎａｒｏ（２０００

年）Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：　Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ、第２０版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，　Ｗｉｌｌｉａｍｓ，　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｄｏｓａｇｅ　Ｆｏｒｍｓ　ａｎｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（１９９９年）Ｈ．Ｃ．　Ａｎｓｅｌら編、第７版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，　Ｗｉｌｌｉａｍｓ，　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ、およびＨａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ（２０００年）Ａ．Ｈ．　Ｋｉｂｂｅら編、第３版、Ａｍｅｒ．　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ａｓｓｏｃ．を含めた様々な出版物中に十分に記載されている。医薬組成物には、ｐＨ調節剤および緩衝剤、等張性調節剤、安定化剤、湿潤剤などの他の構成要素も含めることができる。一部の実施形態では、ナノ粒子またはリポソームがＡＡを含む医薬組成物を保有する。

【０２８８】

ＡＡの医薬組成物の適切な構成要素は、ＡＡのＡＢに既に利用可能であり得る医薬組成物によって導かれる場合がある。たとえば、ＡＡに、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４に対する抗体が含まれる場合、たとえば、そのようなＡＡは、その抗体での使用に適した方法および組成物に従った医薬配合物中で配合することができる。

【０２８９】

一般に、１つまたは複数のＡＡの医薬配合物は、所望の度合の純度を有するＡＡを、任意選択の生理的に許容される担体、賦形剤または安定化剤と共に（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、第１６版、Ｏｓｏｌ，　Ａ．編（１９８０年））、凍結乾燥配合物または水溶液の形態で混合することによって、貯蔵用に調製する。許容可能な担体、賦形剤、または安定化剤は、用いる用量および濃度でレシピエントに対して無毒性であり、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝液、アスコルビン酸およびメチオニンを含めた抗酸化剤、保存料（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール、メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レソルシノール、シクロヘキサノール、３－ペンタノール、およびｍ－クレゾール等）、低分子量（約１０個未満の残基）ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリシンなどのアミノ酸、グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含めた単糖、二糖、および他の炭水化物、ＥＤＴＡなどのキレート化剤、スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトールなどの糖、ナトリウムなどの塩形成対イオン、金属錯体（たとえばＺｎ－タンパク質の複合体）、ならびに／またはＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）もしくはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

【０２９０】

ｉｎ　ｖｉｖｏ投与に使用する配合物は無菌的でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通して濾過することによって容易に達成される。また、医薬配合物は、処置する特定の適応症の必要に応じて複数の活性化合物も含有してよく、追加の活性化合物は、一般に、ＡＡに補完的な活性を有するものである。そのような化合物は、意図する目的に有効な量で、組み合わせて最適に存在する。

【０２９１】

医薬配合物は、全身性または局所的な注射用調製物などの様々な剤形で提供することができる。構成要素は、マイクロカプセルなどの担体、たとえば、コアセルベーション技法もしくは界面重合によって調製したものなど、たとえば、それぞれヒドロキシメチルセル

ロースもしくはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート（ｍｅｔｈｙｌｍｅｔｈａｃｙｌａｔｅ））マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系（たとえば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）中、またはマクロエマルジョン中で提供することができる。そのような技法はＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、第１６版、Ｏｓｏｌ，　Ａ．編（１９８０年）に開示されている。

【０２９２】

また、持続放出調製物もＡＡ含有配合物の範囲内にある。例示的な持続放出調製物には、ＡＡ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含まれることができ、マトリックスは、造形品、たとえばフィルムまたはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（たとえば、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））、ポリ乳酸（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸とγ－エチル－Ｌ－グルタミン酸とのコポリマー、非分解性エチレン－酢酸ビニル、ＬＵＰＲＯＮ　ＤＥＰＯＴ（商標）（乳酸－グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドからなる注射用ミクロスフェア）などの分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、およびポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が含まれる。エチレン－酢酸ビニルおよび乳酸－グリコール酸などのポリマーは１００日間を超え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の間タンパク質を放出する。

【０２９３】

カプセル封入したＡＡが身体内に長期間保持される場合、これらは生理的温度（約３７℃）での水分への曝露の結果として変性または凝集し、減少した生物活性および場合によっては免疫原性の変化をもたし得る。関与する機構に応じて、安定化の合理的な戦略を考案することができる。たとえば、凝集機構が、チオ－ジスルフィド交換を介した望ましくない分子間Ｓ－Ｓ結合の形成であると判明した場合、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含量の制御、適切な添加剤の使用、および特定のポリマーマトリックス組成物の開発によって安定化を達成し得る。

【０２９４】

ＡＡは、治療的目的に役立つ活性薬剤を標的化送達するための送達ビヒクルと結合体化させることができる。たとえば、ＡＡは、薬物がそれ中にカプセル封入されたまたはそれと会合している、ナノ粒子またはリポソームと結合体化させることができる。このようにして、薬物の特異的な標的化送達を達成することができる。ポリペプチドをリポソームと連結させる方法は当分野で周知であり、そのような方法を適用して、ＡＡを、リポソーム内容物の標的化およびまたは選択的送達のためのリポソームと連結させることができる。例として、ポリペプチドは、チオエーテル結合を介してリポソームと共有結合することができる。また、ＰＥＧ化ゼラチンナノ粒子およびＰＥＧ化リポソームも、ポリペプチド、たとえば単鎖抗体を付着させるための支持体として使用されている。たとえば、ポリペプチド、たとえば抗体断片をリポソームと結合体化させるための方法のその開示について本明細書中に参考として組み込まれている、Ｉｍｍｏｒｄｉｎｏら（２００６年）Ｉｎｔ Ｊ　Ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅ．、９月；１巻（３号）：２９７～３１５頁を参照されたい。

【０２９５】

（ａ）処置方法

本明細書中に記載のＡＡは、ＡＡ中に提供するＣＭ－ＡＢの組合せに従って、適切な被験体を処置する方法での使用に選択することができる。ＡＡは、経口、非経口、皮下、腹腔内、肺内、および鼻腔内などの任意の適切な手段によって、かつ所望する場合は局所的注射（たとえば固形腫瘍の部位）のために投与することができる。非経口投与経路には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下の投与が含まれる。

【０２９６】

用語、処置部位または疾患部位とは、図２に図示するように、本明細書中に記載のよう

に、ＡＡが切替可能であるように設計された部位、たとえば、ＡＡの一方または両方のＡＢの標的およびＡＡのＣＭを切断することができる切断剤が共局在化している部位をいうことを意味する。処置部位には、局所投与（たとえば、注射、インフュージョン（たとえばカテーテルによる）など）または全身投与（たとえば、処置部位から離れた部位への投与）によって接近することができる組織が含まれる。処置部位には、比較的生物学的に閉鎖されているもの（たとえば、器官、嚢、腫瘍部位など）が含まれる。

【０２９７】

ＡＡの適切な用量は、処置する疾患の種類、疾患の重篤度および経過、患者の病歴およびＡＡに対する応答、ならびに担当医の裁量に依存する。ＡＡは、１回の時点で、または一連の処置にわたって患者に適切に投与することができる。ＡＡはは、他の処置および治療様式、他の製薬などと共に投与することができる。

【０２９８】

疾患の種類および重篤度に応じて、約１μｇ／ｋｇ～１５ｍｇ／ｋｇ（たとえば０．１～２０ｍｇ／ｋｇ）のＡＡが、たとえば１つまたは複数の別々の投与によるか、持続注入によるかにかかわらず、患者に投与する初期候補用量として役割を果たすことができる。典型的な１日用量の範囲は、本明細書中に言及したものなどの要因に応じて、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ以上であり得る。数日間またはそれ以上にわたる繰り返しの投与には、状態に応じて、疾患症状の所望の抑制が起こるまで処置を持続する。しかし、他の用量レジメンも有用であり得る。

【０２９９】

ＡＡ組成物は、優良医療行為に適う様式で配合、用量決定、および投与する。このコンテキストにおいて考慮すべき要因には、処置する特定の障害、処置する特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、ＡＡの送達部位、投与方法、投与スケジュール、および医療従事者に公知の他の要因が含まれる。治療上有効な量の投与するＡＡはそのような考慮事項によって管理され、疾患または障害を予防、寛解、または処置するために必要な最小の量である。

【０３００】

一般に、疾患または障害の緩和または処置は、疾患または障害に関連する１つまたは複数の症状または医学的問題の軽減を含む。たとえば、癌の場合、治療上有効な量の薬物は、以下のうちの１つまたは組合せを達成することができる：癌細胞の数を減らすこと、腫瘍の大きさを低下すること、抹消器官内への癌細胞の浸潤を阻害すること（すなわち、ある程度まで減少させるおよび／もしくは止める）、腫瘍の転移を阻害すること、腫瘍増殖をある程度まで阻害すること、ならびに／または癌に関連する症状のうちの１つもしくは複数をある程度まで緩和すること。一部の実施形態では、本発明の組成物は、被験体または哺乳動物において疾患または障害の発症または再発を予防するために使用することができる。

【０３０１】

ＡＡは、１つまたは複数の追加の治療剤または処置方法と組み合わせて（たとえば、同じ配合物中または別々の配合物中）使用することができる（組合せ療法）。ＡＡは、別の治療剤と混合して投与することができるか、または別々の配合物中で投与することができる。ＡＡと組み合わせて投与することができ、処置する状態に応じて選択される治療剤および／または処置方法には、手術（たとえば癌組織の外科的除去）、放射線療法、骨髄移植、化学療法処置、前述のものの特定の組合せなどが含まれる。

【０３０２】

（ｂ）罹患した組織対健康な組織におけるＡＡの使用

本発明のＡＡは、健康な組織に局在化した場合、活性化をわずかのみ示すまたは示さず、ＡＢは、「マスキングされた」状態に保たれる、または他の様式で標的に対してわずかのみの結合を示すもしくは結合が存在しない。しかし、罹患した組織中で、たとえばＡＡのＣＭを切断することができる疾患に特異的なプロテアーゼの存在下では、ＡＢは「マスキングされていない」状態となる、または標的と特異的に結合することができる。

【０３０３】
健康な組織とは、特異的に切断するまたは他の様式でＡＡのＣＭを改変することができる疾患に特異的な薬剤、たとえば、疾患に特異的なプロテアーゼ、疾患に特異的な酵素、または疾患に特異的な還元剤をわずかのみ産生する、または産生しない組織をいう。罹患した組織とは、特異的に切断するまたは他の様式でＡＡのＣＭを改変することができる疾患に特異的な薬剤、たとえば、疾患に特異的なプロテアーゼ、疾患に特異的な酵素、または疾患に特異的な還元剤を産生する組織をいう。
【０３０４】
（ｃ）疾患の様々な段階の罹患した組織におけるＡＡの使用
一部の実施形態では、本明細書中に記載のＡＡは複数のＣＭとカップリングしている。そのようなＡＡは、疾患の様々な段階で活性化される、または罹患した組織中の異なる区画中で活性化することができる。例として、ＭＭＰ－９で切断可能なＣＭおよびカテプシンＤで切断可能なＣＭの両方とカップリングしたＡＢは、早期腫瘍および末期段階の壊死性腫瘍中で活性化することができる。早期腫瘍中では、ＣＭはＭＭＰ－９によって切断することができ、ＡＡはマスキングされていない。末期腫瘍中では、ＣＭは末期腫瘍の死滅しつつある中心でアップレギュレートされているカテプシンＤによって切断することができ、ＡＡはマスキングされていない。別の例示的な実施形態では、ＭＭならびにＭＭＰ－９で活性化可能なＣＭおよびカスパーゼで活性化可能なＣＭとカップリングしたＡＢは、初期および末期腫瘍のどちらでも切断することができる。別では、血管形成（早期腫瘍）の活性部位のプラスミンは、プラスミンで切断可能なＣＭを切断することができ、侵入するマクロファージを有する疾患組織中のレグマインは、末期腫瘍中でレグマイン（ｌｅｕｇａｍａｉｎ）に特異的なＣＭを切断することができる。
【０３０５】
（ｄ）抗血管形成治療におけるＡＡの使用
ＡＡが、ＥＧＦＲ、ＴＮＦアルファ、ＣＤ１１ａ、ＣＳＦＲ、ＣＴＬＡ－４、ＥｐＣＡＭ、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０、ＣＤ２０、Ｎｏｔｃｈ１、Ｎｏｔｃｈ２、Ｎｏｔｃｈ３、Ｎｏｔｃｈ４、Ｊａｇｇｅｄ１、Ｊａｇｇｅｄ２、ＣＤ５２、ＭＵＣ１、ＩＧＦ１Ｒ、トランスフェリン、ｇｐ１３０、ＶＣＡＭ－１、ＣＤ４４、ＤＬＬ４、またはＩＬ４などの血管形成の媒介物質と結合するＡＢを含有する、例示的な一実施形態では、ＡＡは、血管形成の阻害が所望される状態、特にＶＥＧＦの阻害が目的である状態の処置において使用が見つかる。ＶＥＧＦ結合ＡＡには、ＶＥＧＦと結合するＡＢおよび線維芽細胞成長因子（たとえばＦＧＦ－２）などの第２の成長因子と結合してＦＧＦ活性を阻害するＡＢを有する二重標的結合ＡＡが含まれることができる。したがって、そのような二重標的結合ＡＡは、２つの血管形成促進因子の阻害を提供し、異常な血管形成の部位に共局在化している切断剤（たとえば、酵素、たとえばＭＭＰまたは表３に提示するものなどの他の酵素）によって活性化可能であるように設計することができる。
【０３０６】
血管形成阻害ＡＡは、被験体（たとえばヒト）中の固形腫瘍、特に関連する血管床が腫瘍に養われるために血管形成の阻害が阻害または腫瘍増殖を提供できる、固形腫瘍の処置において使用が見つかる。また、抗ＶＥＧＦに基づいた抗血管形成ＡＡは、異常な血管形成の阻害による治療を受け入れられる１つまたは複数の症状を有する他の状態においても使用が見つかる。
【０３０７】
一般に、異常な血管形成は、新しい血管が、疾患状態において過剰に、不十分または不適切に（たとえば、血管形成の位置、タイミング、もしくは発生が医学的観点から望ましくない）、あるいは疾患状態を引き起こすように成長した際に起こる。過剰、不適切または非制御の血管形成は、癌、特に血管新生した固形腫瘍および転移性腫瘍（結腸、肺癌（特に小細胞肺癌）、または前立腺癌が含まれる）、眼球血管新生によって引き起こされる疾患、特に糖尿病性盲目、網膜症、主に糖尿病性網膜症または加齢性黄斑変性症およびルベオーシス、乾癬、乾癬性関節炎、血管腫などの血管芽腫、炎症性腎臓病、たとえば、糸

球体腎炎、特にメサンギウム増殖性糸球体腎炎、溶血性尿毒症症候群、糖尿病性腎症または高血圧性腎硬化症、様々な炎症性疾患、たとえば、関節炎、特に関節リウマチ、炎症性腸疾患、乾癬（ｐｓｏｒｓａｓｉｓ）、サルコイドーシス、動脈硬化症および移植後に起こる疾患、子宮内膜症または慢性喘息、ならびに当業者によって容易に認識される他の状態などにおいて、疾患状態の悪化に寄与するまたは疾患状態を引き起こす新しい血管の成長が存在する場合に起こる。新しい血管は罹患した組織を養い、正常組織を破壊することができ、癌の場合は、新しい血管は、腫瘍細胞が循環中に漏れて他の器官中に滞在することを可能にする場合がある（腫瘍の転移）。

【０３０８】

また、ＡＡに基づいた抗血管形成治療は、移植片拒絶、肺炎症、ネフローゼ症候群、子癇前症、心膜炎に関連するものなどの心外膜液、および胸水、望ましくない血管透過性によって特徴づけられた疾患および障害、たとえば、脳腫瘍に関連する浮腫、悪性疾患に関連する腹水、メイグス症候群、肺炎症、ネフローゼ症候群、心外膜液、胸水、心筋梗塞および脳卒中後の状態などの心血管病に関連する透過性等の処置においても使用が見つかる場合がある。

【０３０９】

本明細書中に記載の抗血管形成ＡＡを用いて処置し得る他の血管形成依存性疾患には、血管線維腫（出血し易い異常な血管）、血管新生緑内障（眼中の血管の成長）、動静脈奇形（動脈と静脈との間の異常な連絡）、癒着不能骨折（治癒しない骨折）、アテローム硬化斑（動脈の硬化）、化膿性肉芽腫（血管からなる一般的な皮膚病変）、強皮症（結合組織病の一形態）、血管腫（血管からなる腫瘍）、トラコーマ（第三世界における盲目の主な原因）、血友病性関節、血管接着および肥大性瘢痕（異常な瘢痕形成）が含まれる。

【０３１０】

所望の治療効果を提供するために投与するＡＡの量は、上述のものなどのいくつかの要因に応じて変動する。一般に、癌治療のコンテキストでは、治療上有効な量のＡＡとは、適切な対照と比較した場合に、血管形成を阻害し、それにより、被験体において、たとえば、腫瘍量、アテローム性動脈硬化症を少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約５０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８５％、または少なくとも約９０％、腫瘍の完全根絶まで低下させることを促進するために有効な量である。実験動物系では、適切な対照は、薬剤で処置していない遺伝子が同一の動物であり得る。非実験系では、適切な対照は、薬剤を投与する前に存在する腫瘍量であり得る。他の適切な対照はプラセボ対照であり得る。

【０３１１】

腫瘍量が減少したかどうかは、それだけには限定されないが、固形腫瘍塊を測定すること、細胞学的アッセイを用いて腫瘍細胞の数を計数すること、蛍光活性化細胞分取（たとえば腫瘍関連抗原に特異的な抗体を使用）によって所定の腫瘍抗原を保有する細胞の数を決定すること、コンピュータによる断層撮影走査、磁気共鳴画像法、ならびに／または腫瘍の大きさを推定および／もしくは監視するための腫瘍のＸ線イメージングを行うこと、生体試料、たとえば血液または血清中の腫瘍関連抗原の量を測定することなどを含めた、任意の公知の方法を用いて決定することができる。

【０３１２】

一部の実施形態では、この方法は、適切な対照と比較した場合に、腫瘍の成長速度を少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約５０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８５％、または少なくとも約９０％、腫瘍の増殖の完全な阻害まで低下させるために有効である。したがって、これらの実施形態では、有効量のＡＡとは、適切な対照と比較した場合に、腫瘍増殖速度を少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約２５％、少なくとも約５０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８５％、または少なくとも約９０％、腫瘍増殖の完全な阻害まで低下させるために十分な量である。実験動物系では、適切な対照は、薬剤で処置していない遺伝子が同一の動物における腫瘍増殖速度であり得る。非実験系で

は、適切な対照は、薬剤を投与する前に存在する腫瘍量または腫瘍増殖速度であり得る。他の適切な対照はプラセボ対照であり得る。

【０３１３】

腫瘍の成長が阻害されたかどうかは、それだけには限定されないが、腫瘍増殖のｉｎ　ｖｉｖｏアッセイ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ増殖アッセイ、^{3}Ｈ－チミジン取り込みアッセイなどを含めた、任意の公知の方法を用いて決定することができる。

【０３１４】

（ｅ）抗炎症性治療におけるＡＡの使用

ＡＡがインターロイキンなどの炎症の媒介物質と結合するＡＢを含有する別の例示的な実施形態では、ＡＡは、関連する状態の処置において使用が見つかる。インターロイキン－結合ＡＡには、たとえばＩＬ１２と結合するＡＢおよびＩＬ２３と結合するＡＢを有する二重標的結合ＡＡ、または第１のＡＢがＩＬ１７と結合し、第２のＡＢがＩＬ２３と結合するＡＡが含まれることができる。したがって、そのような二重標的結合ＡＡは、炎症の媒介を提供するように、かつ炎症部位で共局在化する切断剤（たとえば、ＭＭＰまたは表３に提示したものなどの他の酵素などの酵素）によって活性化可能であるように設計することができる。

【０３１５】

ＡＡを使用する非治療的方法

また、ＡＡは診断および／またはイメージング方法で使用することもできる。たとえば、酵素的に切断可能なＣＭを有するＡＡは、ＣＭを切断することができる酵素の存在または非存在を検出するために使用することができる。そのようなＡＡには、酵素活性（または、一部の実施形態では、ジスルフィド結合の還元を提供できるものなどの増加した還元潜在性の環境）のｉｎ　ｖｉｖｏ検出（たとえば、定性的または定量的）が含まれることができる診断学で使用することができ、これには所定の宿主生物中の所定の組織中の活性化されたＡＡの測定された蓄積による目的の標的の存在が伴う。

【０３１６】

たとえば、ＣＭは、腫瘍の部位、ウイルスまたは細菌感染の部位、生物学的に閉鎖された部位（たとえば、膿瘍中、器官中など）等で見つかるプロテアーゼのプロテアーゼ基質であるように選択することができる。ＡＢは、標的抗原と結合するものであることができる。当業者が精通した方法を用いて、検出可能な標識（たとえば蛍光標識）をＡＡのＡＢまたは他の領域と結合体化させることができる。適切な検出可能な標識は上記スクリーニング方法のコンテキストで記述されており、さらなる具体的な例を以下に提供する。病状のタンパク質またはペプチドに特異的なＡＢを、活性が目的の疾患組織中で上昇しているプロテアーゼと共に使用して、ＡＡは、ＣＭに特異的な酵素が検出可能なレベルで存在しないまたは疾患組織よりも低いレベルで存在する組織と比較して、疾患組織との結合の速度が増加している。小さなタンパク質およびペプチドは腎臓の濾過系によって血液から迅速に除去され、また、ＣＭに特異的な酵素は検出可能なレベルで存在しない（または非罹患した組織中でより低いレベルで存在する）ため、罹患した組織中の活性化されたＡＡの蓄積は非疾患組織と比較して増強されている。

【０３１７】

別の例では、ＡＡは、試料中の切断剤の存在または非存在を検出するために使用することができる。たとえば、ＡＡが酵素による切断に感受性があるＣＭを含有する場合、ＡＡを用いて試料中の酵素の存在を（定性的または定量的に）検出することができる。別の例では、ＡＡが還元剤による切断に感受性があるＣＭを含有する場合、ＡＡを用いて試料中の還元条件の存在を（定性的または定量的に）検出することができる。これらの方法での分析を容易にするために、ＡＡを検出可能に標識することができ、支持体（たとえば、スライドまたはビーズなどの固体担体）と結合させることができる。検出可能な標識は、切断後に放出されるＡＡの一部分上に位置することができる。アッセイは、たとえば、固定した検出可能に標識したＡＡを、酵素および／または還元剤を含有することが疑われる試料と、切断が起こるために十分な時間の間接触させ、その後、洗浄して過剰の試料および

汚染物質を除去することによって実施できる。その後、試料中の切断剤（たとえば酵素または還元剤）の存在または非存在を、試料と接触させる前からのＡＡの検出可能なシグナルの変化によって評価する（たとえば、試料中の切断剤によるＡＡの切断、およびそのような切断の結果としての検出可能な標識が付着しているＡＡ断片の除去が原因の、検出可能なシグナルの低下。

【０３１８】

また、そのような検出方法は、ＡＡのＡＢと結合することができる標的の存在または非存在の検出を提供するようにも適応させることができる。したがって、ｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイは、切断剤の存在または非存在および目的の標的の存在または非存在を評価するために適応させることができる。切断剤の存在または非存在は、上述のようにＡＡの検出可能な標識の減少によって検出することができ、標的の存在または非存在は、たとえば検出可能に標識した抗標的抗体を使用することによって、標的－ＡＢの複合体の検出によって検出することができる。

【０３１９】

上述のように、本明細書中に開示するＡＡは検出可能な標識を含むことができる。一実施形態では、ＡＡは、診断剤として使用することができる検出可能な標識を含む。診断剤として使用することができる検出可能な標識の非限定的な例には、インジウムまたはテクネチウムなどの放射性同位元素を含有するイメージング剤、ＭＲＩおよび他の応用のための、ヨウ素、ガドリニウムまたは酸化鉄を含有する造影剤、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはβ－ガラクトシダーゼなどの酵素、ＧＦＰ、ユーロピウム誘導体などの蛍光物質およびフルオロフォア、Ｎ－メチルアクリジウム誘導体などの発光性物質等が含まれる。

【０３２０】

不安定プラークの破裂および続く血餅の形成が、心臓発作の大多数の原因であると考えられている。不安定プラークの有効な標的化により、破裂の可能性を低下させるために安定化治療剤を送達することが可能となる場合がある。

【０３２１】

ＶＣＡＭ－１は、アテローム性動脈硬化症易発性の領域および確立された病変の境界の両方でアップレギュレートされている。Ｉｉｙａｍａら（１９９９年）Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ａｍ Ｈｅａｒｔ Ａｓｓｏｃ．、８５巻：１９９～２０７頁。ＭＭＰ－１、ＭＭＰ－８およびＭＭＰ－１３などのコラゲナーゼはヒトアテロームにおいて過剰発現されており、これはアテローム性溶菌斑の破裂に寄与し得る。Ｆｒｉｃｋｅｒ，Ｊ．（２００２年）Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ Ｔｏｄａｙ、７巻（２号）：８６～８８頁。

【０３２２】

一例では、本明細書中に開示するＡＡは、アテローム硬化斑、たとえば不安定アテローム硬化斑を検出および／または標識するために設計された診断および／またはイメージング方法において使用が見つかる。アテローム硬化斑に関連するタンパク質を標的化することによって、そのような溶菌斑を検出および／または標識するためにＡＡを使用することができる。たとえば、抗ＶＣＡＭ－１ ＡＢおよび検出可能な標識を含むＡＡは、アテローム硬化斑を検出および／または標識するために設計された方法において使用が見つかる。これらのＡＡは、ＡｐｏＥマウスなどの動物モデルにおいて試験することができる。

【０３２３】

体内分布の考慮

本明細書中に記載の組成物の治療的潜在性は、改変したＡＢまたはＡＡのより高い体内分布およびバイオアベイラビリティを可能にする。本明細書中に記載の組成物はバイオアベイラビリティが向上した抗体治療剤を提供し、抗体治療剤と標的との結合の親和性は、罹患した組織よりも健康な組織で低い。ＭＭとカップリングしたＡＢを含む医薬組成物は、健康な組織よりも罹患した組織で高い、標的に対する親和性を表示することができる。好ましい実施形態では、罹患した組織中の親和性は、健康な組織中の親和性よりも５～１

０，０００，０００倍高い。
【０３２４】
概説すると、本開示は、バイオアベイラビリティが向上した抗体治療剤を提供し、第１の組織中での抗体治療剤とその標的との結合の親和性は、抗体治療剤と第２の組織中のその標的との結合よりも低い。例として、様々な実施形態では、第１の組織は健康な組織であり、第２の組織は罹患した組織であるか、または、第１の組織は早期腫瘍であり、第２の組織は末期腫瘍であるか、第１の組織は良性腫瘍であり、第２の組織は悪性腫瘍であり、第１の組織および第２の組織は空間的に分離されているか、または、具体例では、第１の組織は上皮組織であり、第２の組織は、乳房、頭部、頸部、肺、膵臓、神経系、肝臓、前立腺、泌尿生殖器、もしくは子宮頸部の組織である。
【実施例】
【０３２５】
（実施例１）
候補マスキング部分（ＭＭ）のスクリーニング
所望の最適な結合および解離の特徴を有するＭＭとカップリングした抗体およびその断片（ＡＢ）を含む組成物を生成するために、候補ＭＭのライブラリをスクリーニングする。様々な可変のアミノ酸配列、変動するシステインの位置、様々な長さなどを有するＭＭを作製する。候補ＭＭは、目的のＡＢとの結合の親和性について試験する。好ましくは、ＡＢの結合パートナーのネイティブアミノ酸配列を含有しないＭＭを改変抗体の構築に選択する。
【０３２６】
約１～１０ｎＭの親和性を有するＭＭを選択するために、目的のＡＢのＭＭの親和性成熟を実施する。
【０３２７】
（実施例２）
改変抗体および活性化可能な抗体（ＡＡ）のライブラリのスクリーニング
所望の切替特徴（すなわち、マスキングされたおよび／または切断されたコンホメーションでの標的結合と比較して、マスキングされたおよび／または切断されていないコンホメーションでの標的結合が減少している）を有する改変抗体およびＡＡを同定するために、マスキング部分（ＭＭ）中の様々な可変のアミノ酸配列、ＭＭ中の変動するシステインの位置、様々なリンカー長さ、および親ＡＢとの様々な付着点を有する候補改変抗体および候補ＡＡのライブラリを作製する。
【０３２８】
切替可能な表現型を表示する候補ＡＡを同定するための、スクリーニング／分別の方法のスキームをここで提供する。発現ベクターを介してライブラリを導入し、その結果、細菌細胞の表面上にＡＡの表示がもたらされる。培養によってライブラリを拡大した後、ＡＡポリペプチドを表示する細胞を適切な酵素または還元剤で処理して、ＣＭの切断または還元を提供する。その後、処理した細胞を蛍光標識した標的と接触させ、細胞をＦＡＣＳによって分別して、切断／還元後に標的と結合するＡＡを表示する細胞を単離する。その後、標的結合構築体を表示する細胞を、培養で成長させることによって拡大する。その後、細胞を標識した標的と接触させ、ＦＡＣＳによって分別して、酵素／還元剤の非存在下で標識した標的と結合しないＡＡを表示する細胞を単離する。これらのステップがスクリーニング手順の１サイクルを表す。その後、培養で成長させることによる拡大によって細胞を追加のサイクルに供し、培養物をスクリーニングステップの全体または一部にさらに供することができる。
【０３２９】
また、ライブラリのスクリーニングおよび分別は、酵素／還元剤処理の非存在下で標識した標的と結合しない（すなわち、切断／還元されていない場合に標的と結合しない）候補を最初に選択することによって開始することもできる。
【０３３０】

（実施例３）
ＭＭのマスキング効率を決定するための改変抗体のｉｎ　ｖｉｔｒｏスクリーニング
マスキングされた際に最適な特徴を示す、たとえば、マスキングされた状態で標的の存在下にある場合に１０％の標的との結合しか示さない改変抗体およびＡＡをスクリーニングするために、異なるＭＭカップリングしたＡＢ、または同じＭＭと異なる付着点でカップリングしたＡＢ、または異なる長さおよび／または配列のリンカーを介して同じＭＭとカップリングしたＡＢを作製した。
【０３３１】
ＭＭのマスキング効率は、ＡＢに対するＭＭの親和性およびＡＢとその標的との結合の妨害に対するＭＭの空間的な関係性によって決定することができる。有効なＭＭの発見は、親和性および任意選択でマスキング効率の経験的尺度に基づく。改変抗体またはＡＡ中のＭＭの時間依存性の標的置換は、ＭＭについて最適化および選択するために測定することができる。免疫吸着標的置換アッセイ（ＴＤＡ）は、効率的にマスキングされた抗体の発見および妥当性確認のために本明細書中に記載されている。
【０３３２】
ＴＤＡアッセイでは、治療上関連性のある濃度および時間における、ＡＢとその標的との結合を阻害するＭＭの能力を測定する。このアッセイにより、ＭＭの時間依存性の標的置換が可能となる。
【０３３３】
手短に述べると、抗体標的を、ＥＬＩＳＡプレートのウェルに、終夜、約４℃で吸着させる。約１５０μｌのＰＢＳ中の２％の無脂肪粉乳（ＮＦＤＭ）、約０．５％（ｖ／ｖ）のＴｗｅｅｎ２０（ＰＢＳＴ）を加えることによってプレートを遮断し、室温で約１時間インキュベーションする。その後、プレートをＰＢＳＴで約３回洗浄する。約５０μｌのｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋを加え（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、プロテアーゼ阻害剤（Ｃｏｍｐｌｅｔｅ、Ｒｏｃｈｅ）を添加する。約５０μｌのＭＭとカップリングしたＡＢを、プロテアーゼ阻害剤（Ｃｏｍｐｌｅｔｅ、Ｒｏｃｈ）を含むｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋに溶かし、約３７℃で様々な一定期間の間インキュベーションする。プレートをＰＢＳＴで約３回洗浄する。約１００ｍｌの抗ｈｕＩｇＧ－ＨＲＰを約２％のＮＦＤＭ／ＰＢＳＴ中で加え、室温で約１時間インキュベーションする。プレートをＰＢＳＴで約４回、ＰＢＳで約２回洗浄する。アッセイは、ＴＭＢ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、製造者の指示に従って展開する。
【０３３４】
（実施例４）
ＡＢとしてｓｃＦｖを含むＡＡ
抗Ｊａｇｇｅｄ１　ｓｃＦｖを含むＡＡの例を本明細書中に記載する。これらのＡＡは、付着したＭＭが原因で、正常な条件下では不活性である（マスキングされている）。しかし、ｓｃＦｖが疾患部位に達した際、ＡＤＡＭ１７などの疾患に特異的な酵素がペプチド阻害剤をｓｃＦｖと接続している基質リンカーを切断して、それがＪａｇｇｅｄ１と結合することが可能となる。細菌細胞表面ディスプレイを使用して抗Ｊａｇｇｅｄ１　ｓｃＦｖの適切なＭＭを見つける。この例では、選択されたＭＭを、プロテアーゼで活性化した後に標的化結合に適格となるｓｃＦｖ構築体を作製するためのトリガーとして使用する酵素基質と合わせる。
【０３３５】
プロテアーゼで活性化される抗体の構築
Ｊａｇｇｅｄ１抗体を単鎖形態で含むＡＡをコードしている遺伝子を重複伸長ＰＣＲまたは全遺伝子合成によって生成し、同様に消化した発現プラスミドまたは当業者が精通した任意の他の適切な細菌、酵母、もしくは哺乳動物発現ベクター内にライゲーションする。あるいは、半減期延長部分（たとえば、ＩｇＧのＦｃ領域、血清アルブミン、またはトランスフェリン）を組み込んだ市販の発現ベクターおよび当業者が精通した方法を用いて完全長抗体を生成することができる。その後、発現プラスミドを、Ｅ．ｃｏｌｉのＢＬ２

１またはＨＥＫ２９３ｔ細胞などの適切な発現宿主内に形質転換またはトランスフェクトする。単鎖抗体を、ペリプラズム画分抽出キット（Ｐｉｅｒｃｅ）を用いて終夜培養物から収集し、固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって精製する。

【０３３６】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏの抗体の切替活性のアッセイ

１ｐＭ～１μＭの濃度のプロテアーゼで活性化される抗体のアリコートを、緩衝水溶液中、別々に０および５０ｎＭの酵素と共に３時間インキュベーションする。その後、反応混合物を、固定した抗原Ｊａｇｇｅｄ１を用いたＥＬＩＳＡまたは表面プラズモン共鳴を使用して、結合についてアッセイする。プロテアーゼ処理後のＡＡの結合活性の増加は、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）ＳＰＲ機器を使用した際の共鳴単位の増加によって示される。その後、切断の結果としての見かけの解離定数（K_d）の変化を、機器の製造者の指示（ＢＩＡｃｏｒｅ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に従って計算することができる。

【０３３７】

（実施例５）

抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　ＡＢのクローニング

本実施例および以下の実施例において、マスキングされたＭＭＰ－９で切断可能な抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖを含有するＡＡ（標的＝ＶＥＧＦ、ＡＢ＝抗ＶＥＧＦ単鎖Ｆｖ）を構築した。そのようなＡＡを生成する第１のステップとして、抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖを含有する構築体を作製した（ＡＢ）。抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　ＡＢ（V_L－リンカーＬ－V_H）は、ラニビズマブの公開された配列（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ、Ｃｈｅｎ，　Ｙ．、Ｗｉｅｓｍａｎｎ，　Ｃ、Ｆｕｈ，　Ｇ．、Ｌｉ，　Ｂ．、Ｃｈｒｉｓｔｉｎｇｅｒ，　Ｈ．、ＭｃＫａｙ，　Ｐ．、ｄｅ　Ｖｏｓ，　Ａ．　Ｍ．、Ｌｏｗｍａｎ，　Ｈ．　Ｂ．（１９９９年）Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　ａｎ　Ｏｐｔｉｍｉｚｅｄ　Ａｎｔｉ－ＶＥＧＦ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ：　Ｃｒｙｓｔａｌ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ｏｆ　ａｎ　Ａｆｆｉｎｉｔｙ－ｍａｔｕｒｅｄ　Ｆａｂ　ｉｎ　Ｃｏｍｐｌｅｘ　ｗｉｔｈ　Ａｎｔｉｇｅｎ、Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．、２９３巻、８６５～８８１頁）から設計し、Ｃｏｄｏｎ　Ｄｅｖｉｃｅｓ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）によって合成した。

【０３３８】

ラニビズマブは、ベバシズマブと同じ親ネズミ抗体に由来するモノクローナル抗体Ｆａｂ断片である（Ｐｒｅｓｔａ　ＬＧ、Ｃｈｅｎ　Ｈ、Ｏ’Ｃｏｎｎｏｒ　ＳＪら、Ｈｕｍａｎｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　ａｎ　ａｎｔｉ－ｖａｓｃｕｌａｒ　ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ　ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｔｈｅｒａｐｙ　ｏｆ　ｓｏｌｉｄ　ｔｕｍｏｒｓ　ａｎｄ　ｏｔｈｅｒ　ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ．、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ、５７巻：４５９３～９頁、１９９７年）。これは親分子よりも小さく、ＶＥＧＦ－Ａとより強力な結合を提供するために親和性成熟されている。ラニビズマブは血管内皮成長因子Ａ（ＶＥＧＦ－Ａ）のすべてのサブタイプと結合し、それを阻害する。Ｎ末端のＨｉｓ６タグおよびＴＥＶプロテアーゼ切断部位を設計中に含めた。ＴＥＶプロテアーゼは、タバコエッチウイルスから単離されたプロテアーゼであり、非常に特異的であり、精製後に融合タンパク質を分離するために使用する。抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を以下の表７および８に提供する。

【０３３９】

【表７】

表7:抗VEGF scFv ABのヌクレオチド配列

gatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatcacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaatt ggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcattccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtgg taccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagcaatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcac caaagtggagattaagggggggtggaggcagcgggggaggtggctcaggcggtggagggtctggcgaggtccagctggtagaaagcgggggcgg actggtccaaccgggcggatccctgcgtctgagctgcgcggcctcgggttacgactttactcactacggaatgaactgggttcgccaagccccctggtaaa ggtctggaatgggtcggatggattaatacatacactggagaacctacttatgctgctgatttcaaacgtcgctttactttctctctggatacaagtaagtcaac cgcctatctgcaaatgaacagcctgcgtgcagaggacacggctgtgtactattgtgcgaaatatccttattattatggaacttcccactggtatttcgatgtat ggggccagggtactctggttacagtgtcg

【０３４０】

【表８】

表8:抗VEGF scFv ABのアミノ酸配列

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVTVS

（実施例６）

抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖのＭＭのスクリーニングおよび同定

ラニビズマブを用いて、X_{15}（８．３×１０^{9}）、$X_4CX_7CX_4$（３．６×１０^{9}）、または$X_{12}CX_3$（１．１×１０^{9}）であるペプチド［式中、Ｘは任意のアミノ酸であり、数字はライブラリの多様性の合計を表す］からなるプールしたランダムペプチドライブラリをスクリーニングした。プールしたライブラリの多様性の合計は１．３×１０^{10}であった。スクリーニングは、１ラウンドのＭＡＣＳおよび２ラウンドのＦＡＣＳ分別からなっていた。第１ラウンドのＭＡＣＳスクリーニングでは、１×１０^{11}個の細胞を１５０ｎＭのビオチン標識したラニビズマブでプロービングし、５．５×１０^{7}個の結合細胞が単離された。第１のＦＡＣＳスクリーニングでは、ＭＡＣＳスクリーニングで単離された陽性細胞を、５００ｎＭのビオチン標識したラニビズマブでプロービングし、ｎｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ－ＰＥ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ、Ｅｕｇｅｎｅ、ＯＲ）で可視化した。第２および第３ラウンドのＦＡＣＳ選択は、５００ｎＭ、その後１００ｎＭのＡｌｅｘａで標識したラニビズマブを用いて、２０ｕＭのＩｇＧの存在下で行った。個々のクローンを配列決定し、続いて、ＦＡＣＳ分析によって抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖと結合するその能力を確認した。抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖのＭＭのアミノ酸配列を以下の表９に提供する。（これらの配列は、本明細書中以降、２８３ＭＭ、２９２ＭＭ、３０６ＭＭなどと呼ぶ）

【０３４１】

【表９】

表9:抗VEGF scFvのMM

JS283	ATAVWNSMVKQSCYMQG
JS292	GHGMCYTILEDHCDRVR
JS306	PCSEWQSMVQPRCYYGG
JS308	NVECCQNYNLWNCCGGR
JS311	VHAWEQLVIQELYHC
JS313	GVGLCYTILEQWCEMGR
JS314	RPPCCRDYSILECCKSD
JS315	GAMACYNIFEYWCSAMK

（実施例７）

ＡＡ：ＭＭＰ－９で切断可能なマスキングされた抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖベクターの構築

ＣＭ（ＭＭＰ－９の基質）をマスキングされた抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ構築体と融合して、切断可能なマスキングされたＡＡを提供した。例示的な構築体を図４に提供する。様々なＣＭを含有するいくつかの例示的なＡＡ構築体および配列を以下に詳述する。例示的な構築体の構築に利用したプライマーを以下の表１０に示す。

【０３４２】

【表１０】

表10:MMP－9で切断可能なマスキングされた－抗VEGF scFvの構築に利用したプライマー

CX0233 5’gaattcatgggccatcaccatcaccatcacggtgggg3’
CX0249 5’gtgagtaagcttttattacgacactgtaaccagagtaccctgg3’
CX0270 5’gtggcatgtgcacttggccaccttggcccactcgagctggccagactggccctgaaaatacagattttccc3’
CX0271 5’gagtgggccaaggtggccaagtgcacatgccactgggcttcctgggtccgggcggttctgatattcaactgacccagagcc3’
CX0288 5’ ttcgagctcgaacaacaacaacaataacaataacaacaac3’
CX0289 5’ gctttcaccgcaggtacttccgtagctggccagtctggcc3’
CX0290 5’ cgctccatgggccaccttggccgctgccaccagaaccgcc3’
CX0308 5’ gcccagccggccatggccggccagtctggccagctcgagt3’
CX0310 5’ ccagtgccaagcttttagtggtgatggtgatgatgcgacactgtaaccagagtaccctggcc3’
CX0312 5’cttgtcacgaattcgggccagtctggccagctcgagt3’
CXO314 5’cagatctaaccatggcgccgctaccgcccgacactgtaaccagagtaccctg3’

ＭＢＰ融合体としてのＡＡ：ＭＭＰ－９で切断可能なマスキングされた抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖのクローニングおよび発現

クローニング：ＭＢＰ：抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　ＡＢの融合体をクローニングした。ＭＢＰ（マルトース結合タンパク質）は、融合タンパク質としてＥ．ｃｏｌｉ中で良好に発現され、融合タンパク質を作製するための当分野で周知の方法であるマルトースカラム上で精製することができる。本実施例では、ＭＢＰを用いてマスキングされたｓｃＦｖを分離した。Ｈｉｓ６タグ付けした抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　ＡＢを、ｐＭａｌ－ｃ４ｘベクター（ＮＥＢ）内に、ＭＢＰとのＣ末端融合体として、複数クローニング部位（ＭＣＳ）中のＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩ制限部位を用いてクローニングした。プライマーＣＸ０２３３およびＣＸ０２４９（表１０）を使用して、抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　ＡＢを増幅し、ＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩ部位をそれぞれ導入した。

【０３４３】

ＡＡ（ペプチドＭＭ、抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　ＡＢおよびＭＭＰ－９ＣＭ）の受容ベクターを、重複するプライマーＣＸ０２７１およびＣＸ０２７０を用いたポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して合成し、これにより、ペプチドＭＭ、リンカー配列、およびＭＭＰ－９ＣＭプロテアーゼ部位のクローニング部位がＴＥＶプロテアーゼ部位と抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　ＡＢとの間に配置された。プライマーＣＸ０２７１およびＣＸ０２４９（表１０）を用いて構築体のＣ末端部分を増幅し、一方で、プライマーＣＸ０２７０およびＣＸ０２８８（表１０）を用いてＮ末端部分を増幅した。上記反応の両方からの生成物を合わせ、外部プライマーＣＸ０２４９およびＣＸ０２８８（表１０）を用いた最終ＰＣＲ反応を行い、ＳａｃＩおよびＨｉｎｄＩＩＩ制限部位を用いてＭＢＰ融合体としてｐＭａｌベクター内にクローニングした。

【０３４４】

【表１１】

表11:MBP／MM受容部位／MMP－9CM／抗VEGF scFv AB ベクターのヌクレオチド配列

atgggccatcaccatcaccatcacggtggggaaaatctgtattttcagggccagtctggccagctcgagtgggccaaggtggccaagtgcacatgccac tgggcttcctgggtccgggcggttctgatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatcacttgctcggcca gccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcattccggcgtaccg tcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagcaatattcgaccgt gccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaaggggggtggaggcagcgggggaggtggctcaggcggtggagggtctggcgaggtc cagctggtagaaagcgggggcggactggtccaaccgggcggatccctgcgtctgagctgcgcggcctcgggttacgactttactcactacggaatgaac ctgggttcgccaagcccctggtaaaggtctggaatgggtcggatggattaatacatacactggagaacctacttatgctgctgatttcaaacgtcgctttact ttctctctggatacaagtaagtcaaccgcctatctgcaaatgaacagcctgcgtgcagaggacacggctgtgtactattgtgcgaaatatccttattattatgg aacttcccactggtatttcgatgtatgggggccagggtactctggttacagtgtcg

３０６ＭＭおよび３１４ＭＭ（表９）を、プライマーＣＸ０２８９およびＣＸ０２９０（表１０）を用いてｅｃｐＸディスプレイベクターから増幅し、ＳｆｉＩ制限部位を用いてＮ末端がマスキングされたベクター内に指向的にクローニングした。対応するヌクレオチドおよびアミノ酸配列を以下の表１２に提供する。

【０３４５】

【表１２】

表12:306または314MM／MMP－9CM／抗VEGF scFv ABの配列

MBP / 306 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv ABのヌクレオチド配列
atgggccatcaccatcaccatcacggtggggaaaatctgtattttcagggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgtt gctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagtgcacatgccactgggcttcctgggtccgggcggttctgatattcaactgaccca gagccccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatcacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagcc aggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcattccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctga ctatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagcaatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagg ggggtggaggcagcgggggaggtggctcaggcggtggagggtctggcgaggtccagctggtagaaagcgggggcggactggtccaaccgggcg gatccctgcgtctgagctgcgcggcctcgggttacgactttactcactacggaatgaactgggttcgccaagcccctggtaaaggtctggaatgggtcgg atggattaatacatacactggagaacctacttatgctgctgatttcaaacgtcgctttacttttctctctggatacaagtaagtcaaccgcctatctgcaaatgaa cagcctgcgtgcagaggacacggctgtgtactattgtgcgaaatatccttattattatggaacttcccactggtatttcgatgtatggggccagggtactctg gttacagtgtcg
MBP / 306 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv ABのアミノ酸配列
MGHHHHHHGGENLYFQGQSGQPCSEWQSMVQPRCYYGGGSGGSGQGGQVHMPLGFLGPGG SDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGG GGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTG EPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQG TLVTVS
MBP / 314 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv ABのヌクレオチド配列
atgggccatcaccatcaccatcacggtggggaaaatctgtattttcagggccagtctggccagcggccgccgtgttgccgtgattatagtattttggagtgc tgtaagagtgatggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagtgcacatgccactgggcttcctgggtccgggcggttctgatattcaactgaccc agagccccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatcacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagc caggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcattccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctg actatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagcaatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaag gggggtggaggcagcgggggaggtggctcaggcggtggagggtctggcgaggtccagctggtagaaagcgggggcggactggtccaaccgggc ggatccctgcgtctgagctgcgcggcctcgggttacgactttactcactacggaatgaactgggttcgccaagcccctggtaaaggtctggaatgggtcg gatggattaatacatacactggagaacctacttatgctgctgatttcaaacgtcgctttacttttctctctggatacaagtaagtcaaccgcctatctgcaaatga acagcctgcgtgcagaggacacggctgtgtactattgtgcgaaatatccttattattatggaacttcccactggtatttcgatgtatggggccagggtactct ggttacagtgtcg
MBP / 314 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv ABのアミノ酸配列
MGHHHHHHGGENLYFQGQSGQRPPCCRDYSILECCKSDGGSGGSGQGGQVHMPLGFLGPG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSG GGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYT GEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQ GTLVTVS

発現：ＭＢＰ：ＡＡの融合体の発現をＥ．ｃｏｌｉのＫ１２　ＴＢ１株中で実施した。所望の構築体を含有するアンピシリン耐性コロニーを用いて、５０μｇ／ｍＬのアンピシリンを添加したＬＢ培地を含有する５ｍｌの終夜培養液に接種した。終夜培養液全体を用いて、５００ｍＬの、５０μｇ／ｍＬのアンピシリンおよび０．２％のグルコースを添加した新鮮なＬＢ培地に接種し、３７℃、２５０ｒｍｐの振盪で、Ｏ．Ｄ．０．５に達するまで成長させた。その後、イソプロピルチオ－β－Ｄ－ガラクトシダーゼを最終濃度０．３ｍＭまで加え、培養物をさらに３時間、同じ条件下で成長させ、その後、３０００×ｇの遠心分離によって細胞を収集した。標準の方法を用いて封入体を精製した。手短に述べると、１０ｍｌのＢＰＥＲ　ＩＩ細胞溶解試薬（Ｐｉｅｒｃｅ）。不溶性物質を１４，０００×ｇの遠心分離によって収集し、可溶性タンパク質を廃棄した。不溶性物質を、１ｍｇ／ｍＬのリゾチームを添加した５ｍｌのＢＰＥＲ　ＩＩに再懸濁させ、氷上で１０分間インキュベーションし、その後、水で１：２０に希釈した５ｍｌのＢＰＥＲ　ＩＩを加え、試料を１４，０００×ｇで遠心した。上清を除去し、ペレットを１：２０のＢＰＥＲＩＩで２回洗浄した。精製した封入体をＰＢＳ、８Ｍの尿素、１０ｍＭのＢＭＥ、ｐＨ７．４に溶かした。

【０３４６】
ＭＢＰ融合タンパク質を約１ｍｇ／ｍＬの濃度まで希釈し、ＰＢＳ、ｐＨ７．４中、８～０Ｍの尿素、６、４、２、０．５、および０Ｍの尿素での段階的な透析を用いて再折り畳みさせた。４、２、および０．５Ｍの尿素の段階で、０．２Ｍのアルギニン、２ｍＭの還元グルタチオン、および０．５ｍＭの酸化グルタチオンを加えた。０Ｍの尿素の透析には０．２Ｍのアルギニンを含めた。尿素を除去した後、タンパク質を０．０５Ｍのアルギニンに対して透析し、次いでＰＢＳ、ｐＨ７．４に対して大量透析した。すべての透析は４℃、終夜で実施した。凝集体を除去するために、それぞれのタンパク質をｓｅｐｈａｃｒｙｌ　Ｓ－２００カラム上のサイズ排除クロマトグラフィーに供した。正しく折り畳まれたタンパク質を含有する画分を、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ遠心フィルターを用いて濃縮した。

【０３４７】
ＡＡ：ＭＭＰ－９で切断可能なマスキングされた抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　ＣＨｉｓタグのクローニングおよび発現
クローニング：プライマーＣＸ０３０８およびＣＸ０３１０（表１０）を使用して、（ＭＭ受容部位／ＭＭＰ－９ＣＭ／ＶＥＧＦｓｃＦｖ　ＡＢ）ベクターを増幅し、そのそれぞれＮｃｏＩ制限部位を５’末端に付加し、ＨｉｎｄＩＩＩ制限部位およびＨｉｓ６タグを３’末端に付加し、続いてこれを、ｐｅｌＢシグナルペプチドを含有するベクター内にクローニングした。既に記載のように抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　ＭＭをクローニングした。対応するヌクレオチドおよびアミノ酸配列を表１３に提供する。

【０３４８】

【表１３】

表13:306または314MM／MMP－9CM／抗VEGF scFv CHis ABの配列

306 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv CHis ABのヌクレオチド配列
ggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgttgctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagt gcacatgccactgggcttcctgggtccgggcggttctgatattcaactgacccagagccccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatca cttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcatt ccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagca atattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagggggtggaggcagcgggggaggtggctcaggcggtggagggt ctggcgaggtccagctggtagaaagcgggggcggactggtccaaccgggcggatccctgcgtctgagctgcgcggcctcgggttacgactttactcac tacggaatgaactgggttcgccaagccccctggtaaaggtctggaatgggtcggatggattaatacatacactggagaacctacttatgctgctgatttcaaa cgtcgctttactttctctctggatacaagtaagtcaaccgcctatctgcaaatgaacagcctgcgtgcagaggacacggctgtgtactattgtgcgaaatatc cttattattatggaacttcccactggtatttcgatgtatggggccagggtactctggttacagtgtcgcatcatcaccatcaccac
306 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv CHis ABのアミノ酸配列
GQSGQPCSEWQSMVQPRCYYGGGSGGSGQGGQVHMPLGFLGPGGSDIQLTQSPSSLSASV GDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSL DTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVTVSHHHHHH
314 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv CHis ABのヌクレオチド配列
ggccagtctggccagcggccgccgtgttgccgtgattatagtattttggagtgctgtaagagtgatggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaa gtgcacatgccactgggcttcctgggtccgggcggttctgatattcaactgacccagagccccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgat cacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgc attccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcag caatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagggggtggaggcagcgggggaggtggctcaggcggtggagg gtctggcgaggtccagctggtagaaagcgggggcggactggtccaaccgggcggatccctgcgtctgagctgcgcggcctcgggttacgactttactc actacggaatgaactgggttcgccaagccccctggtaaaggtctggaatgggtcggatggattaatacatacactggagaacctacttatgctgctgatttca acgtcgctttactttctctctggatacaagtaagtcaaccgcctatctgcaaatgaacagcctgcgtgcagaggacacggctgtgtactattgtgcgaaata tccttattattatggaacttcccactggtatttcgatgtatggggccagggtactctggttacagtgtcgcatcatcaccatcaccactaa
314 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv CHis ABのアミノ酸配列
GQSGQRPPCCRDYSILECCKSDGGSGGSGQGGQVHMPLGFLGPGGSDIQLTQSPSSLSAS VGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFS LDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVTVSHHHHHH

発現：抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　Ｈｉｓ　ＡＡの発現をＥ．ｃｏｌｉのＫ１２　ＴＢ１株中で実施した。所望の構築体を含有するアンピシリン耐性コロニーを用いて、５０μｇ／ｍＬのアンピシリンを添加したＬＢ培地を含有する５ｍｌの終夜培養液に接種した。２．５ｍｌの終夜培養液を用いて、２５０ｍＬの、５０μｇ／ｍＬのアンピシリンおよび０．２％のグルコースを添加した新鮮なＬＢ培地に接種し、３７℃、２５０ｒｍｐの振盪で、Ｏ．Ｄ．１．０に達するまで成長させた。その後、イソプロピルチオ－β－Ｄ－ガラクトシダーゼ（ｇａｌａｃｔｏｓｉｄａｓ）を最終濃度０．３ｍＭまで加え、培養物をさらに５時間、３０℃で成長させ、その後、３０００×ｇの遠心分離によって細胞を収集した。リゾチーム／浸透圧ショック方法を用いてペリプラズム画分をすぐに精製した。手短に述べると、細胞ペレットを３ｍＬの５０ｍＭのトリス、２００ｍＭのＮａＣｌ、１０ｍＭのＥＤＴＡ、２０％のスクロース、ｐＨ７．４に再懸濁させ、２ｕＬ／ｍＬのすぐ使用できるリゾチーム溶液を加えた。１５分間氷上でインキュベーションした後、１．５倍体積の水（４．５ｍＬ）を加え、細胞を氷上でさらに１５分間インキュベーションした。可溶性ペリプラズム画分を１４，０００×ｇの遠心分離によって回収した。

【０３４９】

Ｎｉ－ＮＴＡ樹脂を用いて抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　Ｈｉｓタンパク質を部分精製した。粗ペリプラズム抽出物を０．５ｍｌのＮｉ－ＮＴＡ樹脂上に載せ、５０ｍＭのホスフェート、３００ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４で洗浄した。Ｈｉｓタグ付けしたタンパク質を５

０ｍＭのホスフェート、３００ｍＭのＮａＣｌ、２００ｍＭのイミダゾール（Ｉｍｉｄｉｚａｌｅ）、ｐＨ６．０で溶出させた。タンパク質を約６００μＬまで濃縮し、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ遠心濃縮器を用いて緩衝液をＰＢＳに交換した。

【０３５０】

ヒトＦｃ融合体としてのＡＡ：ＭＭＰ－９で切断可能なマスキングされた抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖのクローニングおよび発現

クローニング：プライマーＣＸ０３１２およびＣＸ０３１４（表１０）を用いて、ＭＭＰ－９ＣＭ／抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖをコードしている配列を増幅した。このプライマーには、５’ＥｃｏＲＩ制限部位および３’ＮｃｏＩ制限部位の配列ならびにリンカー配列も含まれていた。ＰＣＲ増幅した配列をＥｃｏＲＩおよびＮｃｏＩで切断し、続いてｐＦＵＳＥ－ｈＩｇＧ１－Ｆｃ２ベクター内にクローニングすることで、Ｆｃ融合タンパク質を発現させるためのベクターが生じた。既に記載のように抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　ＡＢ　ＭＭをこれらのベクター内に挿入した。３０６ＭＭ、３１３ＭＭ、３１４ＭＭ、３１５ＭＭ、非結合ＭＭ（１００ＭＭ）を含有する、およびＭＭを含有しない構築体を構築し、配列を確認した。対応するヌクレオチドおよびアミノ酸配列を以下の表１４に提供する。

【０３５１】

【表１４】

表14:306MM／MMP－9CM／抗VEGF scFv－Fc ABの配列

306 MM / MMP-9 CM /抗VEGF scFv－Fc ABのヌクレオチド配列

ggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgttgctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagtg
cacatgccactgggcttcctgggtccgggcggttctgatattcaactgaccccagagccccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatcacttt
gctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcattccg
gcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagcaatatt
cgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagggggtggaggcagcgggggaggtggctcaggcggtggagggtctggc
gaggtccagctggtagaaagcgggggcggactggtccaaccgggcggatccctgcgtctgagctgcgcggcctcgggttacgactttactcactacgg
aatgaactgggttcgccaagccccctggtaaaggtctggaatgggtcggatggattaatacatacactggagaacctacttatgctgctgatttcaaacgtcg
ctttacttttctctctggatacaagtaagtcaaccgcctatctgcaaatgaacagcctgcgtgcagaggacacggctgtgtactattgtgcgaaatatccttatta
ttatggaacttcccactggtatttcgatgtatggggccagggtactctggttacagtgtcgggcggtagcggcgccatggttagatctgacaaaactcacac
atgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgag
gtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagcc
gcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtct
ccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggga
ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggag
aacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaa
cgtcttctcatgctccgtgatgcatgagggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

306 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv－Fc ABのアミノ酸配列

GQSGQPCSEWQSMVQPRCYYGGGSGGSGQGGQVHMPLGFLGPGGSDIQLTQSPSSLSASV
GDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESGGGLV
QPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSL
DTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVTVSGGSGAMVRSD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK

314 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv－Fc ABのヌクレオチド配列

ggccagtctggccagcggccgccgtgttgccgtgattatagtattttggagtgctgtaagagtgatggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaag
tgcacatgccactgggcttcctgggtccgggcggttctgatattcaactgaccccagagccccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatca
cttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcattc
cggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagcaat
attcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagggggtggaggcagcgggggaggtggctcaggcggtggagggtctg
gcgaggtccagctggtagaaagcgggggcggactggtccaaccgggcggatccctgcgtctgagctgcgcggcctcgggttacgactttactcactac
ggaatgaactgggttcgccaagccccctggtaaaggtctggaatgggtcggatggattaatacatacactggagaacctacttatgctgctgatttcaaacgt
cgctttacttttctctctggatacaagtaagtcaaccgcctatctgcaaatgaacagcctgcgtgcagaggacacggctgtgtactattgtgcgaaatatccttа
ttattatggaacttcccactggtatttcgatgtatggggccagggtactctggttacagtgtcgggcggtagcggcgccatggttagatctgacaaaactcac
acatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctg
aggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag
ccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggt
ctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgg
gaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccgg
agaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

306 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv－Fc ABのアミノ酸配列

GQSGQRPPCCRDYSILECCKSDGGSGGSGQGGQVHMPLGFLGPGGSDIQLTQSPSSLSAS
VGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESGGGL
VQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFS
LDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVTVSGGSGAMVRS
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK

発現：１０μｇの３０６ＭＭ／ＭＭＰ－９ＣＭ／抗ＶＥＧＦｓｃＦｖ－Ｆｃ、３１４Ｍ

Ｍ／ＭＭＰ－９ＣＭ／抗ＶＥＧＦｓｃＦｖ－Ｆｃまたは抗ＶＥＧＦｓｃＦｖ－Ｆｃの発現ベクターを、ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＣＡ）を製造者のプロトコルに従って使用したトランスフェクションによって、10^7個のＨＥＫ－２９３　ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ＣＡ）内に導入した。トランスフェクトした細胞をさらに７２時間インキュベーションした。インキュベーション後、馴化培地を収集し、遠心分離によって細胞および細片を除去した。馴化培地をＥＬＩＳＡによって活性についてアッセイした。

【０３５２】

（実施例８）

マスキングされたＭＭＰ－９で切断可能なＡＡの活性化の測定

マスキングされたＭＭＰ－９で切断可能な抗ＶＥＧＦ　ＡＡの、ＭＭＰ－９による活性化を測定するために、１００ｕｌの２μｇ／ｍｌのＶＥＧＦのＰＢＳ溶液をマイクロウェル（９６ウェルＥａｓｙ　Ｗａｓｈ、Ｃｏｒｎｉｎｇ）に加え、終夜、４℃でインキュベーションした。その後、ウェルを３×１５分間、３００ｕＬのＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋ（Ｐｉｅｒｃｅ）で遮断した。その後、１００マイクロリットルのＭＭＰ－９で処理したまたは処理していないＡＡ（それぞれの構築体に関する詳細には以下を参照）を、ＰＢＳＴ、１０％のＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋ中でウェルに加え、室温（ＲＴ）で１時間インキュベーションした。すべての洗浄ステップを３回行い、３００ｕｌのＰＢＳＴを用いて行った。その後、１００マイクロリットルの二次検出試薬を加え、ＲＴで１時間インキュベーションした。ＨＲＰの検出は、１００ｕｌのＴＭＢ　ｏｎｅ（Ｐｉｅｒｃｅ）溶液を用いて完了した。反応を１００μＬの１ＮのＨＣＬで停止させ、吸光度を４５０ｎＭで測定した。

【０３５３】

ＭＢＰ／ＭＭ／ＭＭＰ－９ＣＭ／抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　ＡＢを含有するＡＡ構築体のＥＬＩＳＡアッセイ

２００マイクロリットルの、ＭＭＰ－９消化緩衝液（５０ｍＭのトリス、２ｍＭの$CaCl_2$、２０ｍＭのＮａＣｌ、１００μＭの$ZnCl_2$、ｐＨ６．８）中の２００ｎＭの濃度のビオチン標識したＡＡを、２０ＵのＴＥＶプロテアーゼを用いて終夜、４℃で消化して、ＭＢＰ融合パートナーを除去した。その後、試料を３時間、約３ＵのＭＭＰ－９を用いてまたは用いずに３７℃でインキュベーションし、ＰＢＳＴ、１０％のＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋ中に最終濃度１００ｎＭまで１：１に希釈し、ＥＬＩＳＡウェルに加えた。ＡＡの検出は１：７５００の希釈率のアビジン－ＨＲＰ結合体で達成した。ＭＭＰ－９で切断可能なマスキングされたＭＢＰ：抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　ＡＡの、ＭＭＰ－９による活性化を図５に提示する。

【０３５４】

ＭＭ／ＭＭＰ－９ＣＭ／抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　Ｈｉｓを含有するＡＡ構築体のＥＬＩＳＡアッセイ

ＭＭＰ－９消化緩衝液（１５０μＬ）中で透析した粗ペリプラズム抽出物を、約３ＵのＭＭＰ－９を用いてまたは用いずに、３時間、３７℃でインキュベーションした。その後、試料をＰＢＳＴ、１０％のＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋで４００μＬまで希釈し、ＥＬＩＳＡウェルに加えた。ＡＡの検出は１：５０００の希釈率の抗Ｈｉｓ６－ＨＲＰ結合体を用いて達成した。ＭＭＰ－９で切断可能なマスキングされた抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　Ｈｉｓ　ＡＡの、ＭＭＰ－９による活性化を、図６に提示する。

【０３５５】

ＭＭ／ＭＭＰ－９ＣＭ／抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ－Ｆｃを含有するＡＡ構築体のＥＬＩＳＡアッセイ

５０マイクロリットルのＨＥＫ細胞上清を２００μＬのＭＭＰ－９消化緩衝液に加え、約１９ＵのＭＭＰ－９を用いてまたは用いずに、２時間、３７℃でインキュベーションした。その後、試料をＰＢＳＴ、１０％のＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋで１：１まで希釈し、１００μＬをＥＬＩＳＡウェルに加えた。ＡＡの検出は１：２５００の希釈率の抗ヒトＦｃ－ＨＲＰ結合体を用いて達成した。ＭＭＰ－９で切断可能なマスキングされた抗ＶＥＧＦ

ｓｃＦｖ－Ｆｃの、ＭＭＰ－９による活性化を、図７に提示する。

【０３５６】

ＭＭ／ＭＭＰ－９ＣＭ／抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ－Ｆｃを含有するＡＡ構築体の精製およびアッセイ

抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ　Ｆｃ　ＡＡを、タンパク質Ａカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。手短に述べると、１０ｍＬのＨＥＫ細胞上清をＰＢＳで１：１に希釈し、ＰＢＳで事前に平衡化した０．５ｍＬのタンパク質Ａ樹脂に加えた。カラムを１０倍カラム体積のＰＢＳで洗浄した後、結合したタンパク質を１７０ｍＭのアセテート、３００ｍＬのＮａＣｌ、ｐＨ２．５で溶出させ、１ｍＬ画分を２００μＬの２Ｍのトリス、ｐＨ８．０ですぐに中和した。その後、Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ遠心濃縮器を用いてタンパク質を含有する画分を濃縮した。ＥＬＩＳＡをＨＥＫ細胞上清と同様に実施した。タンパク質Ａカラムを用いて精製された、ＭＭＰ－９依存性のＶＥＧＦとＭＭ３０６および３１４を有する抗ＶＥＧＦｓｃＦｖ　Ｆｃ　ＡＡ構築体との結合を示すＥＬＩＳＡデータを図８に提示する。

【０３５７】

（実施例９）

効率的にマスキングされた治療的タンパク質の発見および妥当性確認の標的置換アッセイ

ＶＥＧＦを９６ウェルマイクロタイタープレートのウェル上に吸着させ、乳タンパク質で洗浄および遮断した。抗ＶＥＧＦ抗体またはＭＭ　ＪＳ３０６を含有する抗ＶＥＧＦ　ＡＡを含有する２５ｍｌの培養培地をコーティングしたウェルに加え、１、２、４、８または２４時間インキュベーションした。インキュベーション後、ウェルを洗浄し、結合したＡＡの程度を抗ｈｕＩｇＧ免疫検出によって測定した。図９は、３０６のマスキングにより、１時間ではＶＥＧＦとの結合を完全に阻害することができることを示す。しかし、１６時間では、３０６－抗ＶＥＧＦ　ＡＡの＞５０％がその抗原ＶＥＧＦと結合した。＞６００ｎＭの親和性で抗ＶＥＧＦ抗体と結合する３０６マスキングは、ＶＥＧＦとの結合を効率的に妨げない。

【０３５８】

（実施例１０）

抗ＣＴＬＡ４　ＭＭのライブラリスクリーニングおよび単離

Ｂｅｓｓｅｔｔｅら（Ｂｅｓｓｅｔｔｅ，　Ｐ．Ｈ．、Ｒｉｃｅ，　Ｊ．ＪおよびＤａｕｇｈｅｒｔｙ，　Ｐ．　Ｓ．、Ｒａｐｉｄ　ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｈｉｇｈ－ａｆｆｉｎｉｔｙ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｐｅｐｔｉｄｅｓ　ｕｓｉｎｇ　ｂａｃｔｅｒｉａｌ　ｄｉｓｐｌａｙ．、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．　Ｄｅｓｉｇｎ　＆　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ．、１７巻：１０号、７３１～７３９頁、２００４年）の方法に従って、ＣＴＬＡ４抗体マスキング部分（ＭＭ）をＥ．ｃｏｌｉの表面上に表示される10^{10}個のランダムな１５量体ペプチドのコンビナトリアルライブラリから単離した。ビオチン標識したマウス抗ＣＴＬＡ４抗体（クローンＵＣ４　Ｆ１０－１１、２５ｎＭ）をライブラリと共にインキュベーションし、ストレプトアビジンでコーティングした磁気ナノビーズを用いて、推定上の結合ペプチドを発現する、抗体と結合した細菌を、結合しないものから磁気的に分別した。続いてＦＡＣＳを用いて濃縮ラウンドを実施した。ＦＡＣＳの初回ラウンドでは、細菌をビオチン標識した標的（５ｎＭ）を用いて分別し、二次標識ステップではストレプトアビジン（ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｉｎ）フィコエリスリンを用いた。ＦＡＣＳの続くラウンドでは、分別はＤｙｌｉｇｈｔで標識した抗体を用いて行い、二次標識ステップの結合力効果を回避し、最高の親和性の結合剤を選択するために、標的の濃度を低下させた（１ｎＭ、その後０．１ｎＭ）。１ラウンドのＭＡＣＳおよび３ラウンドのＦＡＣＳの結果、結合剤のプールがもたらされ、そこから個々のクローンを配列決定した。個々のクローンの相対親和性および解離速度のスクリーニングは、細菌表面上での複数のペプチドの発現が原因の、二価抗体の結合力効果を低下させるために、フィシンで消化したＤｙｌｉｇｈｔ標識したＦａｂ抗体断片を用いて行った。標的特異性のさらな

る試験として、競合相手として２０ｕＭのＥ．Ｃｏｌｉ枯渇ＩｇＧの存在下で、個々のクローンを結合についてスクリーニングした。４つのクローンのアミノ酸およびヌクレオチド配列をＭＭの最適化用に選択し、表１５に示す。これらの配列は、互換性があるように１１５ＭＭ、１８４ＭＭ、１８２ＭＭ、および１７５ＭＭと呼ぶ。一定範囲の解離速度を有するＭＭ候補を選択して、切断後のＭＭ解離に対する解離速度の効果を決定した。抗ＣＴＬＡ４と結合しなかったＭＭを陰性対照として使用した。

【０３５９】

【表１５】

表15：抗CTLA4をマスキングするMMのアミノ酸およびヌクレオチド配列

KK115 MM
M I L L C A A G R T W V E A C A N G R
ATGATTTTGTTGTGCGCGGCGGGTCGGACGTGGGTGGAGGCTTGCGCTAA TGGTAGG
KK184 MM
A E R L C A W A G R F C G S
GCTGAGCGGTTGTGCGCGTGGGCGGGGCGGTTCTGTGGCAGC
KK182 MM
W A D V M P G S G V L P W T S
TGGGCGGATGTTATGCCTGGGTCGGGTGTGTTGCCGTGGACGTCG
KK175 MM
S D G R M G S L E L C A L W G R F C G S
AGTGATGGTCGTATGGGGAGTTTGGAGCTTTGTGCGTTGTGGGGGCGGTTCTGTGGCAGC
陰性対照（抗CTLA4と結合しない）
P C S E W Q S M V Q P R C Y Y
GCCGTGTTCTGAGTGGCAGTCGATGGTGCAGCCGCGTTGCTATTA

（実施例１１）

抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖのクローニング

Ｇｉｌｌｉｌａｎｄら（Ｇｉｌｌｉｌａｎｄ　Ｌ．Ｋ．、Ｎ．Ａ．Ｎｏｒｒｉｓ、Ｈ．Ｍａｒｑｕａｒｄｔ、Ｔ．Ｔ．Ｔｓｕ、Ｍ．Ｓ．Ｈａｙｄｅｎ、Ｍ．Ｇ．Ｎｅｕｂａｕｅｒ、Ｄ．Ｅ．Ｙｅｌｔｏｎ、Ｒ．Ｓ．Ｍｉｔｔｌｅｒ、およびＪ．Ａ．Ｌｅｄｂｅｔｔｅｒ．、Ｒａｐｉｄ ａｎｄ ｒｅｌｉａｂｌｅ ｃｌｏｎｉｎｇ ｏｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｖａｒｉａｂｌｅ ｒｅｇｉｏｎｓ ａｎｄ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｓｉｎｇｌｅ ｃｈａｉｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｆｒａｇｍｅｎｔｓ．、Ｔｉｓｓｕｅ Ａｎｔｉｇｅｎｓ、４７巻：１号、１～２０頁、１９９６年）の方法に従って、抗ＣＴＬＡ４　ＳｃＦｖを、ＵＣ４Ｆ１０－１１ハムスター抗マウスＣＴＬＡ４抗体を分泌するＨＢ３０４ハイブリドーマ細胞系（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ）からクローニングした。このプロトコルの詳細版は、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗの後に．ｉｂｍｓ．ｓｉｎｉｃａ．ｅｄｕ．ｔｗ／～ｓｒｏｆｆ／ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ／ｓｃＦｖ．ｈｔｍを入力することによって探せるウェブサイトで見つけることができる。手短に述べると、ＲＮｅａｓｙ全ＲＮＡ単離キット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて全ＲＮＡをハイブリドーマから単離した。プライマーＩｇＫ１（ｇｔｙｔｔｒｔｇｎｇｔｎａｃｙｔｃｒｃａ）およびＩｇＨ１（ａｃｄａｔｙｔｔｙｔｔｒｔｃｎａｃｙｔｔｎｇｔ）（上記引用のＧｉｌｌｉｌａｎｄら）を、それぞれ可変軽鎖および重鎖の第１の鎖の合成に使用した。末端トランスフェラーゼを用いてポリＧテイルを付加し、次いで、ＥｃｏＲＩ、ＳａｃＩおよびＸｂａＩ部位を含有し、軽鎖および重鎖（ポリＧテイル特異的）の両方のための５’ＡＮＣＴＡＩＬプライマー（上記引用のＧｉｌｌｉｌａｎｄら）（ｃｇｔｃｇａｔｇａｇｃｔｃｔａｇａａｔｔｃｇｃａｔｇｔｇｃａａｇｔｃｃｇａｔｇｇｔｃｃｃｃｃｃｃｃｃｃｃｃｃｃ）、ならびに、マウス抗体定常領域配列に由来し、ＨｉｎｄＩＩＩ、ＢａｍＨＩおよびＳａｌＩ部位を含有する、それぞれ軽鎖および重鎖を増幅するための３’ＨＢＳ－ｈＩｇＫ（ｃｇｔｃａｔｇｔｃｇａｃｇｇａｔｃｃａａｇｃｔｔａｃｙｔｔｃｃａｙｔｔｎａｃｒｔｔｄａｔｒｔｃ）およびＨＢＳ－ｈＩｇＨ（ｃｇｔｃａｔｇｔｃｇａｃｇｇａｔｃｃａａｇｃｔ

ｔｒｃａｎｇｃｎｇｇｎｇｃｎａｒｎｇｇｒｔａｎａｃ）を用いてＰＣＲを行った（上記引用のＧｉｌｌｉｌａｎｄら）。構築体およびベクターをＨｉｎｄＩＩＩおよびＳａｃＩで消化し、Ｅ．Ｃｏｌｉ内にライゲーションおよび形質転換させた。個々のコロニーを配列決定し、V_LおよびV_Hの正しい配列（それぞれ表１６および１７）を、既存のマウスおよびハムスター抗体との比較によって確認した。提示した配列中で抗ＣＴＬＡ４について記載したリーダー配列は、一般的にシグナル配列または分泌リーダー配列とも呼ばれ、抗体の分泌を指示するアミノ酸配列である。この配列は分泌中に細胞によって切り離され、成熟タンパク質中に含まれない。さらに、Ｔｕｖｅら（Ｔｕｖｅ，　Ｓ．　Ｃｈｅｎ，　Ｂ．Ｍ．、Ｌｉｕ，　Ｙ．、Ｃｈｅｎｇ，　Ｔ－Ｌ．、Ｔｏｕｒｅ，　Ｐ．、Ｓｏｗ，　Ｐ．Ｓ．、Ｆｅｎｇ，　Ｑ．、Ｋｉｖｉａｔ，　Ｎ．、Ｓｔｒａｕｓｓ，　Ｒ．、Ｎｉ，　Ｓ．、Ｌｉ，　Ｚ．、Ｒｏｆｆｌｅｒ，　Ｓ．Ｒ．およびＬｉｅｂｅｒ，　Ａ．、Ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｔｕｍｏｒ　Ｓｉｔｅ　－Ｌｏｃａｔｅｄ　ＣＴＬ－Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　Ａｎｔｉｇｅｎ－４　Ｂｌｏｃｋａｄｅ　ａｎｄ　Ｓｙｓｔｅｍｉｃ　Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ　Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ　Ｉｎｄｕｃｅｓ　Ｔｕｍｏｒ　Ｄｅｓｔｒｕｃｔｉｖｅ　Ｉｍｍｕｎｅ　Ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ．、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．、６７巻：１２号、５９２９～５９３９頁、２００７年）によってクローニングされた同じｓｃＦｖは、ここに提示する配列と同一であった。

【０３６０】

【表１６】

表16:ハムスター抗マウス CTLA4 V_L

リーダー

M E S H I H V F M S L F L W V S G S C A D I M M T Q S P S S
L S V S A G E K A T I S C K S S Q S L F N S N A K T N Y
L N W Y L Q K P G Q S P K L L I Y Y A S T R H T G V P D
R F R G S G T D F T L T I S S V Q D E D L A F Y Y C Q Q
W Y D Y P Y T F G A G T K V E I K

atggaatcacatatccatgtcttcatgtccttgttcctttgggtgtctggttcctgtgcagacatcatgatgacccagtctccttcatccctga
gtgtgtcagcgggagagaaagccactatcagctgcaagtccagtcagagtcttttcaacagtaacgccaaaacgaactacttgaactgg
tatttgcagaaaccagggcagtctcctaaactgctgatctattatgcatccactaggcatactggggtccctgatcgcttcagaggcagtg
gatctgggacggatttcactctcaccatcagcagtgtccaggatgaagacctggcattttattactgtcagcagtggtatgactacccata
cacgttcggagctgggaccaaggtggaaatcaaa

【０３６１】

【表１７】

表17:ハムスター抗マウス CTLA4 V_H

リーダー

K M R L L G L L Y L V T A L P G V L S Q I Q L Q E S G P G
L V N P S Q S L S L S C S V T G Y S I T S G Y G W N W I R
Q F P G Q K V E W M G F I Y Y E G S T Y Y N P S I K S R
I S I T R D T S K N Q F F L Q V N S V T T E D T A T Y Y C
A R Q T G Y F D Y W G Q G T M V T V S S

aagatgagactgttgggtcttctgtacctggtgacagcccttcctggtgtcctgtcccagatccagcttcaggagtcaggacctggcctggt
gaaccctcacaatcactgtccctctcttgctctgtcactggttactccatcaccagtggttatggatggaactggatcaggcagttcccag
ggcagaaggtggagtggatgggattcatatattatgagggtagcacctactacaacccttccatcaagagccgcatctccatcaccagag
acacatcgaagaaccagttcttcctgcaggtgaattctgtgaccactgaggacacagccacatattactgtgcgagacaaactgggtact
ttgattactgggggccaaggaaccatggtcaccgtctcctca

（実施例１２）

ＭＭおよびＣＭを有する抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖの構築

発現および機能のための抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖの最適な配向を決定するために、続く

「重複伸長によるスプライシング」ＰＣＲ（ＳＯＥ－ＰＣＲ、Ｈｏｒｔｏｎ，　Ｒ．Ｍ．、Ｈｕｎｔ，　Ｈ．Ｄ．、Ｈｏ，　Ｓ．Ｎ．、Ｐｕｌｌｅｎ，　Ｊ．Ｋ．およびＰｅａｓｅ，　Ｌ．Ｒ．（１９８９年）Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ｈｙｂｒｉｄ　ｇｅｎｅｓ　ｗｉｔｈｏｕｔ　ｔｈｅ　ｕｓｅ　ｏｆ　ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ　ｅｎｚｙｍｅｓ：　ｇｅｎｅ　ｓｐｌｉｃｉｎｇ　ｂｙ　ｏｖｅｒｌａｐ　ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ．、Ｇｅｎｅ、７７巻、６１～６８頁）のために（ＧＧＧＳ）$_3$リンカーの半分をＮまたはＣ末端のどちらかに、V_HまたはV_LをＮ末端に用いて、可変軽鎖および重鎖を個々にＰＣＲ増幅するためにプライマーを設計した。ヌクレオチド配列の先頭に開始コドンをインフレームで作製するためにＮｄｅＩ制限部位をＮ末端に操作設計し、ＨｉｓタグおよびストップコドンをＣ末端に付加した。その後、外部プライマーを用いたソーイングＰＣＲによって軽鎖および重鎖を一緒にして、V_HV_LおよびV_LV_Hの両方中にＳｃＦｖを作製した（図１０）。プライマーを以下の表１８に示す。

【０３６２】

【表１８】

表18：　scFvs V_HV_L および V_LV_H を作製するためのプライマー

VL for1	caaggaccatagcatatggacatcatgatgacccagtct
VL リンカー	
rev1	acttccgcctccacctgatccaccaccacctttgatttccaccttggtcc
リンカーVH	
for2	ggatcaggtggaggcggaagtggaggtggcggttcccagatccagcttcaggagtcagga
VH his rev2	ggccggatccaagcttttagtggtgatggtgatgatgtgaggagacggtgaccatggttcc
VH for3	acaaggaccatagcatatgcagatccagcttcaggagtca
VH リンカー	
rev3	acttccgcctccacctgatccaccaccacctgaggagacggtgaccatggttcc
リンカーVL for4	ggtggatcaggtggaggcggaagtggaggtggcggttccgacatcatgatgacccagtctcct
VL his rev4	cggccggatccaagcttttagtggtgatggtgatgatgtttgatttccaccttggtcccagc

次に、ＭＭのクローニング用にｓｆｉおよびｘｈｏ１部位、次いでＭＭＰ－９切断配列および（ＧＧＳ）$_2$リンカーをＳｃＦｖ構築体上のＮ末端に付加するために、１組の重複するプライマーを設計した。これらのプライマーを表１９に提示し、図１０に模式図を示す。

【０３６３】

【表１９】

表19：　MM および CM のクローニング用のプライマー

for 1c リンカー	gccagtctggccggtagggctcgagcggccaagtgcacatgccactgggcttcctgggtc
for 1dリンカー VL	gccactgggcttcctgggtccgggtggaagcggcggctcagacatcatgatgacccagtc
for 1e リンカーVH	gccactgggcttcctgggtccgggtggaagcggcggctcacagatccagcttcaggagtca
for 1a	ttcaccaacaaggaccatagcatatgggccagtctggccggtagggc
VH his rev2	ggccggatccaagcttttagtggtgatggtgatgatgtgaggagacggtgaccatggttcc
VH リンカー rev3	acttccgcctccacctgatccaccaccacctgaggagacggtgaccatggttcc

ＳｃＦｖを含有するリンカーをＰＣＲ増幅し、ＮｄｅＩおよびＥｃｏＲＩ（V_H中の内部制限部位）で消化し、ゲル精製した。ＰＣＲ断片をベクター内にライゲーションさせ、Ｅ．ｃｏｌｉ内に形質転換させた。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を表２０に提示する。

【０３６４】

【表２０】

表20:MMリンカーーCMー抗CTLA4 scFvリンカーの配列

アミノ酸配列：
(-------MMリンカー-------) (--------------------CM-----------------) (---scFvリンカー---)
G G S G G S G G S S G Q V H M P L G F L G P G G S G G S

ヌクレオチド配列：
GGCGGTTCTGGTGGCAGCGGTGGCTCGAGCGGCCAAGTGCACATGCCACTGGGCTT
CCTGGGTCCGGGTGGAAGCGGCGGCTCA

ＭＭ配列をＰＣＲ増幅し、ｓｆｉ１およびｘｈｏ１部位で消化し、リンカー抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖ構築体内にライゲーションさせ、Ｅ．Ｃｏｌｉ内に形質転換させ、配列決定した。ＭＭ１１５－ＣＭ－ＡＢの完全なヌクレオチドおよびアミノ酸配列をそれぞれ以下の表２１および２２に示す。

【０３６５】

【表２１】

表21:MM115ー抗CTLA4 ScFv ABのアミノ酸配列

M I L L C A A G R T W V E A C A N G R G G S G G S G G S S G Q V H M
P L G F L G P G G S G G S Q I Q L Q E S G P G L V N P S Q S L S L S C S
V T G Y S I T S G Y G W N W I R Q F P G Q K V E W M G F I Y Y E G S T
Y Y N P S I K S R I S I T R D T S K N Q F F L Q V N S V T T E D T A T Y
Y C A R Q T G Y F D Y W G Q G T M V T V S S G G G G S G G G G S G G
G G S D I M M T Q S P S S L S V S A G E K A T I S C K S S Q S L F N S
N A K T N Y L N W Y L Q K P G Q S P K L L I Y Y A S T R H T G V P D
R F R G S G S G T D F T L T I S S V Q D E D L A F Y Y C Q Q W Y D Y P
Y T F G A G T K V E I K

【０３６６】

【表２２】

表22:MM115ー抗CTLA4 ScFv ABのヌクレオチド配列

atgattttgttgtgcgcggcgggtcggacgtgggtggaggcttgcgctaatggtaggggcggttctggtggcagcggtggctcgagcggccaagtgca
catgccactgggcttcctgggtccgggtggaagcggcggctcacagatccagcttcaggagtcaggacctggcctggtgaaccctcacaatcactgtc
cctctcttgctctgtcactggttactccatcaccagtggttatggatggaactggatcaggcagttcccagggcagaaggtggagtggatgggattcatata
ttatgagggtagcacctactacaacccttccatcaagagccgcatctccatcaccagagacacatcgaagaaccagttcttcctgcaggtgaattctgtgac
cactgaggacacagccacatattactgtgcgagacaaactgggtactttgattactggggccaaggaaccatggtcaccgtctcctcaggtggtggtgga
tcaggtggaggcggaagtggaggtggcggttccgacatcatgatgacccagtctccttcatccctgagtgtgtcagcgggagagaaagccactatcagc
tgcaagtccagtcagagtcttttcaacagtaacgccaaaacgaactacttgaactggtatttgcagaaaccagggcagtctcctaaactgctgatctattatg
catccactaggcatactggggtccctgatcgcttcagaggcagtggatctgggacggatttcactctcaccatcagcagtgtccaggatgaagacctggc
attttattactgtcagcagtggtatgactacccatacacgttcggagctgggaccaaggtggaaatcaaacatcatcaccatcaccactaa

ＭＭ－ＣＭ－抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖ－Ｆｃの融合体を作製するために、表２３に記載の以下のプライマーを設計して、ｉｎ　ｆｕｓｉｏｎ系（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を介してｐｆｕｓｅ　Ｆｃベクター内にクローニングするための構築体をＰＣＲ増幅した。プラスミドをＥ．ｃｏｌｉ内に形質転換させ、個々のクローンの配列を確認した。

【０３６７】

【表２３】

表23:MM－CM－抗CTLA4 scFv－Fcの融合体を作製するためのプライマー

HLCTLA4ScFv pFuse 逆方向	tcagatctaaccatggctttgatttccaccttggtcc
LHCTLA4ScFv pFuse 逆方向	tcagatctaaccatggctgaggagacggtgaccatgg
p115CTLA4 pfuse 順方向	cacttgtcacgaattcgatgattttgttgtgcgcggc
p182CTLA4 pfuse 順方向	cacttgtcacgaattcgtgggcggatgttatgcctg
p184CTLA4 pfuse 順方向	cacttgtcacgaattcggctgagcggttgtgcgcgtg
p175CTLA4 pfuse 順方向	cacttgtcacgaattcgagtgatggtcgtatggggag
pnegCTLA4 pfuse 順方向	cacttgtcacgaattcgccgtgttctgagtggcagtcg

（実施例１３）

ＨＥＫ－２９３細胞におけるマスキングされた／ＭＭＰ－９／抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖ－Ｆｃの発現およびアッセイ

１０ｕｇの、ｐ１７５ＣＴＬＡ４ｐｆｕｓｅ、ｐ１８２ＣＴＬＡ４ｐｆｕｓｅ、ｐ１８４ＣＴＬＡ４ｐｆｕｓｅ、ｐ１１５ＣＴＬＡ４ｐｆｕｓｅ、またはｐｎｅｇＣＴＬＡ４ｐｆｕｓｅの発現ベクターを、ｔｒａｎｓｆｅｃｔａｍｉｎｅ２０００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を製造者のプロトコルに従って使用したトランスフェクションによって、10^7個のＨＥＫ－２９３　ｆｒｅｅｓｔｙｌｅ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）内に導入した。トランスフェクトした細胞をさらに７２時間インキュベーションした。インキュベーション後、馴化培地を収集し、遠心分離によって細胞および細片を除去した。以下に記載のように馴化培地をＥＬＩＳＡによって活性についてアッセイした。

【０３６８】

５０マイクロリットルの、ＭＭ１７５－抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖ、ＭＭ１８２－抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖ、ＭＭ１８４－抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖ、ＭＭ１１５－抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖ、またはＭＭｎｅｇ－抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖを発現するＨＥＫ－２９３からの馴化培地を、２００μＬのＭＭＰ－９消化緩衝液に加え、約１９ＵのＭＭＰ－９を用いてまたは用いずに、２時間、３７℃でインキュベーションした。その後、試料をＰＢＳ、４％の無脂肪粉乳（ＮＦＤＭ）で１：１に希釈し、競合ＥＬＩＳＡによって結合活性についてアッセイした。

【０３６９】

１００ｕｌのＰＢＳ中のネズミＣＴＬＡ４－Ｆｃ融合タンパク質（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）の０．５ｍｇ／ｍｌ溶液を、９６ウェルＥａｓｙ　Ｗａｓｈプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）のウェルに加え、終夜４℃でインキュベーションした。その後、ウェルを１時間、室温（ＲＴ）で、１００ｕｌのＰＢＳ中の２％の無脂肪粉乳（ＮＦＤＭ）を用いて遮断し、その後、ＰＢＳ、０．０５％のＴｗｅｅｎ－２０（ＰＢＳＴ）で３×洗浄した。５０ｕｌの、ＭＭＰ－９で事前に処理していないまたは処理した、ＭＭ１７５－抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖ、ＭＭ１８２－抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖ、ＭＭ１８４－抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖ、ＭＭ１１５－抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖ、またはＭＭｎｅｇ－抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖを発現するトランスフェクトしたＨＥＫ－２９３細胞の培養物からの馴化培地をウェルに加え、ＲＴで１５分間インキュベーションした。インキュベーション後、０．５ｕｇ／ｍｌのビオチン標識したネズミＢ７１－Ｆｃ（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ）を含有する５０ｕｌのＰＢＳをそれぞれのウェルに加えた。ＲＴで３０分間さらにインキュベーションした後、ウェルを１５０ｕｌのＰＢＳＴで５×洗浄した。アビジン－ＨＲＰの１：３０００希釈液を含有する１００ｕｌのＰＢＳを加え、プレートをＲＴで４５分間インキュベーションし、その後、１５０ｕｌのＰＢＳＴで７×洗浄した。ＥＬＩＳＡを１００ｕｌのＴＭＢ（Ｐｉｅｒｃｅ）で展開し、１００ｕＬの１ＮのＨＣＬで停止させ、吸光度を４５０ｎＭで測定した。

【０３７０】

（実施例１４）

抗ＣＴＬＡ４の構築

表２４および２５は、それぞれ抗ヒトＣＴＬＡ－４　ｓｃＦｖのヌクレオチドおよびア

ミノ酸配列を示す。ヒトＣＴＬＡと結合することができるＭ１３バクテリオファージは供給されたものである（契約の元、Ｃｒｅａｔｉｖｅ　Ｂｉｏｌａｂｓ、２１　Ｂｒｏｏｋｈａｖｅｎ　Ｂｌｖｄ．、Ｐｏｒｔ　Ｊｅｆｆｅｒｓｏｎ　Ｓｔａｔｉｏｎ、ＮＹ　１１７７６による）。ファージをＥ．ｃｏｌｉ　ＴＧ－１中で産生させ、ＰＥＧ、ＮａＣｌ沈殿によって精製した。

【０３７１】

【表２４】

表24:抗ヒトCTLA4 scFv ABのヌクレオチド配列

gaaattgtgttgacacagtctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagcagctactt agcctggtaccagcagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatggtgcatccagcagggccactggcatcccagacaggttcagtggcagtg ggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagactggagcctgaagattttgcagtgtattactgtcagcagtatggtagctcaccgctcactttcggcg gagggaccaaggtggaaatcaaacgttccggagggtcgaccataacttcgtataatgtatactatacgaagttatcctcgagcggtacccaggtgcagct ggtgcagactgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatccacctttagcagctatgccatgagctgggt ccgccaggctccagggaaggggctggagtgggtctcagctattagtggtagtggtggtagcacatactacgcagactccgtgaagggccggttcacca tctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgacaaactccctttactg gtacttcgatctctggggccgtggcaccctggtcactgtctcttcagctagc

【０３７２】

【表２５】

表25:抗ヒトCTLA4 scFv ABのアミノ酸配列

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQV QLVQTGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIAGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS

ＣＴＬＡ－４結合のファージＥＬＩＳＡ測定：抗ＣＴＬＡ－４　ｓｃＦｖ－Ｃ２の結合を測定するために、１００ｕｌのＰＢＳ中の０．５ｕｇ／ｍｌのヒトＣＴＬＡ－４－ＩｇＧまたはネズミＣＴＬＡ－４－ＩｇＧ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）をマイクロウェル（９６ウェルＥａｓｙ　Ｗａｓｈ、Ｃｏｒｎｉｎｇ）に加え、終夜４℃でインキュベーションした。その後、ウェルを１時間、室温（ＲＴ）で、１５０ｕｌのＰＢＳＴ（ＰＢＳ、ｐＨ７．４、０．５％のＴｗｅｅｎ－２０）中の２％の無脂肪粉乳（ＮＦＤＭ）を用いて遮断した。その後、ウェルを３００ｕｌのＰＢＳＴで３×洗浄した。洗浄後、１００ｕｌのＰＢＳＴ中の精製した抗ＣＴＬＡ－４　ｓｃＦｖファージを３つ組のウェルに加え、ＲＴで１時間インキュベーションした。その後、ウェルを３００ｕｌのＰＢＳＴで３×洗浄した。その後、１００マイクロリットルの抗Ｍ１３ＨＲＰと結合体化した抗体を加え、ＲＴで１時間インキュベーションした。ＨＲＰの検出は、１００ｕｌのＴＭＢ　ｏｎｅ（Ｐｉｅｒｃｅ）溶液を用いて完了した。反応を１００ｕｌの１ＮのＨＣＬで停止させ、吸光度を４５０ｎＭで測定した。図１９は、抗ＣＴＬＡ４　ｓｃＦｖとネズミおよびヒトＣＴＬＡ４の両方との結合を示す。

【０３７３】

ＡＢとしてＩｇＧを含むＡＡ

ヒトＩｇＧ中の抗ＥＧＦＲおよび抗ＶＥＧＦを含むＡＡの例を以下のセクションに記載する。これらのＡＡは、正常な条件下ではマスキングされており、不活性である。ＡＡが罹患した組織に達した際、これらは疾患に特異的なプロテアーゼによって切断され、その後、その標的と結合することができる。細菌ディスプレイを使用して、抗ＥＧＦＲおよび抗ＶＥＧＦ抗体の適切なＭＭを見つける。これらの例では、選択されたＭＭを、プロテアーゼで活性化した後に標的との特異的結合に適格となるＡＡを作製するためのトリガーとして使用する酵素基質と合わせる。さらに、ＡＢに対する親和性を増加させ、切断されていない状態での標的化結合の阻害を増強させるために、細菌ディスプレイを用いて、発見されたペプチドを変更する。増加したＭＭ親和性および増強した阻害は、適切なＡＡの機能に重要である。

【０３７４】
（実施例１５）
抗ＶＥＧＦ　ＩｇＧ　ＡＡの構築
抗ＶＥＧＦ　ＩｇＧ抗体の構築
プライマーＣＸ０３１１およびＣＸ０７０２を用いて、抗ＶＥＧＦ　ｍｍｐ－９　３０６　ｓｃＦｖ（上述）を鋳型として使用して、抗ＶＥＧＦ軽鎖可変領域をＰＣＲ増幅し、その後、ＥｃｏＲＩおよびＢｓｉＷＩ制限部位を用いてｐＦＩＬ２－ＣＬ－ｈｋベクター内にクローニングした（ｐＦＩＬ２－ＶＥＧＦ－Ｌｃ）。プライマーＣＸ０３２５およびＣＸ０７０２を用いて、抗ＶＥＧＦ　ｍｍｐ－９　ｓｃＦｖを鋳型として使用して、３０６ｍｍｐ－９軽鎖をＰＣＲ増幅し、上述のようにクローニングした（ｐＦＩＬ２－３０６ｍ　ＶＥＧＦ－Ｌｃ）。プライマーＣＸ０７００およびＣＸ０７０１を用いて、３０６ＭＭ／ＭＭＰ－９ＣＭ／抗ＶＥＧＦｓｃＦｖ（上述）を鋳型として使用して、抗ＶＥＧＦ重鎖可変領域をＰＣＲ増幅し、ＥｃｏＲＩおよびＮｈｅＩ制限部位を用いてｐＦＩＬ－ＣＨＩｇ－ｈＧ１ベクター内にクローニングした（ｐＦＩＬ－ＶＥＧＦ－Ｈｃ）。プライマーを以下の表２６に提供する。

【０３７５】
【表２６】

表26:抗VEGF IgG抗体を構築するためのプライマー

CX0311	cttgtcacgaattcggatattcaactgacccagagc
CX0702	gtgcagccaccgtacgcttaatctccactttggtg
CX0325	tgcttgctcaactctacgtc
CX0289	gctttcaccgcaggtacttccgtagctggccagtctggcc
CX0687	cgctccatgggccaccttggccgctgccaccgctcgagcc
CX0700	cacttgtcacgaattcggaggtccagctggtagaaag
CX0701	ggcccttggtgctagcgctcgacactgtaaccagagtac

【０３７６】
【表２７】

表27:重鎖および軽鎖抗VEGF抗体の配列

pFIL2-CL-hk 抗 -VEGF Lc (pFIL2-VEGF-Lc)

gatattcaactgacccagagccccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatcacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaatt
ggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcattccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtgg
taccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagcaatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcac
caaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctg
aataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaa
ggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctg
agctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

上述のように、抗ＶＥＧＦ　ＡＡの開発に使用したマスキング３０６は、ＡＢに対するＭＭの低い親和性が原因で、標的との長期的な曝露にわたって標的結合を効率的にマスキングしなかった。ＭＭの親和性を増加させるための一手法は、以下に記載するようにペプチドを親和性成熟に供することである。

【０３７７】
親和性成熟のためのライブラリの構築
ソフトランダム化手法を用いることによって３０６抗ＶＥＧＦ　ＭＭを親和性成熟させた。ｅｃｐＸ細胞ディスプレイライブラリを表２８に示すヌクレオチド比で構築した。最終的なライブラリの多様性（３０６ＳＲ）は約２．４５×１０^{8}であった。

【０３７８】
【表２８】
表 28

元の塩基	塩基の比
G	G=70%; T=8%; A=11%; C=11%
T	T=70%; G=8%; A=11%; C=11%
A	A=80%; G=5%; T=6%; C=9%
C	C=80%; G=5%; T=6%; A=9%

３０６ＳＲライブラリスクリーニング
初回のＭＡＣＳラウンドは、タンパク質Ａで標識した磁気ビーズおよびライブラリの１００×を超える過剰サンプリングを提供するいくつかの細胞を用いて行った。磁気選択の前に、細胞を１００ｎＭの抗ＶＥＧＦ　ＩｇＧおよび１０μＭの３０６ペプチド（３０６Ｐ、ＰＣＳＥＷＱＳＭＶＱＰＲＣＹＹＧ）と共にインキュベーションして、元の３０６配列に等しいまたはそれよりも低い親和性を有する変異体の結合を減らした。磁気選択により2×10^{7}個の細胞の単離がもたらされた。
【０３７９】
第１ラウンドのＦＡＣＳ分別は、１ｎＭのＤｙＬｉｇｈｔ（ｆｌｕｏｒ　５３０　ｎＭ）－抗ＶＥＧＦで標識した細胞上で行った。集団に選択圧をかけるために、第２および第３ラウンドのＦＡＣＳは、１ｎＭのＤｙＬｉｇｈｔ－抗ＶＥＧＦで標識した細胞を用いて、１００ｎＭの３０６Ｐの存在下で行った。選択ゲートは、最も強い結合を有する細胞の５％のみが収集されるように設定した。第３ラウンドで分別された細胞の集団を最初に１０ｎＭのＤｙＬｉｇｈｔ－抗ＶＥＧＦと共にインキュベーションし、次いで３０６Ｐを最終濃度１００ｎＭまで加え、３７℃で２０分間インキュベーションした。陽性集団の最も明るい２％を収集し、これは、３０６Ｐによって競合されない結合を表す。ＦＡＣＳラウンド５～７は以下のとおりに行った：集団を、１０ｎＭのＤｙＬｉｇｈｔで標識した抗ＶＥＧＦで標識し、その後、標識されていないＶＥＧＦ（１００ｎＭ）を３７℃で、それぞれ７、１０、および１５分間、競合により除去した。最も明るい１％がＦＡＣＳラウンド５～７で分別された。
【０３８０】
【表２９】
表 29

306SR M1F7 ペプチドの配列
JS306 PCSEWQSMVQPRCYYG
JS1825 SCTAWQSMVEQRCYFG 3X
JS1826 PCSKWESMVEQRCYFA
JS1827 PCSAWQSMVEQRCYFG 2X
JS1829 PCSKWESMVLQSCYFG 4X
JS1830 TCSAWQSMVEQRCYFG 2X
JS1837 TCSQWESMVEPRCYFG

３０６ＳＲ親和性成熟したペプチドの分析
ｅＣＰＸ３．０クローン３０６、ＪＳ１８２５、ＪＳ１８２７、およびＪＳ１８２９の結合を、ＦＡＣＳで、３つの異なる濃度のＤｙＬｉｇｈｔで標識した抗ＶＥＧＦで分析した。結合曲線を図２１に示す。親和性成熟したペプチドの３つすべてが、３０６Ｐよりも少なくとも１０倍高い親和性を示した。
【０３８１】
抗ＶＥＧＦ　ＡＡの構築
親和性成熟したｅｃｐＸ３．０クローン（ＪＳ１８２５、ＪＳ１８２７、およびＪＳ１

８２９）を、プライマーＣＸ０２８９およびＣＸ０６８７を用いてＰＣＲ増幅し、ＳｆｉＩ制限部位を用いてｐＦＩＬ２－３０６ｍＶＥＧＦ－Ｌｃ内にクローニングして、ベクターｐＦＩＬ２－１８２５ｍＶＥＧＦ－Ｌｃ、ｐＦＩＬ２－１８２７ｍＶＥＧＦ－Ｌｃ、およびｐＦＩＬ２－１８２９ｍＶＥＧＦ－Ｌｃを生成した。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を以下の表に提供する。括弧は様々な配列のドメイン間の境界を示す：（リンカー）（ＭＭ）（リンカー）（ＣＭ）（リンカー）（ＡＢ）。

【０３８２】

【表３０】

表30:抗 -VEGF AA: pFIL2-CL-hk 抗 -VEGF mmp-9 306 Lc (pFIL2- 306mVEGF-Lc) の配列

ggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgttgctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagt
gcacatgccactgggcttcctgggtccgggcggttctgatattcaactgacccagagccccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatca
cttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcatt
ccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagca
atattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagc
agttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggt
aactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaaca
caaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー	MM	リンカー	CM	リンカー	AB

(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGG)(QVHMPLGFLGP)(GGS)(DIQLTQSPSSLSA
SVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC)

【０３８３】

【表３１】

表31:抗 -VEGF AA: pFIL2-CL-hk 抗 -VEGF mmp-9 1825 Lc (pFIL2-1825mVEGF-Lc) の配列

ggccagtctggccagtcgtgtacggcgtggcagtcgatggtggagcagcgttgctattttgggggctcgagcggtggcagcggccaaggtggccaag
tgcacatgccactgggcttcctgggtccgggcggttctgatattcaactgacccagagccccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatc
acttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcat
tccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagc
aatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgag
cagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaaca
caaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー	MM	リンカー	CM	リンカー	AB

(GQSGQ)(SCTAWQSMVEQRCYFG)(GSSGGSGQGGQ)(VHMPLGFLGP)(GGS)(DIQLTQSPSSLSA
SVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC)

【０３８４】

【表３２】

表32:抗 -VEGF AA: pFIL2-CL-hk **抗** -VEGF mmp-9 1827 Lc (pFIL2-1827mVEGF-Lc) **の配列**

ggccagtctggccagccgtgttctgcgtggcagtctatggtggagcagcgttgctattttgggggctcgagcggtggcagcggccaaggtggccaagt
gcacatgccactgggcttcctgggtccgggcggttctgatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatca
cttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcatt
ccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagca
atattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagc
agttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggt
aactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaaca
caaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー **MM** リンカー **CM** リンカー **AB**

(GQSGQ)(PCSAWQSMVEQRCYFG)(GSSGGSGQGG)(QVHMPLGFLGP)(GGS)(DIQLTQSPSSLSA
SVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC)

【０３８５】

【表３３】

表33:抗 -VEGF AA: pFIL-CL-hk 抗 -VEGF mmp-9 1829 Lc (pFIL2-1829mVEGF-Lc) の配列

ggccagtctggccagccgtgttctaagtgggaatcgatggtgctgcagagttgctattttggcggctcgagcggtggcagcggccaaggtggccaagtg
cacatgccactgggcttcctgggtccgggcggttctgatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatcact
tgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcattcc
ggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagcaat
attcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagca
gttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacac
aaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー **MM** リンカー **CM** リンカー **AB**

(GQSGQ)(PCSKWESMVLQSCYFG)(GSSGGSGQGG)(QVHMPLGFLGP)(GGS)(DIQLTQSPSSLSAS
VGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC)

抗ＶＥＧＦ抗体およびＡＡの発現および精製

３μｇのｐＦＩＬ－ＶＥＧＦ－Ｈｃおよび３μｇのｐＦＩＬ２－ＶＥＧＦ－Ｌｃを、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、製造者のプロトコルに従って、ＣＨＯ－Ｓ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）内に同時トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞をＦｒｅｅｓｔｙｌｅ　ＣＨＯ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中で培養し、ゼオシン（ｚｅｏｃｉｎ）およびブラストサイジンに対する耐性について選択した。個々のクローンを限界希釈によって単離し、ＥＬＩＳＡによってＥＧＦＲと結合することができるヒトＩｇＧの発現について選択した。すべての抗体およびＡＡは、標準の技法を用いたタンパク質Ａクロマトグラフィーによって精製した。

【０３８６】

同様に、３μｇのＡＡの軽鎖のそれぞれの発現ベクターｐＦＩＬ２－３０６ｍＶＥＧＦ－Ｌｃ、ｐＦＩＬ２－１８２５ｍＶＥＧＦ－Ｌｃ、ｐＦＩＬ２－１８２７ｍＶＥＧＦ－Ｌｃ、またはｐＦＩＬ２－１８２９ｍＶＥＧＦ－Ｌｃを、３μｇのｐＦＩＬ－ＶＥＧＦ－Ｈｃと共にＣＨＯ－Ｓ細胞内に同時トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞をＦｒｅｅｓｔｙｌｅ　ＣＨＯ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中で培養し、ゼオシン（ｚｅｉ

ｏｃｉｎ）およびブラストサイジン（ｂｌａｓｔｉｃｉｉｄｉｎ）に対する耐性について選択した。個々のクローンを限界希釈によって単離し、ＥＬＩＳＡによってＥＧＦＲと結合することができるヒトＩｇＧの発現について選択した。

【０３８７】

抗ＶＥＧＦ抗体およびＡＡの標的置換アッセイ

ＶＥＧＦを９６ウェルマイクロタイタープレートのウェル上に吸着させ、乳タンパク質で洗浄および遮断する。抗ＶＥＧＦ抗体またはＭＭ　ＪＳ３０６、ＪＳ１８２５、ＪＳ１８２７およびＪＳ１８２９を含有する抗ＶＥＧＦ　ＡＡを含有する約２５ｍｌの培養培地をコーティングしたウェルに加え、約１、２、４、８または２４時間インキュベーションした。インキュベーション後、ウェルを洗浄し、結合したＡＡの程度を抗ｈｕＩｇＧ免疫検出によって測定した。

【０３８８】

（実施例１６）

抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ　ＡＡの構築

抗ＥＧＦＲ　ＩｇＧ抗体の構築

Ｂｅｓｓｅｔｔｅら、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、第２３１巻に記載のように、オリゴＣＸ６３８～ＣＸ６５５を用いてＣ２２５軽鎖可変領域の遺伝子をアセンブリＰＣＲによって合成した。生じた生成物をＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩで消化し、ＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩで消化したｐＸＭａｌの大きな断片とライゲーションさせ、プラスミドｐＸ－ｓｃＦｖ２２５－Ｖｋを作製した。同様に、オリゴＣＸ６５６～ＣＸ６７７を用いてＣ２２５重鎖可変領域の遺伝子をアセンブリＰＣＲによって合成し、ＢｇｌＩＩ／ＮｏｔＩで消化し、ｐＸＭａｌのＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩとライゲーションさせて、プラスミドｐＸ－ｓｃＦｖ２２５－Ｖｈを作製した。その後、可変軽鎖遺伝子をｐＸ－ｓｃＦｖ２２５－ＶｋからＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ断片としてｐＸ－ｓｃＦｖ２２５－Ｖｈプラスミド内にＢａｍＨＩ／Ｎｏｔでクローニングして、Ｃ２２５に基づくｓｃＦｖ遺伝子を含有するプラスミドｐＸ－ｓｃＦｖ２２５ｍ－ＨＬを作製した。

【０３８９】

ＩＬ２シグナル配列をｐＩＮＦＵＳＥ－ｈＩｇＧ１－Ｆｃ２（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ）からＫａｓＩ／ＮｃｏＩ断片として、ＫａｓＩ／ＮｃｏＩで消化したｐＦＵＳＥ２－ＣＬＩｇ－ｈｋ（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ）に移動させ、プラスミドｐＦＩＬ２－ＣＬ－ｈｋがもたらされた。また、ＩＬ２シグナル配列をｐＩＮＦＵＳＥ－ｈＩｇＧ１－Ｆｃ２からＫａｓＩ／ＥｃｏＲＩ断片として、ＫａｓＩ／ＥｃｏＲＩで消化したｐＦＵＳＥ－ＣＨＩｇ－ｈＧ１（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ）（大きなおよび中程度の断片）に３方向ライゲーションで移動させ、プラスミドｐＦＩＬ－ＣＨＩｇ－ｈＧ１がもたらされた。

【０３９０】

ヒトＩｇＧ軽鎖定常領域を、プラスミドｐＦＩＬ２－ＣＬ－ｈｋからのオリゴＣＸ３２５／ＣＸ６８８を用いた増幅、ＢｓｉＷＩ／ＮｈｅＩでの消化、およびｐＦＩＬ２－ＣＬ－ｈｋのＢｓｉＷＩ／ＮｈｅＩ内へのクローニングによって、部位特異的に突然変異させて、プラスミドｐＦＩＬ２－$ＣＬ_{２２５}$がもたらされた。

【０３９１】

ヒトＩｇＧ重鎖定常領域を、プラスミドｐＦＩＬ－ＣＨＩｇ－ｈＧ１からのオリゴＣＸ３２５／ＣＸ６８９、ＣＸ６９０／ＣＸ６９２、およびＣＸ６９３／ＣＸ６９４を用いた３つのセグメントでの増幅、次いで外部プライマーＣＸ３２５／ＣＸ６９４を用いた３つすべての生成物の重複ＰＣＲによって、部位特異的に突然変異させた。生じた生成物をＥｃｏＲＩ（ＥｒｏＲＩ）／ＡｖｒＩＩで消化し、ｐＩＮＦＵＳＥ－ｈＩｇＧ１－Ｆｃ２のＥｃｏＲＩ／ＮｈｅＩ内にクローニングして、プラスミドｐＦＩＬ－$ＣＨ_{２２５}$がもたらされた。

【０３９２】

可変軽鎖遺伝子セグメントをｐＸ－ｓｃＦｖ２２５ｍ－ＨＬからオリゴＣＸ６９５／ＣＸ６９６を用いて増幅し、ＢｓａＩで消化し、ｐＦＩＬ２－$ＣＬ_{２２５}$のＥｃｏＲＩ／Ｂ

ｓｉＷＩ内にクローニングして、Ｃ２２５軽鎖発現ベクターｐＦＩＬ２－Ｃ２２５－軽がもたらされた。

【０３９３】

可変重鎖遺伝子セグメントをｐＸ－ｓｃＦｖ２２５ｍ－ＨＬからオリゴＣＸ６９７／ＣＸ６９８を用いて増幅し、ＢｓａＩで消化し、ｐＦＩＬ－ＣＨ$_{225}$のＥｃｏＲＩ／ＮｈｅＩ内にクローニングして、Ｃ２２５重鎖発現ベクターｐＦＩＬ－Ｃ２２５－重がもたらされた。

【０３９４】

【表３３】

表33:抗EGFR IgG抗体の構築に使用するプライマー

CX268	ccgcaggtacctcgagcgctagccagtctggccag
CX325	tgcttgctcaactctacgtc
CX370	aacttgtttattgcagctt
CX448	gagttttgtcggatccaccagagccaccgctgccaccgctcgagcc
CX638	gcgtatgcaggatccggcggcgatattctgctgacccaga
CX639	cacgctcagaatcaccgggctctgggtcagcagaatatcg
CX640	gcccggtgattctgagcgtgagcccgggcgaacgtgtgag
CX641	ggctcgcgcggcagctaaagctcacacgttcgcccgggct
CX642	ctttagctgccgcgcgagccagagcattggcaccaacatt
CX643	gtgcgctgctgataccaatgaatgttggtgccaatgctct
CX644	cattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgcctgc
CX645	ttcgctcgcatatttaatcagcaggcgcgggctgccgttg
CX646	tgattaaatatgcgagcgaaagcattagcggcattccgag
CX647	tgccgctgccgctaaagcggctcggaatgccgctaatgct

CX648	ccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctg
CX649	ctttccacgctgttaatgctcagggtaaaatcggtgccgc
CX650	agcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggattatt
CX651	gttgttgttctgctggcaataataatccgcaatatcttcg
CX652	attgccagcagaacaacaactggccgaccacctttggcgc
CX653	tcagttccagtttggtgcccgcgccaaaggtggtcggcca
CX654	gggcaccaaactggaactgaaacgcggccgccatcaccat
CX655	ctcccacgcgtatggtgatgatggtgatggcggccgcgtt
CX656	cgtatgcaagatctggtagcggtacccaggtgcagctgaa
CX657	ccaggcccgggccgctctgtttcagctgcacctgggtacc
CX658	acagagcggcccgggcctggtgcagccgagccagagcctg
CX659	ctcacggtgcaggtaatgctcaggctctggctcggctgca
CX660	agcattacctgcaccgtgagcggctttagcctgaccaact
CX661	gcgcacccaatgcacgccatagttggtcaggctaaagccg
CX662	atggcgtgcattgggtgcgccagagcccgggcaaaggcct
CX663	aaatcacgcccagccattccaggcctttgcccgggctctg
CX664	ggaatggctgggcgtgatttggagcggcggcaacaccgat
CX665	ctggtaaacggggtgttataatcggtgttgccgccgctcc
CX666	tataacaccccgtttaccagccgcctgagcattaacaaag
CX667	cacctggcttttgctgttatctttgttaatgctcaggcgg
CX668	ataacagcaaaagccaggtgtttttttaaaatgaacagcct
CX669	tcgcggtatcgttgctttgcaggctgttcattttaaaaaa
CX670	gcaaagcaacgataccgcgatttattattgcgcgcgcgcg
CX671	tcataatcataataggtcagcgcgcgcgcgcaataataaa
CX672	ctgacctattatgattatgaatttgcgtattggggccagg
CX673	gctcacggtcaccagggtgccctggccccaatacgcaaat
CX674	gcaccctggtgaccgtgagcgcgggtggtagcggtagcgg
CX675	taccgccgcctccagatcctccgctaccgctaccaccccgc
CX676	aggatctggaggcggcggtagtagtggtggaggatccggt
CX677	tggtgatggcggccgcggccaccggatcctccaccactac
CX688	cgagctagctccctctacgctcccctgttgaagctctttg
CX690	acaagcgcgttgagcccaaatcttgtg
CX692	cagttcatccgggatgggggcagggtg
CX693	ccccatcccgggatgaactgaccaagaaccaggtcagc
CX694	ctggccacctaggactcatttaccc
CX695	gcactggtctcgaattcggatattctgctgacccagag
CX696	ggtgcggtctccgtacgtttcagttccagtttggtg
CX697	gcactggtctcgaattcgcaggtgcagctgaaacagag
CX698	gagacggtctcgctagccgcgctcacggtcaccag
CX730	tgcgtatgcaagatctggtagcggtaccgatattctgctgacccagag
CX731	actactaccgccgcctccagatcctccgctaccgctaccacctttcagttccagtttggtg
CX732	tctggaggcggcggtagtagtggtggaggctcaggcggccaggtgcagctgaaacagag
CX733	gatggtgatggcggccgcgcgcgctcacggtcaccag
CX735	tgtcggatccaccgctaccgcccgcgctcacggtcaccag
CX740	tcacgaattcgcaaggccagtctggccagggctcgagcggtggcagcggtggctctggtggatccggcggtggca
CX741	tggtggatccggcggtggcagcggtggtggctccggcggtaccggcggtagcggtagatctgacaaaactcacac
CX747	gatccccgtctccgccagtcaaaatgatgccggaaggcggtac
CX748	cgccttccggcatcattttgactggcggagacggg

抗ＥＧＦＲ　ＡＡの発現ベクターの構築

プラスミドｐＸ－ｓｃＦｖ２２５ｍ－ＨＬを、プライマーＣＸ７３０／ＣＸ７３１およびＣＸ７３２／ＣＸ７３３を用いた別々の反応でＰＣＲ増幅し、生じた生成物を、外部プライマーＣＸ７３０／ＣＸ７３３を用いた重複ＰＣＲによって増幅し、ＢｇｌＩＩ／ＮｏｔＩで消化し、ｐＸＭａｌのＢａｍＨＩ／ＮｏｔＩ内にクローニングして、プラスミドｐＸ－ｓｃＦｖ２２５ｍ－ＬＨがもたらされた。

【０３９５】

リンカー配列を、重複順方向プライマーＣＸ７４０、ＣＸ７４１および逆方向プライマ

ーＣＸ３７０を用いた反応において、ｐＦＵＳＥ－ｈＩｇＧ－Ｆｃ２のＰＣＲ増幅によって、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ断片の遺伝子のＮ末端側に付加した。生じた生成物をＥｃｏＲＩ／ＢｇｌＩＩで消化し、約１１５ｂｐの断片をｐＦＵＳＥ－ｈＩｇＧ－Ｆｃ２のＥｃｏＲＩ／ＢｇｌＩＩ内にクローニングした。生じたプラスミドをＫｐｎＩ／ＢｇｌＩＩで消化し、大きな断片を、ＫｐｎＩ／ＢａｍＨＩで消化した、ｐＸ－ｓｃＦｖ２２５ｍ－ＬＨをオリゴＣＸ７３６／ＣＸ７３５を用いて増幅したＰＣＲの産物とライゲーションさせて、プラスミドｐＰＨＢ３７３４がもたらされた。

【０３９６】

生じたプラスミドをＳｆｉＩ／ＸｈｏＩで消化し、マスキングペプチド３６９０をｐＰＨＢ３６９０のＳｆｉＩ／ＸｈｏＩ断片としてクローニングして、プラスミドｐＰＨＢ３７８３がもたらされた。

【０３９７】

生じたプラスミドをＢａｍＨＩ／ＫｐｎＩで消化し、アニーリングの産物であるリン酸化オリゴＣＸ７４７／ＣＸ７４８とライゲーションさせることによって、プロテアーゼ基質ＳＭ９８４を付加して、プラスミドｐＰＨＢ３８２２がもたらされた。

【０３９８】

生じたプラスミドをＸｈｏＩで消化し、５’末端を脱リン酸化し、ＸｈｏＩで消化した、ｐＰＨＢ３５７９をプライマーＣＸ２６８／ＣＸ４４８を用いて増幅したＰＣＲ産物をクローニングすることによって、タンデムペプチドマスキングを構築して、プラスミドｐＰＨＢ３８８９がもたらされた。

【０３９９】

ｐＰＨＢ３７８３、ｐＰＨＢ３８２２、およびｐＰＨＢ３８８９のマスキング領域、リンカー、基質、および軽鎖可変領域を、プライマーＣＸ３２５／ＣＸ６９６を用いたＰＣＲによって増幅し、ＥｃｏＲＩ／ＢｓｉＷＩで消化し、ｐＦＩＬ２－ＣＬ$_{225}$のＥｃｏＲＩ／ＢｓｉＷＩ内にクローニングして、それぞれＡＡ軽鎖発現ベクターｐＰＨＢ４００７、ｐＰＨＢ３９０２、およびｐＰＨＢ３９１３がもたらされた。

【０４００】

親和性成熟したマスキングペプチドを、ＳｆｉＩ／ＸｈｏＩ断片としてクローニングすることによってＡＡ軽鎖発現ベクター内に交換した。プロテアーゼ基質はＢａｍＨＩ／ＫｐｎＩに適合性のある断片として交換した。

【０４０１】

抗ＥＧＦＲ抗体およびＡＡの発現および精製

３μｇのｐＦＩＬ－ＣＨ$_{225}$－ＨＬおよび３μｇのｐＦＩＬ２－ＣＨ２２５－軽を、Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、製造者のプロトコルに従って、ＣＨＯ－Ｓ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）内に同時トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞をＦｒｅｅｓｔｙｌｅ　ＣＨＯ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中で培養し、ゼオシンおよびブラストサイジンに対する耐性について選択した。
個々のクローンを限界希釈によって単離し、ＥＬＩＳＡによってＥＧＦＲと結合することができるヒトＩｇＧの発現について選択した。すべての抗体およびＡＡは、標準の技法を用いたタンパク質Ａクロマトグラフィーによって精製した。

【０４０２】

同様に、３μｇのＡＡの軽鎖のそれぞれの発現ベクターを、３μｇのｐＦＩＬ－ＣＨ$_{225}$－ＨＬと共にＣＨＯ－Ｓ細胞内に同時トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞をＦｒｅｅｓｔｙｌｅ　ＣＨＯ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中で培養し、ゼオシンおよびブラストサイジンに対する耐性について選択した。個々のクローンを限界希釈によって単離し、ＥＬＩＳＡによってＥＧＦＲと結合することができるヒトＩｇＧの発現について選択した。

【０４０３】

親和性成熟した抗ＥＧＦＲ　ＭＭライブラリのスクリーニング。

【０４０４】

初回のＭＡＣＳラウンドは、ＳＡ　ｄｙｎａｂｅａｄｓおよびｅｃｐＸ３－７５５ライブラリからの１．４×１０^{8}個の細胞を用いて行った。磁気選択の前に、細胞を３ｎＭのビオチン標識したＣ２２５Ｍａｂと共にインキュベーションした。磁気選択により、６×１０^{6}個の細胞の単離がもたらされた。第１ラウンドのＦＡＣＳ分別は、０．１ｎＭのＤｙＬｉｇｈｔ（ｆｌｕｏｒ　５３０　ｎＭ）－Ｃ２２５Ｍａｂで標識した２×１０^{7}個の細胞上で行い、１．５×１０^{5}個の陽性結合を有する細胞の単離がもたらされた。集団に増加した選択圧をかけるために、第２ラウンドのＦＡＣＳは、１０ｎＭのＤｙＬｉｇｈｔ－Ｃ２２５Ｍａｂで標識した細胞上で、１００ｕＭの３６９０ペプチド（ＣＩＳＰＲＧＣ）の存在下、３７℃で行った。選択圧をさらに増加させるために、第３および第４ラウンドは、１００ｎＭのＤｙＬｉｇｈｔ－Ｃ２２５Ｆａｂで標識した細胞上で、１００ｕＭの３６９０ペプチド（ＣＩＳＰＲＧＣ）の存在下、３７℃で行った。陽性集団の最も明るい１％を収集し、これは、３６９０ペプチドによって競合されない結合を表す。上記スクリーニングから単離された個々のクローンの細胞上親和性測定により、Ｃ２２５に対する親和性が３６９０（ＣＩＳＰＲＧＣ）よりも少なくとも１００倍高い３つのペプチド、すなわち、３９５４（ＣＩＳＰＲＧＣＰＤＧＰＹＶＭ）、３９５７（ＣＩＳＰＲＧＣＥＰＧＴＹＶＰＴ）および３９５８（ＣＩＳＰＲＧＣＰＧＱＩＷＨＰＰ）が明らかとなった。これら３つのＭＭを抗ＥＧＦＲ　ＡＡ内に組み込んだ。図２２は、ＥＧＦＲ　ＭＭの一部の親和性成熟のプロセスを示す。

【０４０５】

Ｃ２２５　ＭＭの親和性測定

Ｃ２２５　ＦａｂとＭＭ３６９０、３９５４および３９５７との結合の細胞上親和性測定。ｅＣＰＸ３．０クローン３６９０、３９５４および３９５７の結合を、ＦＡＣＳ上にて、３つの異なる濃度のＤｙＬｉｇｈｔで標識した抗ＥＧＦＲ　Ｆａｂで分析した。結合曲線を図２３に示す。ＭＭ３９５４および３９５７は３６９０よりも少なくとも１００倍高い親和性を示した。

【０４０６】

抗ＥＧＦＲ　ＡＡの標的置換アッセイ

ＥＧＦＲを９６ウェルマイクロタイタープレートのウェル上に吸着させ、乳タンパク質で洗浄および遮断した。２ｎＭの抗ＥＧＦＲ抗体またはＭＭ３６９０、３９５７、３９５４および３９６０／３５７９を含有する抗ＥＧＦＲ　ＡＡを含有する２５ｍｌの培養培地をコーティングしたウェルに加え、１、２、４、８または２４時間インキュベーションした。インキュベーション後、ウェルを洗浄し、結合したＡＡの程度を抗ｈｕＩｇＧ免疫検出によって測定した。ＡＡのコンテキストにおけるマスキング効率を直接比較するために、抗ＥＧＦＲ　ＡＡの結合を抗ＥＧＦＲ抗体結合（１００％）に対して正規化した。親または改変していない抗体結合のパーセントとしての平衡結合の程度を表３４および図２４に示す。ＭＭ３９５４および３９５７は、３６０９よりも１００倍高い、同じ親和性を示す一方で、３９５４は標的結合の阻害が少なくとも２倍、より効率的である。Ｃ２２５の重鎖および軽鎖、ＭＭ、ならびにＡＡの配列を以下の表に提供する。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を以下の表に提供する。括弧は様々な配列のドメイン間の境界を示す：（リンカー）（ＭＭ）（リンカー）（ＣＭ）（リンカー）（ＡＢ）。

【０４０７】

【表３４】

表34　：C225 TDA: それぞれの時点での親抗体結合±SEMのパーセント

時間(時間)	3690 AA	3954 AA	3975 AA	3690/3579 AA
1	15.5 ± 4.2	4.4 ± 1.8	7.3 ± 2.0	3.6 ± 1.2
2	19.3 ± 6.0	6.0 ± 2.0	9.3 ± 2.8	2.1 ± 0.6
4	21.5 ± 5.0	7.6 ± 1.7	12.8 ± 2.3	3.3 ± 1.2
8	27.6 ± 7.4	9.7 ± 0.4	14.9 ± 0.03	3.0 ± 1.6
24	20.0 ± 9.1	13.4 ± 1.2	22.3 ± 2.6	2.8 ± 0.1

【０４０８】
【表３５】

表　35: C225 重鎖

caggtgcagctgaaacagagcggcccgggcctggtgcagccgagccagagcctgagcattacctgcaccgtgagcggctttagcctgaccaactatg
gcgtgcattgggtgcgccagagcccgggcaaaggcctggaatggctgggcgtgatttggagcggcggcaacaccgattataacaccccgtttaccag
ccgcctgagcattaacaaagataacagcaaaagccaggtgtttttttaaaatgaacagcctgcaaagcaacgataccgcgatttattattgcgcgcgcgcg
ctgacctattatgattatgaatttgcgtattggggccagggcaccctggtgaccgtgagcgcggctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcac
cctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgc
cctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcac
ccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagcgcgttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccac
cgtgcccagcacctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacat
gcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggg
aggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaac
aaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgaa
ctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaca
actacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtc
ttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFT
SRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０４０９】
【表３６】

表　36: 3690-SM984-C225 軽鎖の配列

Caaggccagtctggccagtgcatctcgccccgtggttgtggaggctcgagcggtggcagcggtggctctggtggatccccgtctccgccagtcaaaat
gatgccggaaggcggtacccagatcttgctgacccagagccccggtgattctgagcgtgagccccgggcgaacgtgtgagctttagctgccgcgcgagc
cagagcattggcaccaacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagccccgcgcctgctgattaaatatgcgagcgaaagcattagcggcatccg
agccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggattattattgccagcagaacaac
aactggccgaccacctttggcgcgggcaccaaactggaactgaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttga
aatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcc
caggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagt
ctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagcg

リンカー　MM　リンカー　CM　リンカー　AB
(QGQSGQ)(CISPRGC)(GGSSGGSGGSGGS)(PSPPVKMMPE)(GG)(TQILLTQSPVILSVSPGERVSFS
CRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ
NNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGA)

【０４１０】

【表３７】

表　37: 3579-NSUB-C225 軽鎖の配列

caaggccagtctggccagggttcacattgtctcattcctattaacatgggcgcgccgtcatgcggctcgagcggtggcagcggtggctctggtggatccg
gcggtggcagcggtggtggctccggcggtacccagatcttgctgacccagagccccggtgattctgagcgtgagcccgggcgaacgtgtgagctttagc
tgccgcgcgagccagagcattggcaccaacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagccccgcgcctgctgattaaatatgcgagcgaaagcat
tagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggattattattgc
cagcagaacaacaactggccgaccaccttggcgcgggcaccaaactggaactgaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctg
atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaa
tcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgag
aaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagcg

リンカー　MM　リンカー　AB

(QGQSGQ)(GSHCLIPINMGAPSC)(GSSGGSGGSGGSGGGSGGGSGG)(TQILLTQSPVILSVSPGER
VSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADY
YCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGA)

【０４１１】

【表３８】

表　38:　3690-3579-SM984-C225 軽鎖の配列

caaggccagtctggccagtgcatctcgccccgtggttgtggaggctcgagcgctagccagtctggccagggttcacattgtctcattcctattaacatggg
cgcgccgtcatgcggctcgagcggtggcagcggtggctctggtggatccccgtctccgccagtcaaaatgatgccggaaggcggtacccagatcttgc
tgacccagagccccggtgattctgagcgtgagcccgggcgaacgtgtgagctttagctgccgcgcgagccagagcattggcaccaacattcattggtatc
agcagcgcaccaacggcagccccgcgcctgctgattaaatatgcgagcgaaagcattagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggca
ccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggattattattgccagcagaacaacaactggccgaccaccttggcgcgggcac
caaactggaactgaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctg
aataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaa
ggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctg
agctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagcg

リンカー　MM　リンカー　CM

(QGQSGQ)(CISPRGCGGSSASQSGQGSHCLIPINMGAPSC)(GSSGGSGGSGGS)(PSPPVKMMPE)

リンカー　AB

(GG)(TQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA
SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGA)

【０４１２】

【表３９】

表　39: 3954-NSUB-C225 軽鎖の配列

caaggccagtctggccagtgcatctcacctcgtggttgtccggacggcccatacgtcatgtacggctcgagcggtggcagcggtggctctggtggatcc
ggcggtggcagcggtggtggctccggcggtacccagatcttgctgacccagagcccggtgattctgagcgtgagcccgggcgaacgtgtgagctttа
gctgccgcgcgagccagagcattggcaccaacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgcctgctgattaaatatgcgagcgaaagc
attagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggattattattg
ccagcagaacaacaactggccgaccacctttggcgcgggcaccaaactggaactgaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatct
gatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcca
atcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagcg

リンカー　MM　リンカー　AB
(QGQSGQ)(CISPRGCPDGPYVMY)(GSSGGSGGSGGSGGGSGGGSGG)(TQILLTQSPVILSVSPGER
VSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADY
YCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGA)

【０４１３】
【表４０】

表　40: 3957-NSUB-C225 軽鎖の配列

caaggccagtctggccagtgcatctcacctcgtggttgtgagcctggcacctatgttccaacaggctcgagcggtggcagcggtggctctggtggatcc
ggcggtggcagcggtggtggctccggcggtacccagatcttgctgacccagagcccggtgattctgagcgtgagcccgggcgaacgtgtgagctttа
gctgccgcgcgagccagagcattggcaccaacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgcctgctgattaaatatgcgagcgaaagc
attagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggattattattg
ccagcagaacaacaactggccgaccacctttggcgcgggcaccaaactggaactgaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatct
gatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcca
atcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagcg

リンカー　MM　リンカー　AB
(QGQSGQ)(CISPRGCEPGTYVPT)(GSSGGSGGSGGSGGGSGGGSGG)(TQILLTQSPVILSVSPGER
VSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADY
YCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGA)

【０４１４】
【表４１】

表　41: 3958-NSUB-C225 軽鎖の配列

caaggccagtctggccagtgcatctcacctcgtggttgtccgggccaaatttggcatccacctggctcgagcggtggcagcggtggctctggtggatcc
ggcggtggcagcggtggtggctccggcggtacccagatcttgctgacccagagcccggtgattctgagcgtgagcccgggcgaacgtgtgagctttа
gctgccgcgcgagccagagcattggcaccaacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgcctgctgattaaatatgcgagcgaaagc
attagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggattattattg
ccagcagaacaacaactggccgaccacctttggcgcgggcaccaaactggaactgaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatct
gatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcca
atcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagcg

リンカー　MM　リンカー　AB
(QGQSGQ)(CISPRGCPGQIWHPP)(GSSGGSGGSGGSGGGSGGGSGG)(TQILLTQSPVILSVSPGER
VSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADY
YCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGA)

【０４１５】

【表４２】

表　42: C225 MM の配列

3690	CISPRGCG
3579	GSHCLIPINMGAPSC
3690-3579	CISPRGCGGSSASQSGQGSHCLIPINMGAPSC
3954	CISPRGCPDGPYVMY
3957	CISPRGCEPGTYVPT
3958	CISPRGCPGQIWHPP
4124	CNHHYFYTCGCISPRGCPG
4125	ADHVFWGSYGCISPRGCPG
4127	CHHVYWGHCGCISPRGCPG
4133	CPHFTTTSCGCISPRGCPG
4137	CNHHYHYYCGCISPRGCPG
4138	CPHVSFGSCGCISPRGCPG
4140	CPYYTLSYCGCISPRGCPG
4141	CNHVYFGTCGCISPRGCPG
4143	CNHFTLTTCGCISPRGCPG
4148	CHHFTLTTCGCISPRGCPG
4157	YNPCATPMCCISPRGCPG

ＥＧＦＲ　ＭＭのコンセンサス配列

ＥＧＦＲ　ＭＭのコンセンサス配列を以下に提供する。３６９０　ＭＭコンセンサス（ＣＩＳＰＲＧＣ）は、主要なコンセンサス配列の１つである。

【０４１６】

【表４３】

表　43: C225 EGFR MM のコンセンサス配列

PHB4124 CNHHYFYTCGCISPRGCG
PHB4137 CNHHYHYYCGCISPRGCG
PHB4141 CNHVYFGTCGCISPRGCG
PHB4127 CHHVYWGHCGCISPRGCG
PHB4133 CPHFTTTSCGCISPRGCG
PHB4143 CNHFTLTTCGCISPRGCG
PHB4148 CHHFTLTTCGCISPRGCG
PHB4140 CPYYTLSYCGCISPRGCG
PHB4138 CPHVSFGSCGCISPRGCG
PHB4125 ADHVFWGSYGCISPRGCG
PHB4157 YNPCATPMCCISPRGCG
PHB4127 CHHVYWGHCGCISPRGCG

より高い親和性マスキングのためのスクリーニングの第2ラウンドからのEGFRコンセン サス配列

C(N/P)H(H/V/F)(Y/T)(F/W/T/L)(Y/G/T/S)(T/S/Y/H)CGCISPRGCG

CISPRGCGQPIPSVK
CISPRGCTQPYHVSR
CISPRGCNAVSGLGS

（実施例１７）

選択的基質／ＣＭの発見および試験

下のセクションは、いくつかの例示的な酵素のための選択的基質の発見および試験のための方法を示す。

【０４１７】

ｕＰＡ選択的基質の発見

ｕＰＡ選択的基質は、Ｅ．ｃｏｌｉの表面のＮ末端融合物として発現される、約10^8

個のランダムな８量体基質からなる８ｅＣＬｉＰＳ細菌ライブラリから単離した。ｕＰＡによる切断のために最適化され、標的外セリンプロテアーゼｋｌｋ５および７による切断に抵抗性である基質について濃縮するために、交互に実行したＦＡＣＳによる陽性および陰性の選択を用いた。ナイーブなライブラリを８ｕｇ／ｍｌ　ｕＰＡと共に３７℃で１時間インキュベーションし、続いてＳＡＰＥ（赤色）およびｙＰＥＴ　ｍｏｎａ（緑色）で標識した。ｕＰＡによる切断は、ＳＡＰＥ標識の消失を生じ、ｕＰＡ基質を発現する細菌（緑色だけ、陽性選択）の、未切断のペプチドを発現する細菌（赤色＋緑色）からの選別を可能にする。ｕＰＡ基質をＦＡＣＳによって選別し、濃縮されたプールを増幅し、次に５ｎｇ／ｍｌ　ＫＬＫ５および７と共に３７℃で１時間インキュベーションし、ＳＡＰＥおよびｙＰＥＴ　ｍｏｎａで標識し、これらの標的外プロテアーゼによる切断の欠如について選別した（赤色＋緑色、陰性選択）。プールを増幅し、暫減濃度のｕＰＡ（４ｕｇ／ｍｌ、２ｕｇ／ｍｌ）および暫増濃度のｋｌｋ５および７（５ｎｇ／ｍｌ、１０ｎｇ／ｍｌ）を用いて、さらなる４ラウンドの陽性および陰性交互ＦＡＣＳで選別した。ＦＡＣＳの最後の３ラウンドからの個々のクローンを配列決定し、いくつかのコンセンサスに分類した（表４４）。次に、表４４の標的対標的外プロテアーゼによる切断の特異性について、各コンセンサスからのクローンを、ｕＰＡ、ｋｌｋ５および７、ならびにプラスミンの様々な濃度による切断について個々に分析した。図２５は、ｕＰＡ対照および基質ＳＭ１６と違って、ＫＫ１２０３、１２０４および１２１４は、ＫＬＫ５、ＫＬＫ７およびプラスミンによる切断に抵抗性を示すことを示す。

【０４１８】

【表４４】

表　44: uPA コンセンサス配列

```
       (1) 1         9
 kk1203(1) TGPGPS-WV
 kk1206(1) SAPGPSRW-
 kk1216(1) TARGPSFK-
コンセンサス (1) TARGPS W

       (1) 1          11
 kk1204 (1) ---LSGRSDNH
 kk1208 (1) GGWHTGRN---
 kk1211 (1) ---HTGPSGRL
 kk1214 (1) --PLTGRSGS-
コンセンサス (1)    LTGRSGA

       (1) 1         10
 kk1217 (1) AARGPAIH--
 kk1219 (1) --RGPAFNPM
       (1) 1         10
 kk1196 (1) SSKGPAYL--
 kk1201 (1) --RGPATPIM
コンセンサス (1)   RGPA
```

プラスミン選択的基質の発見

プラスミン選択的基質は、Ｅ．ｃｏｌｉの表面のＮ末端融合物として発現される、約10^8個のランダムな１０量体基質からなる第２世代プラスミン１０ｅＣＬｉＰＳ細菌ライブラリから単離した（ｒｅｆ）。プラスミンによる切断のために最適化され、標的外マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ－９で表す）およびセリンプロテアーゼ（ｋｌｋ５およびｋｌｋ７で表す）による切断に抵抗性である基質について濃縮するために、交互に実行したＦＡＣＳによる陽性および陰性の選択を用いた。

【０４１９】

第２世代プラスミン１０ｅＣＬｉＰＳライブラリは、選択のために３０ｐＭの低プラスミン濃度を用いて、速やかに切断されたプラスミン基質についてナイーブな８ｅＣＬｉＰＳを選択することによって社内で同定されたコンセンサス配列に基づいた。好ましからぬ

標的外配列から下方選択するために柔軟性を可能にしつつ、ペプチドをコンセンサス配列の方へ傾かせるために、１０量体の中の個々の残基は、ランダム（ｎ＝２０）、制限（１＜ｎ＞２０）または固定（ｎ＝１）であった。

【０４２０】

第２世代プラスミン１０ｅＣＬｉＰＳライブラリを３００ｐＭプラスミンと共に３７℃で１時間インキュベーションし、続いてＳＡＰＥ（赤色）およびｙＰＥＴ　ｍｏｎａ（緑色）で標識した。プラスミンによる切断は、ＳＡＰＥ標識の消失を生じ、プラスミン基質を発現する細菌（緑色だけ、陽性選択）の、未切断のペプチドを発現する細菌（赤色＋緑色）からの選別を可能にする。プラスミン基質をＦＡＣＳによって選別し、濃縮されたプールを増幅し、次に８０Ｕ／ｍｌ　ＭＭＰ－９と共に３７℃で２時間インキュベーションし、ＳＡＰＥおよびｙＰＥＴ　ｍｏｎａで標識し、これらの標的外プロテアーゼによる切断の欠如について選別した（赤色＋緑色、陰性選択）。プールを増幅し、プラスミン（第３ラウンド１００ｐＭまたは３００ｐＭ、第５ラウンド１００ｐＭまたは３００ｐＭ）ならびにｋｌｋ５および７（第４ラウンド１００ｎｇ／ｍｌ、第６ラウンド２００ｎｇ／ｍｌ）を用いて、さらなる４ラウンドの陽性および陰性交互ＦＡＣＳで選別した。ＦＡＣＳの最後の２ラウンドの各々からの個々のクローンを配列決定した（表４５）。次に、標的対標的外プロテアーゼによる切断の特異性について、各コンセンサスからのクローンを、プラスミン、ＭＭＰ－９、ｋｌｋ５およびｋｌｋ７による切断について個々に分析した。プラスミン切断に対する特異性の増加を示す代表的なデータを、図２６に示す。図２６は、非最適化基質と違って、最適化された基質Ｐｌａｓ１２３７、Ｐｌａｓ１２９およびＰｌａｓ１２５４は、ＫＬＫ５、ＫＬＫ７による切断に抵抗性を示すことを示す。

【０４２１】

【表４５】

表45：3ラウンドのプラスミン切断についての陽性選択およびMMP9、KLK5および KLK7についての陰性選択に由来するペプチド配列

SM1191	EHPRVKVVSE
SM1197	PPPDMKLFPG
SM1200	PPPVLKLLEW
SM1203	VLPELRSVFS
SM1206	APPSFKLVNA
SM1212	PPPEVRSFSV
SM1214	ALPSVKMVSE
SM1215	ETPSVKTMGR
SM1219	AIPRVRLFDV
SM1224	GLGTPRGLFA
SM1276	DRPKVKTMDF
SM1275	RVPKVKVMLD
SM1274	APPLVKSMVV
SM1272	REPFMKSLPW
SM1270	PVPRLKLIKD
SM1269	KGPKVKVVTL
SM1268	ERPGVKSLVL
SM1267	NZPRVRLVLP
SM1265	PRPFVKSVDQ
SM1263	RFPSLKSFPL
SM1261	ESPVMKSMAL
SM1260	VAPQLKSLVP
SM1255	APPLVKSMVV
SM1254	NMPSFKLVTG
SM1245	DRPEMKSLSG
SM1244	EQPEVKMVKG
SM1243	AVPKVRVVPE
SM1241	DLPLVKSLPS
SM1240	EAPKVKALPK
SM1239	GFPHMKTFQH
SM1238	YDPZVKVVLA
SM1237	ASPTMKTVGL
SM1236	DVPPMKTLRP
SM1235	AFPDMRSVRS
SM1234	SAPYFRMMDM
SM1233	EKPRMKLFQG
SM1231	YVPRVKALEM

ｕＰＡ酵素活性化ＡＡ配列

ｕＰＡ酵素活性化抗ＶＥＧＦ軽鎖ＡＡのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、下の表に提供する。括弧は、様々な配列のドメイン間の境界を示す：（リンカー）（ＭＭ）（リンカー）（ＣＭ）（リンカー）（ＡＢ）。

【０４２２】

【表４６】

表　46: PFIL2-CLIg-HK- 抗 -VegF 306 KK1203 LC

ggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgttgctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagg
tactggccgtggtccaagctgggttggcagtagcggcggttctgatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgtta
cgatcacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttca
ctgcattccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactg
tcagcaatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctg
atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaa
tcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgag
aaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー　MM　リンカー　CM　リンカー　AB
(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(GTGRGPSWVGSS)(GGS)(DIQLTQSPSSL
SASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC)

【０４２３】

【表４７】

表　47: PFIL2-CLIg-HK- 抗 VegF 306 KK1204 LC

ggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgttgctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagg
tctgagcggccgttccgataatcatggcagtagcggcggttctgatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgtta
cgatcacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttca
ctgcattccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactg
tcagcaatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctg
atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaa
tcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgag
aaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー　MM　リンカー　CM　リンカー　AB
(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(GLSGRSDNHGSS)(GGS)(DIQLTQSPSSL
SASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC)

【０４２４】

【表４８】

表　48: PFIL2-CLIg-HK- 抗 VegF 306 KK1214 LC

ggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgttgctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaacc
actgactggtcgtagcggtggtggaggaagtagcggcggttctgatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgtt
acgatcacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttc
actgcattccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattact
gtcagcaatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatct
gatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcca
atcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacga
gaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー　MM　リンカー　CM　リンカー　AB
(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(PLTGRSGGGGSS)(GGS)(DIQLTQSPSSL
SASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC)

【０４２５】
【表４９】

表　49: PFIL2-CLIg-HK- 抗 VegF 306 SM1215 LC

ggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgttgctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaaga
aactccatctgtaaagactatgggccgtagtagcggcggttctgatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttac
gatcacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcact
gcattccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtc
agcaatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgat
gagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatc
gggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaa
aacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー	MM	リンカー	CM	リンカー	AB

GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(ETPSVKTMGRSS)(GGS)(DIQLTQSPSSLS
ASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC)

プラスミン活性化ＡＡ配列
プラスミン酵素活性化抗ＶＥＧＦ軽鎖ＡＡのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、下の表に提供する。括弧は、様々な配列のドメイン間の境界を示す：（リンカー）（ＭＭ）（リンカー）（ＣＭ）（リンカー）（ＡＢ）。

【０４２６】
【表５０】

表　50: PFIL2-CLIg-HK- 抗 VegF 306 SM1239 LC

ggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgttgctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagg
tttcccacatatgaaaactttccagcatagtagcggcggttctgatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacg
atcacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactg
cattccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtca
gcaatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg
agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcg
ggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaa
acacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー	MM	リンカー	CM	リンカー	AB

(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(GFPHMKTFQHSS)(GGS)(DIQLTQSPSSL
SASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC)

レグマイン活性化ＡＡ
レグマイン基質ＡＡＮＬおよびＰＴＮＬの配列は、当技術分野で公知である（Ｌｉｕら２００３年。Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ６３巻、２９５７～２９６４頁；Ｍａｔｈｉｅｕら２００２年。Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ａｎｄ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｐａｒａｓｉｔｏｌｏｇｙ１２１巻、９９～１０５頁）。レグマイン酵素活性化抗ＶＥＧＦ軽鎖ＡＡのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、下の表に提供する。括弧は、様々な配列のドメイン間の境界を示す：（リンカー）（ＭＭ）（リンカー）（ＣＭ）（リンカー）（ＡＢ）。

【０４２７】

【表５１】

表 51: PFIL2-CLIg-HK- 抗 VEGF 306 AANL 軽鎖

ggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgttgctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagc
agctaatctgggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatc
acttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcat
tccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagc
aatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgag
cagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaaca
caaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー **MM** リンカー **CM** リンカー **AB**

(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(AANLGSGGSS)(GGS)(DIQLTQSPSSLSA
SVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC)

【０４２８】

【表５２】

表 52: PFIL2-CLIg-HK- 抗 VEGF 306 PTNL 軽鎖

ggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgttgctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaacc
gactaatctgggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatc
acttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcat
tccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagc
aatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgag
cagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaaca
caaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー **MM** リンカー **CM** リンカー **AB**

(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(PTNLGSGGSS)(GGS)(DIQLTQSPSSLSAS
VGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC)

【０４２９】

【表５３】

表　53: PFIL2-CLIg-HK- 抗 VEGF 306 PTN 軽鎖

ggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgttgctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaacc
gactaatggtggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatc
acttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcat
tccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagc
aatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgag
cagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaaca
caaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー　MM　リンカー　CM　リンカー　AB

(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(PTNGGSGGSS)(GGS)(DIQLTQSPSSLSA
SVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC)

カスパーゼ活性化ＡＡ

カスパーゼ酵素活性化抗ＶＥＧＦ軽鎖ＡＡのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、下の表に提供する。括弧は、様々な配列のドメイン間の境界を示す：（リンカー）（ＭＭ）（リンカー）（ＣＭ）（リンカー）（ＡＢ）。カスパーゼ基質、配列ＤＥＶＤは、当技術分野で公知である。

【０４３０】

【表５４】

表　54: PFIL2-CLIg-HK- 抗 VegF 306 DEVD LC

ggccagtctggccagccgtgttctgagtggcagtcgatggtgcagccgcgttgctattatgggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaaga
cgaagtcgatggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactgacccagagcccttcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatc
acttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcat
tccggcgtaccgtcgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagtctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagc
aatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgag
cagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaaca
caaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

リンカー　MM　リンカー　CM　リンカー　AB

(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(DEVDGSGGSS)(GGS)(DIQLTQSPSSLSA
SVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC)

レグマインおよびカスパーゼ活性化ＡＡ発現ベクターの構築

基質は、２段階法で構築された。第一に、ＣＸ０３２５フォワードプライマーを基質特異的リバースプライマー（ＣＸ０７２０　ＡＡＮＬ、ＣＸ０７２２　ＰＴＮＬ、ＣＸ０７２４　ＰＴＮおよびＣＸ０７５８　ＤＥＶＤ）と一緒に用いて２つの生成物をＰＣＲ増幅し、他は、ＣＸ０５６４リバースプライマーを基質特異的フォワードプライマー（ＣＸ０７２１　ＡＡＮＬ、ＣＸ０７２３　ＰＴＮＬ、ＣＸ０７２５　ＰＴＮおよびＣＸ０７５４　ＤＥＶＤ）と一緒に用いてＰＣＲ増幅した。いずれの場合にも、ＰＣＲの基質は、抗ＶＥＧＦ　ｍｍｐ－９　３０６　ｓｃＦｖであった。第二に、２つの生成物を合わせ、外側プライマーＣＸ０３２５およびＣＸ０５６４を用いてＰＣＲ増幅した。ＥｃｏＲＩおよびＸｈｏＩ制限部位を用いて、最終生成物をｐＦＩＬ２－ＣＬ－抗ＶＥＧＦ　Ｌｃにクローニングした。

【０４３１】

【表５５】

表55:レグマインおよびカスパーゼ活性化AA発現ベクターの構築のためのプライマー

CXO564	aggttgcagactcgagatagtcagggtgaagtc
CX0720	tcctccgctgcccagattagctgcttggccaccttggccgctgccac
CX0721	gcagctaatctgggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactg
CX0722	tcctccgctgcccagattagtcggttggccaccttggccgctgccac
CX0723	ccgactaatctgggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactg
CX0724	tcctccgctgccaccattagtcggttggccaccttggccgctgccac
CX0725	ccgactaatggtggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactg
CX0754	gacgaagtcgatggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactg
CX0758	tcctccgctgccatcgacttcgtcttggccaccttggccgctgccac

レグマイン活性化ＡＡの発現および精製

３μｇのｐＦＩＬ－ＶＥＧＦ－ＨＬおよび３μｇのｐＦＩＬ２－３０６－基質－ＶＥＧＦ－軽を、製造業者のプロトコルに従ってＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ２００（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、ＣＨＯ－Ｓ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に同時トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞をＦｒｅｅｓｔｙｌｅ　ＣＨＯ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で培養し、ゼオシンおよびブラストサイジン抵抗性について選択した。個々のクローンを限界希釈によって単離し、ＥＧＦＲに結合することができるヒトＩｇＧの発現についてＥＬＩＳＡによって選択した。標準の技術を用いて、すべての抗体およびＡＡをプロテインＡクロマトグラフィーによって精製する。

【０４３２】

ｓｃＦｖ　ＡＡ消化物のためのアッセイの説明

ＳｃＦｖ　ＡＡをアッセイ緩衝液で２００ｎＭに希釈し、２ｕｇ／ｍｌでアッセイ緩衝液に希釈したｒｈＬｅｇｕｍａｉｎと合わせた。消化物を、室温で一晩インキュベーションした。ＩｇＧ　ＡＡをアッセイ緩衝液で２００ｎＭに希釈し、２～４０ｍｇ／ｍＬの濃度でアッセイ緩衝液に希釈したｒｈＬｅｇｕｍａｉｎと合わせた（最終ｒｈＬｅｇｕｍａｉｎ濃度１ｕｇ／ｍｌ、５ｕｇ／ｍｌ、２０ｕｇ／ｍｌ）。消化物を３７℃で一晩インキュベーションした。消化の後に、抗ヒトＦｃで可視化したＥＬＩＳＡプレート上のＶＥＧＦへのＡＡ結合の程度によって、活性化の程度を測定した。図２７のパネルＡは、５ｍｇ／ｍＬレグマイン処理に続く、レグマイン基質ＡＡＮＬおよびＰＴＮＬを含むＳｃＦｖ　ＡＡの活性化を示す。パネルＢは、レグマイン基質ＰＮＴＬを含む抗ＶＥＧＦ　ＩｇＧ　ＡＡの活性化を示す。

【０４３３】

レグマイン活性化ＡＡのｉｎ　ｖｉｖｏ安定性

４匹の１２週齢Ｂａｌｂ／Ｃマウスに、プラスミン活性化ＡＡ、ＡＡ^{ＰＬＡＳ}ＶＥＧＦまたはレグマイン活性化ＡＡ、ＡＡ^{ＡＡＮＬ}ＶＥＧＦまたはＡＡ^{ＰＴＮＬ}ＶＥＧＦの１つの１００μｇの単一のボーラス注射を各々投与した。注射から１５分、１日、３日および７日後に、血清を収集した。総ＡＡ濃度は、血清中の総ヒトＦｃのＥＬＩＳＡ測定値から計算した。活性化抗体の濃度は、ヒトＶＥＧＦ結合ＥＬＩＳＡ測定値から計算し、それを図２８に示す。注射から７日後までに血清から単離されたレグマイン活性化ＡＡは、マスキングされたままである。（ｎ＝４）。各時点の総ＡＡに対する活性化ＡＡの比は、個々の動物からの測定値の平均として図２８に示し、活性化率で表す。プラスミン活性化ＡＡは７日後にほとんど完全に活性化されるが、レグマイン活性化ＡＡの両方は最小限にしか活性化されない。

【０４３４】

（実施例１８）

ＡＡの血清半減期

図２９は、マスキングされた単鎖Ｆｖ－Ｆｃ融合プロ抗体が血清半減期の増大を示すことを示す。マスキングポリペプチドは、マスキングが、抗体結合部位と相互作用して熱力学的安定性増大させ、または中和抗体をブロッキングすることができるように、抗体のＮ

末端に取り付けられる。プロテアーゼ基質を使用して、血清または特定の組織において様々な割合でマスキングの除去を可能にすることができる。

【０４３５】

図３０は、１０日間にわたる健康なマウスのｓｃＦｖ－Ｆｃ血清濃度を示す。Ｃ５７ＢＩ／６マウス（各時点ｎ＝３）に抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ－Ｆｃ、ＡＡ^{ＭＭＰ}ＶＥＧＦ（ＡＡ１）またはＡＡ^{ｐｌａｓｍｉｎ}ＶＥＧＦ（ＡＡ２）の単回用量（１５０ｕｇ）を投与した。示した時間に血清を採取し、全ｓｃＦｖ－Ｆｃの濃度をＥＬＩＳＡによって測定した。ＡＡ濃度は、投与後７日目まで安定なままであったが、親のｓｃＦｖ－Ｆｃ濃度は３日後に減少し、１０日目はほとんど検出不可能であった。

【０４３６】

図３１は、ＡＡ　ｓｃＦｖ－Ｆｃ濃度が腫瘍担持マウスにおける親のｓｃＦｖ－Ｆｃと比較して血清中で上昇し、より長く持続することを示す。抗ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ－Ｆｃ、ＡＡ^{ＭＭＰ}ＶＥＧＦ（ＡＡ１）またはＡＡ^{Ｐｌａｓｍｉｎ}ＶＥＧＦ（ＡＡ２）の同等の単回用量を、ＨＴ２９異種移植片（Ａ）またはＭＤＡ－ＭＢ－２３１異種移植片（Ｂ）を有するヌードマウスに投与した。示した時間に血清を採取し、全ｓｃＦｖ－Ｆｃの濃度をＥＬＩＳＡによって測定した。両方の試験において、最初のＡＡ投与のより高い割合が、３日目（Ｂ）ならびに３日目および７日目（Ａ）に血清において検出された。

【０４３７】

図３２は、多回投与試験においてＡＡがより高い濃度で持続することを示す。腫瘍担持Ｂａｌｂ／ｃ　ｎｕ／ｎｕマウスに親のＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ－Ｆｃ、ＡＡ１、２または３の５ｍｇ／ｋｇを３日毎に注入した。示した時間に血清を採取し、ＡＡまたは親ｓｃＦｖ－Ｆｃの濃度をＥＬＩＳＡによって測定した。３つすべてのＡＡは、試験全体にわたって親よりも有意に高い血清濃度を維持した。

【０４３８】

ＶＥＧＦ　ｓｃＦｖ－Ｆｃｓ　ＡＡのアミノ酸配列

【０４３９】

【表５６】

表56：AA scFvsが得られる抗VEGF scFv－Fcのアミノ酸配列

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGS
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGG
GGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEP
TYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVT
VSGGSGAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK

【０４４０】

【表５７】

表　57: AA^{MMP}VEGF: AAsは、以下に示すように短いリンカーによって結合されたマスキングペプチドおよびMMP基質を含有する

マスキングペプチド	基質
GQSGQPCSEWQSMVQPRCYY	GGGSGGSGQGGQVHMPLGFLGP

GGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCS
ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVTVSGGSGAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK

【０４４１】

【表５８】

表　58: $AA^{PLASMIN}$VEGF: AAsは、以下に示すように短いリンカーによって結合されたマスキングペプチドおよびプラスミン基質を含有する

マスキングペプチド	基質
GQSGQPCSEWQSMVQPRCYY	GGGSGGSGQGGQQGPMFKSLWD

GGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVTVSGGSGAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK

【０４４２】

【表５９】

表　59: $AA^{NoSubstrate}$VEGF AAsは、以下に示すようにマスキングペプチド、GlySer(GS)リンカーおよびVEGFを含有するが、基質は短いリンカーによって結合していない

マスキングペプチド	基質
PCSEWQSMVQPRCYY	GGSGGGSGQSGQGGSGGSGQGGQGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCS

ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVTVSGGSGAMVRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK

ＡＡは親の抗体と比較して血清半減期の増大を示す

８匹の１２週齢Ｂａｌｂ／Ｃマウスにそれぞれ、ＭＭＰで活性化されるＡＡ、AA^{MMP}ＶＥＧＦ、プラスミンで活性化されるＡＡ、AA^{PLAS}ＶＥＧＦまたは親の抗ＶＥＧＦ抗体Ａｂ－ＶＥＧＦの１００μｇの単回ボーラス注射を施した。注射から１５分、８時間、１日、３日、７日および１０日後、血清を採取した。全ＡＡ濃度を血清における全ヒトＦｃのＥＬＩＳＡ測定から計算した。図３３に、各時点の全ＡＡの濃度を、個々の動物から得られた測定値の平均として示し、最初の用量のパーセントとして表す。ＡＡと親の抗体は同様に期待したとおり分配される。１５分で高く等しい濃度に達し、初日の間に組

織に分配される。親の抗体が１０日間にわたりほぼ完全に除去されたのとは対照的に、ＡＡは両方とも実験の期間中、血清においてより高いレベルで持続する。

【０４４３】

（実施例１９）

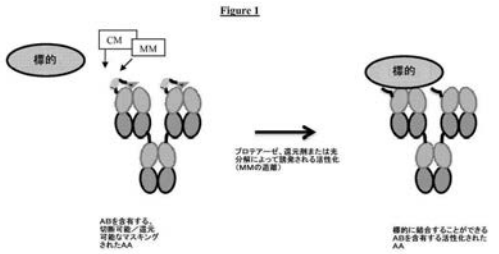
ＡＡの投与による副作用の低減

通常のＥＧＦＲ抗体治療薬を一般に投与した患者の８０％超が、体の最大の器官である皮膚の毒性を示す。患者にＥＧＦＲに対するＡＡが投与されると、ＡＡは疾患特異的ＣＭを欠くため皮膚において活性化されないので、皮膚の毒性がほとんどまたは全くないと考えられる。したがって、ＡＡの抗ＥＧＦＲ　ＡＢはＥＧＦＲ標的に特異的に結合することができないと考えられる。さらに、このような患者では、ＡＡが皮膚において活性がないのでＡＡは隔離されないと考えられ、ＡＡの血清レベルは高いままであり、それにより罹患した組織におけるＡＡの濃度を増加させ、有効用量を効果的に上昇させると考えられる。疾患環境に基づく罹患した組織におけるＣＭの加水分解により、活性化されたＡＡが生じて脱マスキングおよびＥＧＦＲ標的に対するＡＢの特異的結合を可能し、所望の治療効果をもたらす。

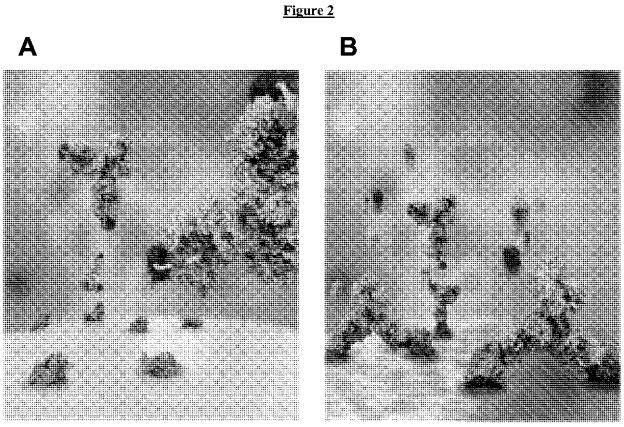
【０４４４】

本発明は、その特定の実施形態を参照して記載されるが、当業者であれば、本発明の真の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な変形形態を得ることができ、均等物で置き換えることができると理解されよう。さらに、特定の状況、材料、物質の組成物、プロセス、１つまたは複数のプロセスステップが、本発明の目的、趣旨および範囲に適合するように多くの変更形態を得ることができる。このようなすべての変更形態は、添付の特許請求の範囲内にあるものとする。

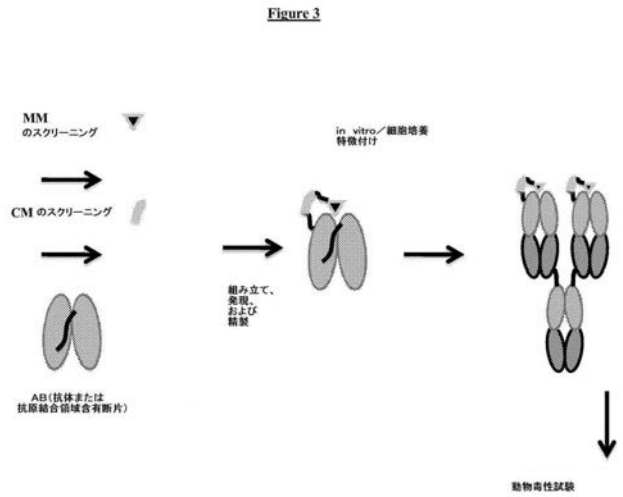
【図１】



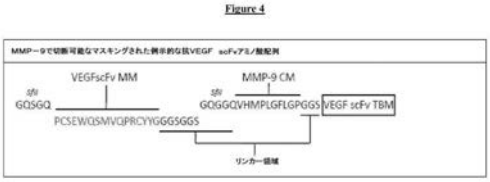
【図２】



【図３】

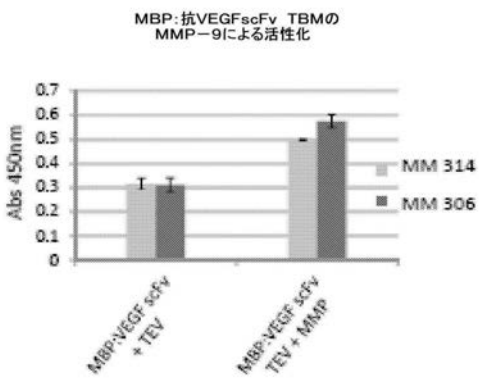


【図４】



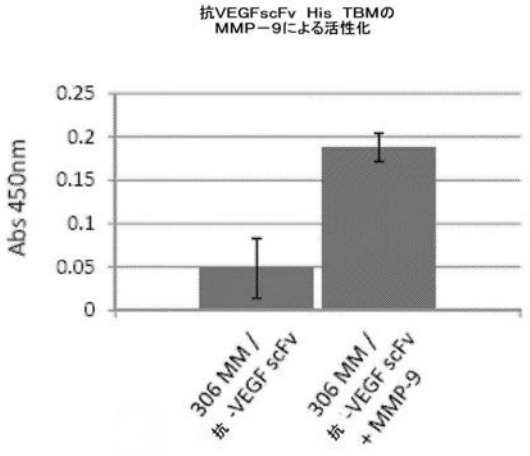
【図５】

Figure 5



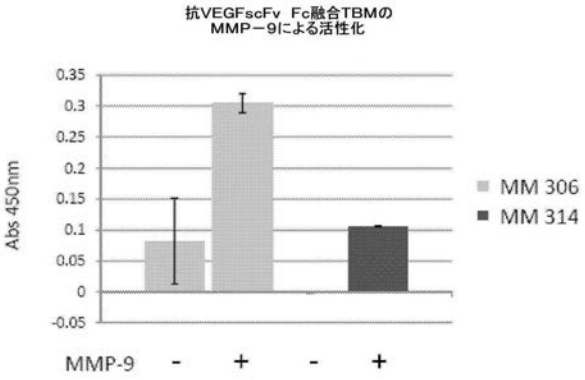
【図６】

Figure 6



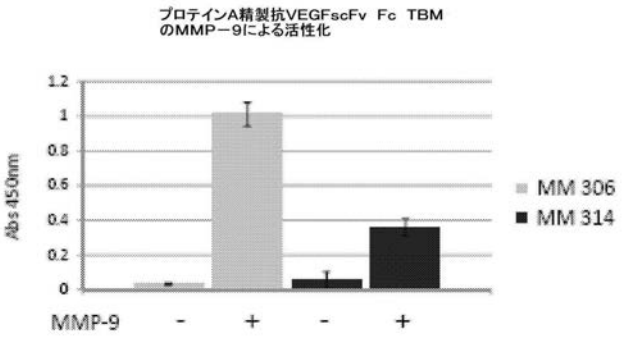
【図７】

Figure 7



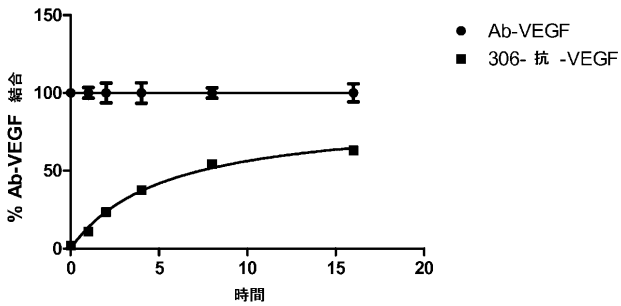
【図８】

Figure 8



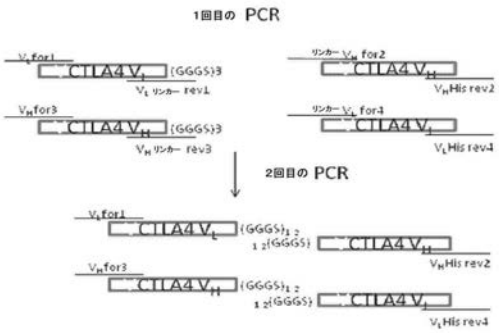
【図９】

Figure 9



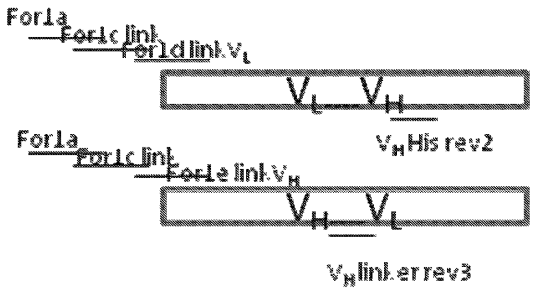
【図１０】

Figure 10



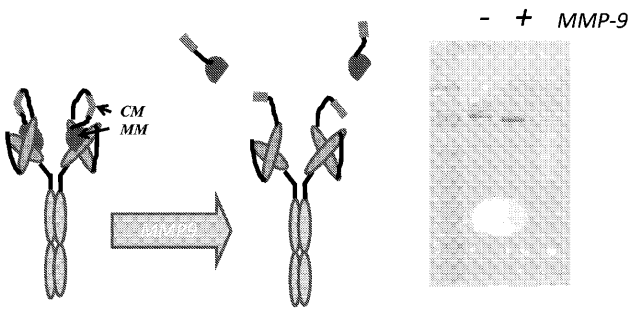
【図１１】

Figure 11



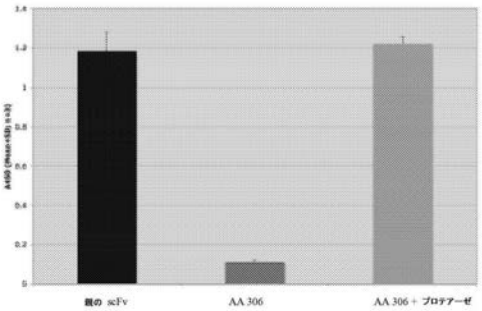
【図１２】

Figure 12



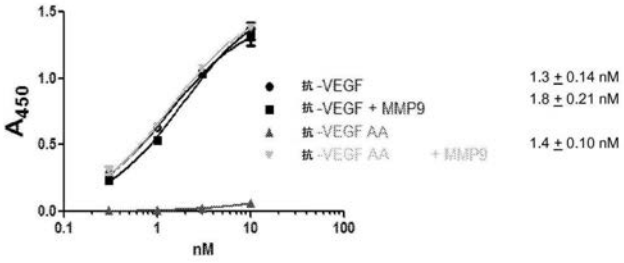
【図１３】

Figure 13



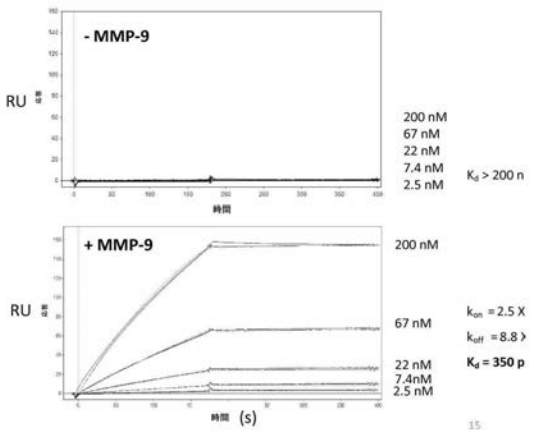
【図１４】

Figure 14



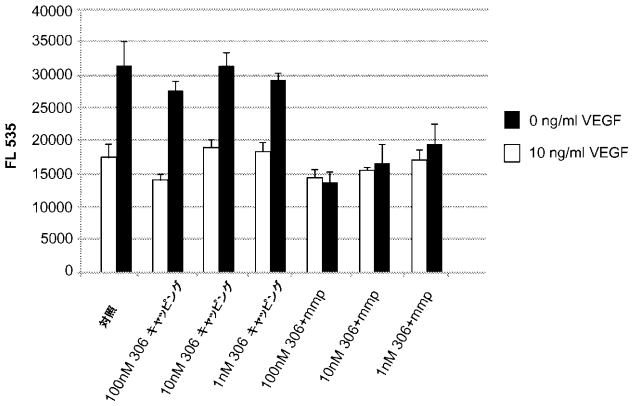
【図１５】

Figure 15



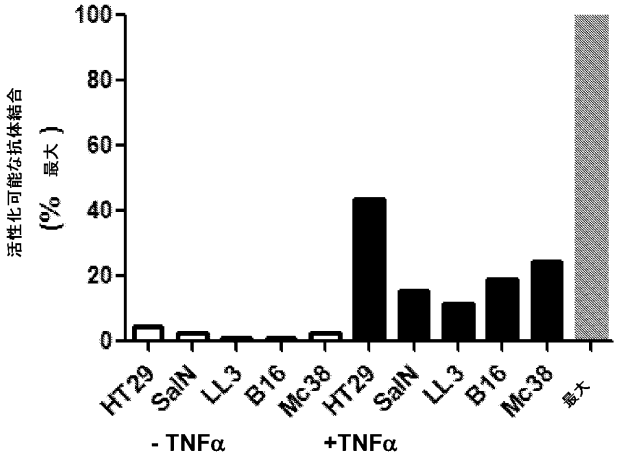
【図１６】

Figure 16



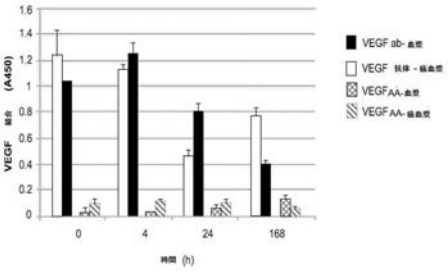
【図１７】

Figure 17



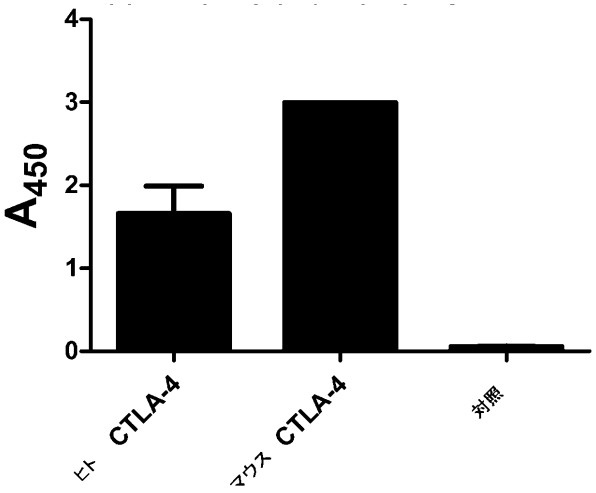
【図１８】

Figure 18



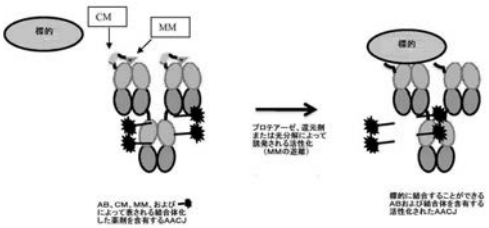
【図１９】

Figure 19



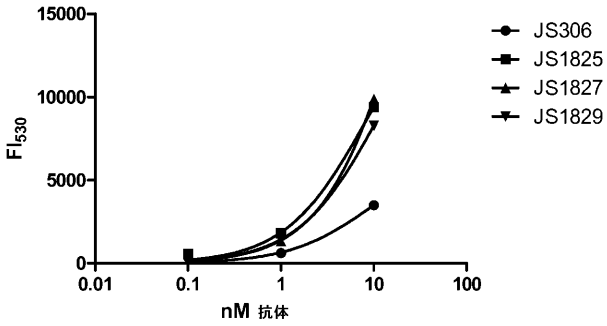
【図２０】

Figure 20



【図２１】

Figure 21

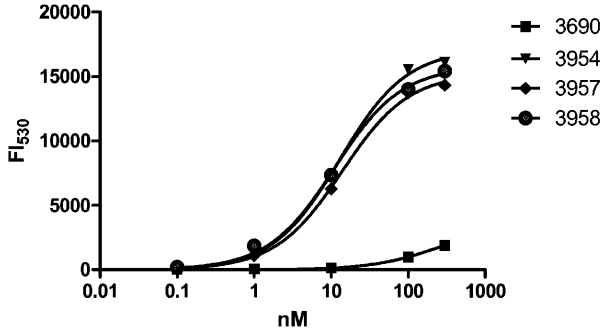


【図２２】

Figure 22

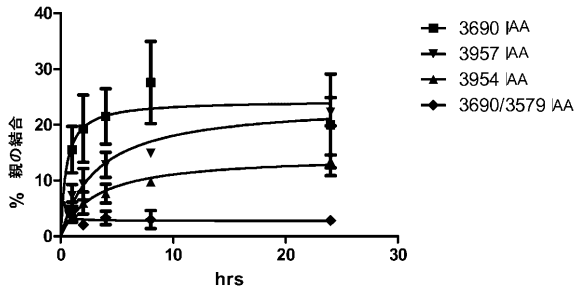
【図２３】

Figure 23



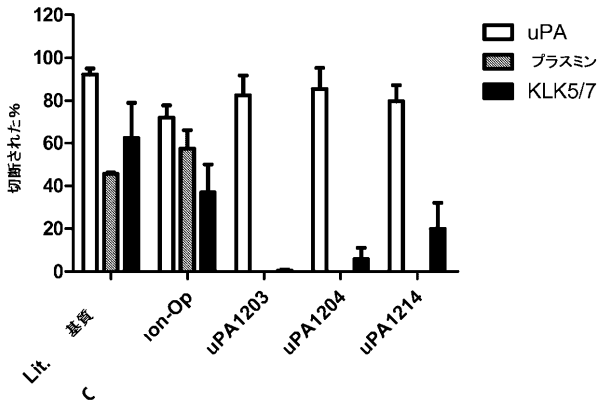
【図２４】

Figure 24



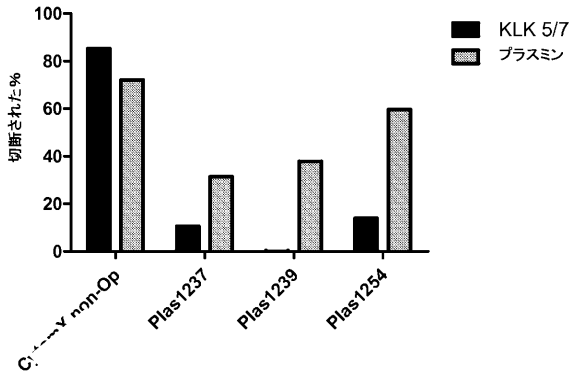
【図２５】

Figure 25



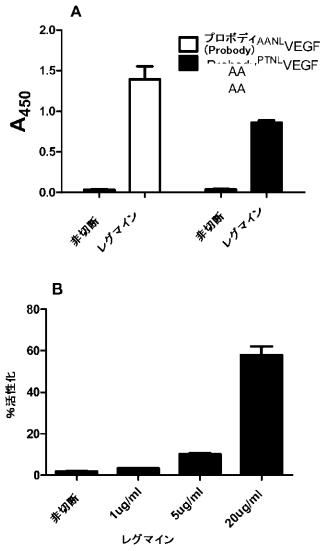
【図２６】

Figure 26



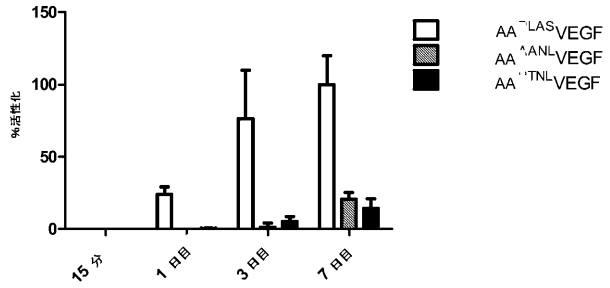
【図２７】

Figure 27



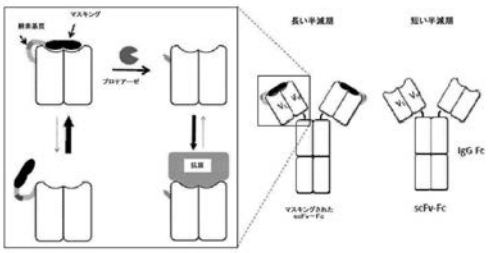
【図２８】

Figure 28



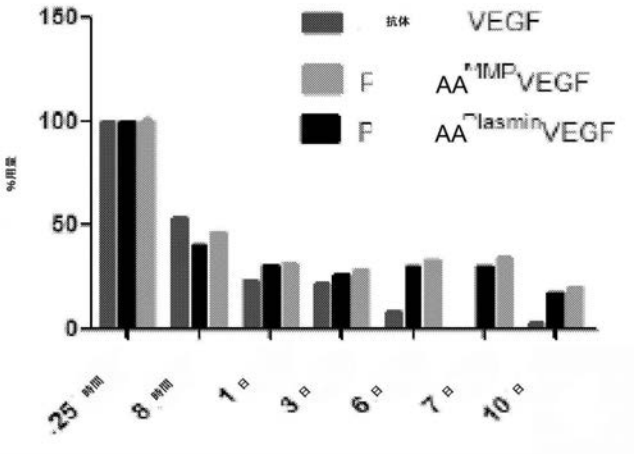
【図２９】

Figure 29



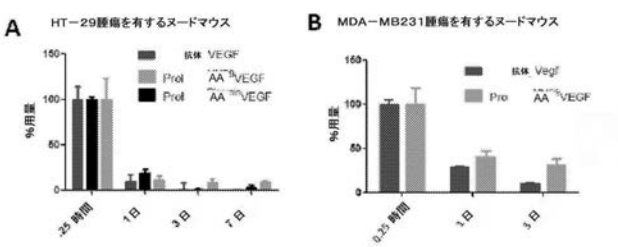
【図３０】

Figure 30



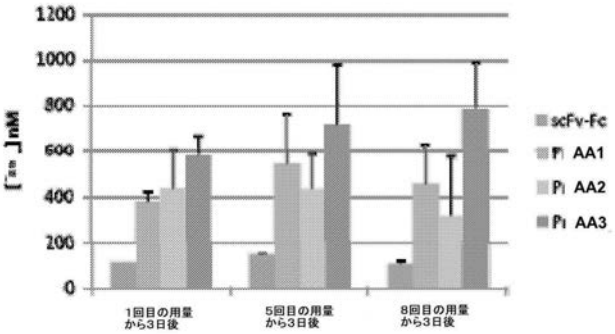
【図３１】

Figure 31



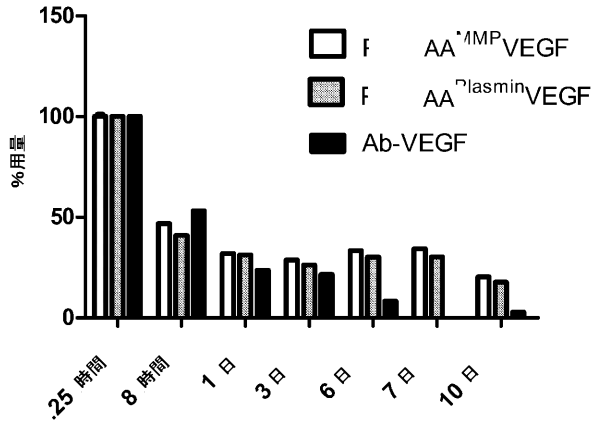
【図３２】

Figure 32



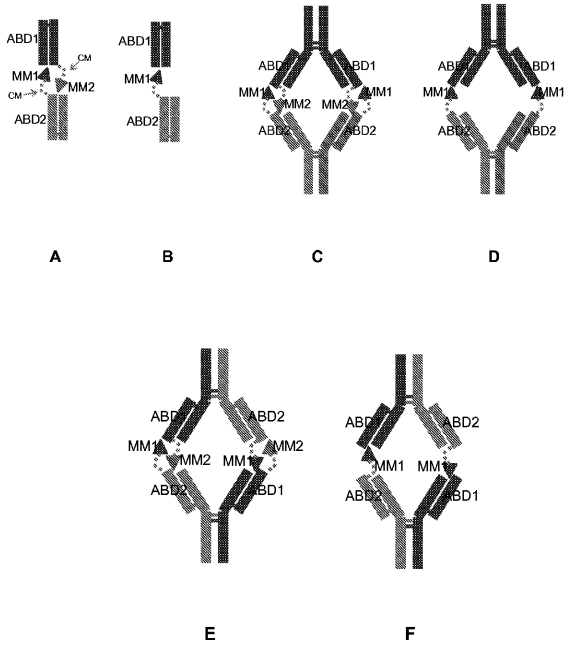
【図３３】

Figure 33



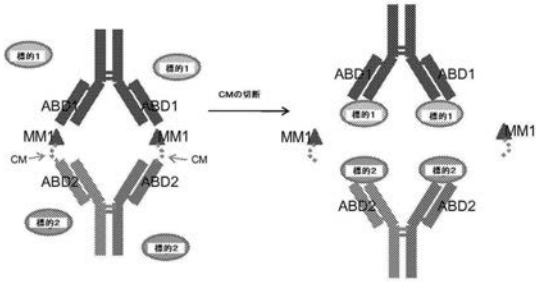
【図３４】

Figure 34



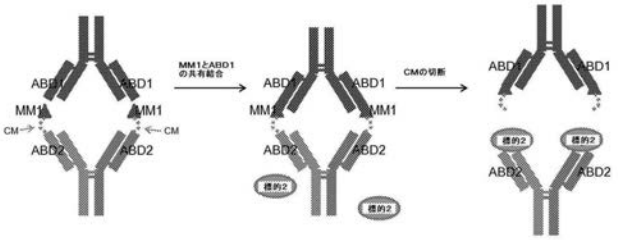
【図３５】

Figure 35



【図３６】

Figure 36



【配列表】
2017200955000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
A61K	***45/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｃ	
A61K	***47/68***	***(2017.01)***	Ａ６１Ｋ	45/00		
A61P	***9/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
G01N	***33/53***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	47/68		
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/00		
			Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
			Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ	
			Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ	

(31)優先権主張番号 61/249,416
(32)優先日 平成21年10月7日(2009.10.7)
(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔
(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 ナンシー イー. スタグリアノ
アメリカ合衆国 カリフォルニア, サンタ バーバラ, ポール ラ マール サークル ６４７, ユニット シー
(72)発明者 ジェイムズ ダブリュー. ウエスト
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９３１１０, サンタ バーバラ, シエネギータス ロード ７４８ アパートメント エー
(72)発明者 キャスリン カマス
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９３１０９, サンタ バーバラ, ブレマー ドライブ ３２３０
(72)発明者 ポール エイチ. ベセット
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９３０１０, キャマリロ, アボカド プレイス ４４１
(72)発明者 フレッド グラック
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９３１０８, サンタ バーバラ, サン イシドロ ロード ７４３
(72)発明者 ジェイソン サガート
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９３１１０, サンタ バーバラ, シエネギータス ロード ９６６
(72)発明者 パトリック ドーアティー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９３１１１, サンタ バーバラ, エヌ. パターソン アベニュー ９１７

Ｆターム(参考) 4C076 AA11 BB11 CC27 DD66 EE59 FF68
4C084 AA17 AA27 MA02 MA05 MA66 NA05 ZA362 ZB262 ZC751
4C085 AA13 AA14 AA25 AA26 BB43 EE01 EE03 GG01

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 BA50 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74

【外国語明細書】
2017200955000001.pdf