

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7680954号
(P7680954)

(45)発行日 令和7年5月21日(2025.5.21)

(24)登録日 令和7年5月13日(2025.5.13)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28 Z N A
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 0 7 K	14/725(2006.01)	C 0 7 K	14/725
請求項の数 20 (全172頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-538112(P2021-538112)	(73)特許権者	598004424
(86)(22)出願日	令和1年12月26日(2019.12.26)		シティ・オブ・ホープ
(65)公表番号	特表2022-516503(P2022-516503 A)		City of Hope
(43)公表日	令和4年2月28日(2022.2.28)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1
(86)国際出願番号	PCT/US2019/068538		0 1 0 - 3 0 0 0 デュアーテ イースト
(87)国際公開番号	WO2020/139920	(73)特許権者	デュアーテ ロード 1 5 0 0
(87)国際公開日	令和2年7月2日(2020.7.2)		521281863
審査請求日	令和4年12月21日(2022.12.21)		キシリオ ディベロップメント インコー
(31)優先権主張番号	62/785,111		ポレイテッド
(32)優先日	平成30年12月26日(2018.12.26)		アメリカ合衆国 0 2 4 5 1 マサチュー
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		セッツ州 ウォルサム ウィンター スト
		(74)代理人	リート 8 2 8
			100102978
		(74)代理人	弁理士 清水 初志
			100160923
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 活性化可能なマスクされた抗C T L A 4結合タンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) 軽鎖可変(V L)ドメインおよび重鎖可変(V H)ドメインを含む抗C T L A 4抗体またはその抗原結合断片と、

b) 配列番号5および19からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドと

を含む、マスクされた抗体であって、

前記マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、前記V Lドメインまたは前記V Hドメインのアミノ末端またはカルボキシ末端に連結されており、かつ

a) 前記V Lドメインが、(i) 配列番号402のアミノ酸配列を含むC D R - L 1、(i i) 配列番号403のアミノ酸配列を含むC D R - L 2、および(i i i) 配列番号404のアミノ酸配列を含むC D R - L 3を含み、かつ前記V Hドメインが、(i) 配列番号405のアミノ酸配列を含むC D R - H 1、(i i) 配列番号406のアミノ酸配列を含むC D R - H 2、および(i i i) 配列番号407のアミノ酸配列を含むC D R - H 3を含む、あるいは

b) 前記V Lドメインが、(i) 配列番号408のアミノ酸配列を含むC D R - L 1、(i i) 配列番号409のアミノ酸配列を含むC D R - L 2、および(i i i) 配列番号410のアミノ酸配列を含むC D R - L 3を含み、かつ前記V Hドメインが、(i) 配列番号411のアミノ酸配列を含むC D R - H 1、(i i) 配列番号412のアミノ酸配列を含むC D R - H 2、および(i i i) 配列番号413のアミノ酸配列を含むC D R - H

3を含む、あるいは

c) 前記VLDメインが、(i) 配列番号432のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号433のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号434のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ前記VHメインが、(i) 配列番号435のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号436のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号437のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、あるいは

d) 前記VLDメインが、(i) 配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ前記VHメインが、(i) 配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、

前記マスクされた抗体。

【請求項2】

切断可能なペプチドを含む前記リンカーが、配列番号47～88、464～469、および479～508からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む切断可能なペプチドを含む、請求項1に記載のマスクされた抗体。

【請求項3】

前記切断可能なペプチドが、アミノ末端およびカルボキシ末端を含み、切断可能なペプチドを含む前記リンカーが、第1のスペーサーリンカーおよび第2のスペーサーリンカーを含み、前記第1のスペーサーリンカーが、前記切断可能なペプチドの前記アミノ末端に連結されており、かつ配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記第2のスペーサーリンカーが、前記切断可能なペプチドの前記カルボキシ末端に連結されており、かつ配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1または2に記載のマスクされた抗体。

【請求項4】

切断可能なペプチドを含む前記リンカーが、配列番号454～462からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載のマスクされた抗体。

【請求項5】

配列番号113～231および444～453からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載のマスクされた抗体。

【請求項6】

前記抗CTLA4抗体もしくはその抗原結合断片、またはCTLA4に結合するリガンド結合断片が、ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項1～5のいずれか一項に記載のマスクされた抗体。

【請求項7】

a) 前記VLDメインが、配列番号321のアミノ酸配列を含み、かつ前記VHメインが、配列番号323のアミノ酸配列を含む、または

b) 前記VLDメインが、配列番号322のアミノ酸配列を含み、かつ前記VHメインが、配列番号324のアミノ酸配列を含む、

請求項1～6のいずれか一項に記載のマスクされた抗体。

【請求項8】

前記VLDメインが、配列番号327～341からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖内に含まれ、かつ前記VHメインが、配列番号366～380および421からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖内に含まれる、請求項1～7のいずれか一項に記載のマスクされた抗体。

【請求項9】

配列番号421のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号358および422～431から

10

20

30

40

50

なる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のマスクされた抗体。

【請求項 10】

前記抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片が、薬剤と複合体化されている、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のマスクされた抗体。

【請求項 11】

前記薬剤が、チューブリン重合の阻害剤、DNA 損傷剤、または DNA 合成阻害剤、メイタンシノイド、アウリスタチン、ピロロベンゾジアゼピン (P B D) 二量体、カリチアマイシン、デュオカルマイシン、インドリノベンゾジアゼピン二量体、またはエキサテカン誘導体 D x d である、請求項 10 に記載のマスクされた抗体。

10

【請求項 12】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のマスクされた抗体を含む、マスクされた二重特異性抗体。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のマスクされた抗体または請求項 12 に記載のマスクされた二重特異性抗体をコードする、核酸。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の核酸を含む、ベクターまたは宿主細胞。

【請求項 15】

マスクされた抗体またはマスクされた二重特異性抗体を生成する方法であって、前記マスクされた抗体を生成する条件下で、請求項 14 に記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。

20

【請求項 16】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のマスクされた抗体または請求項 12 に記載のマスクされた二重特異性抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のマスクされた抗体または請求項 12 に記載のマスクされた二重特異性抗体を含む、治療用のキット。

【請求項 18】

対象において腫瘍性疾患を治療または予防するための医薬の製造のための、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のマスクされた抗体または請求項 12 に記載のマスクされた二重特異性抗体を含む組成物の使用。

30

【請求項 19】

a) 軽鎖可変 (V L) ドメインおよび重鎖可変 (V H) ドメインを含む抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片と、

b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含むマスキングペプチドとを含む、マスクされた抗体であって、

前記マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、前記 V L ドメインのアミノ末端に連結されており、

切断可能なペプチドを含む前記リンカーが、配列番号 86 のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチドを含み、

40

(a) 前記 V L ドメインが、配列番号 408 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、配列番号 409 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および配列番号 410 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含み、かつ前記 V H ドメインが、配列番号 411 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、配列番号 412 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および配列番号 413 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む、または

(b) 前記 V L ドメインが、配列番号 438 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、配列番号 439 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および配列番号 440 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含み、かつ前記 V H ドメインが、配列番号 441 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、配列番号 442 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および配列番号 4

50

43のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、
マスクされた抗体。

【請求項20】

a) 軽鎖可変(VL)ドメインおよび重鎖可変(VH)ドメインを含む抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片と、

b) 配列番号19のアミノ酸配列を含むマスキングペプチドとを含む、マスクされた抗体であって、

前記マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、前記VLドメインのアミノ末端に連結されており、

切断可能なペプチドを含む前記リンカーが、配列番号50のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチドを含み、

(a) 前記VLドメインが、配列番号408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ前記VHドメインが、配列番号411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、または

(b) 前記VLドメインが、配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ前記VHドメインが、配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、
マスクされた抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願との相互参照

本出願は、2018年12月26日に出願された米国仮出願第62/785,111号からの優先権を主張し、その内容の全体が参照により組み込まれる。

【0002】

ASCIIテキストファイル上の配列表の提出

ASCIIテキストファイル上の以下の提出の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータ可読形態(CRF)(ファイル名：737762001640.txt、作成日：2019年12月23日、サイズ：518KB)。

【0003】

発明の分野

本発明は、活性化可能なマスクされた抗細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA4)結合タンパク質(例えば、抗CTLA4抗体)、およびそれらの使用に関連する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

癌は米国で2番目に多い死因であり、次の5つの主要な原因(慢性呼吸器疾患、脳卒中、事故、アルツハイマー病、および糖尿病)よりも多くの死因を占めている。標的療法では特に大きな進歩が遂げられたが、この分野ではまだ多くの研究が残されている。免疫療法およびこの分野の分科である免疫腫瘍学は、悪性腫瘍を治療するための実行可能で刺激的な治療選択肢を生み出している。特に、癌の1つの特徴は免疫回避であり、顕著な努力が、癌を認識および治療するために免疫系を再活性化するための標的を特定し、これらの標的に対する療法を開発してきたことが現在では認識されている。事実、抗細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA4)抗体であるイピリムマブは、ステージIII/IV悪性黒色腫を患う患者の長期生存をもたらした。イピリムマブは、CTLA4を遮断

10

20

30

40

50

することによってT細胞の阻害を中断する免疫チェックポイントアンタゴニストであり、T制御性細胞（Treg）の枯渇をもたらし得る。[Korman, A., et al., 2005. Tumor immunotherapy: preclinical and clinical activity of anti-CTLA4 antibodies. Current Opinion in Investigational Drugs 6:582-591（非特許文献1）、Quezada et al., J. Exp. Med., 206（8）:1717-1725, 2009（非特許文献2）、Selby et al. Cancer Immunol Res., 1（1）;32-42, 2013（非特許文献3）] 残念なことに、イピリムマブは、生命を脅かし得る免疫関連有害作用をもたらすT細胞依存性免疫応答の全身的（腫瘍特異的ではない）活性化を引き起こし、しばしば用量および治療期間が制限される（Weber, J. S., et al., 2008. Phase I/II study of ipilimumab for patients with metastatic melanoma. Journal of Clinical Oncology 26:5950-5956（非特許文献4））。これらには、腸炎、皮膚炎、下垂体炎、ブドウ膜炎、肝炎、腎炎、および死亡が含まれる。腸炎は、最も一般的な主な毒性である（患者の約20%に影響する）。免疫媒介性有害反応に関連する重度の安全性リスクがあったため、FDAは、リスク評価および軽減戦略（REMS）を伴ってイピリムマブを承認した。最近、イピリムマブと、PD1を標的とする第2の免疫チェックポイント調節因子（例えば、ニボルマブ）との併用投与は、イピリムマブ単独と比較して、黒色腫の免疫療法の有効性を有意に増加させることが示されている。しかしながら、この増加は、併用療法を受けている患者の50%超に影響するグレード3/4の有害作用の頻度の増加と関連していた（Wolchok, J. D., et al. 2013. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. N Engl J Med（非特許文献5））。

【0005】

これらの所見は、全身免疫活性化に関連する副作用のない、腫瘍を効果的に標的化する抗CTLA4タンパク質治療薬の開発の必要性を説明している。この必要性に対処するための抗CTLA結合タンパク質、その組成物、およびその使用方法が本明細書に提供される。

【0006】

特許出願、特許公開、および科学文献を含む本明細書に引用されるすべての参考文献は、各個々の参考文献が、参照により組み込まれることを具体的かつ個別に示されているかのように、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【文献】Korman, A., et al., 2005. Tumor immunotherapy: preclinical and clinical activity of anti-CTLA4 antibodies. Current Opinion in Investigational Drugs 6:582-591

【文献】Quezada et al., J. Exp. Med., 206（8）:1717-1725, 2009

【文献】Selby et al. Cancer Immunol Res., 1（1）;32-42, 2013

【文献】Weber, J. S., et al., 2008. Phase I/II study of ipilimumab for patients with metastatic melanoma. Journal of Clinical Oncology 26:5950-5956

【文献】Wolchok, J. D., et al. 2013. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. N Engl J

Med

【発明の概要】

【0008】

活性化可能なマスクされた抗細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA4）結合タンパク質、それを含む組成物、およびそれを使用する方法が本明細書に提供される。

【0009】

CTLA4に結合する抗体またはその抗原結合断片を含むマスクされた抗体が本明細書に提供され、抗体またはその抗原結合断片は、第1の鎖および第2の鎖を含み、マスクングペプチドは、配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列を含み、マスクングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗体またはその抗原結合断片の第1の鎖または第2の鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端に連結される。いくつかの実施形態では、第1の鎖は軽鎖であり、第2の鎖は重鎖である。

【0010】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、2つの第1の鎖および2つの第2の鎖を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、軽鎖可変ドメインであるか、またはそれを含み、第2の鎖は、重鎖可変ドメインであるか、またはそれを含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗原結合断片は、dAb、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv、または（Fab'）2断片である。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、マスクングペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端は、切断可能なペプチドを含むリンカーに連結される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドを含むリンカーは、スパーサーリンカーおよび切断可能なペプチドを含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、配列番号47～88、464～469、および479～508から選択されるアミノ酸配列を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、スパーサーリンカーは、切断可能なペプチドのN末端および／またはC末端に直接連結される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、アミノ酸配列を含むスパーサーリンカーは、配列番号89～112および415～420から選択される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、少なくとも1つのアミノ酸であるが20以下のアミノ酸は、マスクングペプチドのN末端に直接連結される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、少なくとも1つのアミノ酸は、アラニン（A）またはグリシン-アラニン（GA）である。

【0011】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、マスクされた抗体は、NからC末端またはCからN末端方向に、a）マスクングペプチド、b）切断可能なペプチド、およびc）CTLA4に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、マスクされた抗体は、マスクングペプチドと切断可能なペプチドとの間にスパーサーを含み、マスクされた抗体は、切断可能なペプチドと、CTLA4に結合する抗体またはその抗原結合断片との間にスパーサーリンカーを含む。

【0012】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体は、マウス抗体である。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはヒト抗体である。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプを有する。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、IgG1は、アミノ酸置換、S298A、E333A、およびK334A；S239DおよびI332E；S239D、A330L、およびI332E；P247IおよびA339DまたはA339Q；D280H、S298DありまたはなしのK290S、もしくはS298V；F243L、R292P、およびY300L；F243L、R292P、Y300L、V305I、およびP396L；G236A、S239D、およびI332E；K326AおよびE333A；K326WおよびE333S；またはK290EもしくはK290N、S298G、T299A、および／もしくはK326Eを含み、アミノ酸残基は、Kabattにあ

10

20

30

40

50

るように、E Uインデックスに従って番号付けされる。

【0013】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体またはその抗原結合断片は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i) 配列番号402もしくは408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403もしくは409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404もしくは410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または重鎖可変領域は、(i) 配列番号405もしくは411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406もしくは412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407もしくは413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体または抗原結合断片は、配列番号232のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号233のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

10

【0014】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体または抗原結合断片は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i) 配列番号402のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または重鎖可変領域は、(i) 配列番号405のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i) 配列番号402のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、重鎖可変領域は、(i) 配列番号405のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。

20

【0015】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体または抗原結合断片は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i) 配列番号432のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号433のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号444のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または重鎖可変領域は、(i) 配列番号435のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号436のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号437のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体または抗原結合断片は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i) 配列番号432のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号433のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号434のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、重鎖可変領域は、(i) 配列番号435のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号436のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号437のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。

30

【0016】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体または抗原結合断片は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i) 配列番号408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または重鎖可変領域は、(i) 配列番号411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体または抗原結合断片は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i) 配列番号408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号409のアミノ酸

40

50

配列を含むCDR-L2、および(iii)配列番号410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、重鎖可変領域は、(i)配列番号411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii)配列番号413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。

【0017】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体または抗原結合断片は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i)配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii)配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii)配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または重鎖可変領域は、(i)配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii)配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体または抗原結合断片は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i)配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii)配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii)配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、重鎖可変領域は、(i)配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii)配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。

【0018】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体は、配列番号237～318から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、および／または配列番号319もしくは320から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体または抗原結合断片は、配列番号321もしくは322から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号323もしくは324から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号321のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号323のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号322のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号324のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0019】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体は、配列番号327～341から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、ならびに／または配列番号366～380、421、および478から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体は、配列番号327、334、もしくは342～365から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、ならびに／または配列番号366もしくは380～397から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号327のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号366のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号327のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号478のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号380のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号421のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0020】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、CTLA4を発現する細胞または組織を含む領域内で共局在化されるプロテアーゼの基質である。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、ABHD12、ADAM12、ABHD12B、ABHD13、ABHD17A、ADAM19、ADAM20、ADAM21、ADAM28、ADAM30、ADAM33、ADAM8、ABHD17

10

20

30

40

50

A、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS10、ADAMTS12、ADAMTS13、ADAMTS14、ADAMTS15、ADAMTS16、ADAMTS17、ADAMTS18、ADAMTS19、ADAMTS2、ADAMTS20、ADAMTS3、ADAMTS4、ABHD17B、ADAMTS5、ADAMTS6、ADAMTS7、ADAMTS8、ADAMTS9、ADAMTSL1、ADAMTSL2、ADAMTSL3、ABHD17C、ADAMTSL5、ASTL、BMP1、CELA1、CELA2A、CELA2B、CELA3A、CELA3B、ADAM10、ADAM15、ADAM17、ADAM9、ADAMTS4、CTSE、CTSF、ADAMTSL4、CMA1、CTRB1、CTRC、CTSO、CTRL、CTSA、CTSW、CTSB、CTSC、CTSD、ESP1、CTSG、CTSH、GZMA、GZMB、GZMH、CTSK、GZMM、CTSL、CTSS、CTSV、CTSZ、HTRA4、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、KLK2、KLK4、DPP4、KLK6、KLK7、KLKB1、ECE1、ECE2、ECEL1、MASP2、MEP1A、MEP1B、ELANE、FAP、GZMA、MMP11、GZMK、HGFAC、HPN、HTRA1、MMP11、MMP16、MMP17、MMP19、HTRA2、MMP20、MMP21、HTRA3、HTRA4、KEL、MMP23B、MMP24、MMP25、MMP26、MMP27、MMP28、KLK5、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、LGMN、LNPEP、MASP1、PAPPA、PAPPA2、PCSK1、NAPSA、PCSK5、PCSK6、MME、MMP1、MMP10、PLAT、PLAU、PLG、PRSS1、PRSS12、PRSS2、PRSS21、PRSS3、PRSS33、PRSS4、PRSS55、PRSS57、MMP12、PRSS8、PRSS9、PRTN3、MMP13、MMP14、ST14、TMPRSS10、TMPRSS11A、TMPRSS11D、TMPRSS11E、TMPRSS11F、TMPRSS12、TMPRSS13、MMP15、TMPRSS15、MMP2、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、TMPRSS5、TMPRSS6、TMPRSS7、TMPRSS9、NRDC、OVCH1、PAMR1、PCSK3、PHEX、TINAG、TPSAB1、TPSD1、およびTPSG1からなる群から選択される1つ以上の酵素によって切断される。

【0021】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、ADAM17、HTRA1、PRSS1、FAP、GZMK、NAPSA、MMP1、MMP2、MMP9、MMP10、MMP7、MMP12、MMP28、ADAMTS9、HGFAC、およびHTRA3からなる群から選択される1つ以上の酵素によって切断される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、抗体またはその抗原結合断片は、薬剤と複合体化される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、薬剤は、チューブリン重合の阻害剤、DNA損傷剤、またはDNA合成阻害剤である。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、薬剤は、メイタンシノイド、アウリスタチン、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)二量体、カリチアマイシン、デュオカルマイシン、インドリノベンゾジアゼピン二量体、またはエキサテカン誘導体Dxdである。

【0022】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、本明細書に提供されるマスクされた抗体は、約20対約10,000の最適な閉塞(occlusion)比を呈する。さらなる実施形態では、最適な閉塞比は、約20対約1,000である。さらなる実施形態では、最適な閉塞比は、約80対約100である。

【0023】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、マスクされた抗体は、配列番号421のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号358および422~431からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0024】

CTLA4に特異的に結合する第1の対の軽鎖および重鎖、抗原に特異的に結合する第

10

20

30

40

50

2の対の軽鎖および重鎖、ならびに配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドを含むマスクされた二重特異性抗体もまた本明細書に提供され、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、第1の対の軽鎖または重鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端に連結される。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端は、切断可能なペプチドを含むリンカーに連結される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドを含むリンカーは、スパーサーリンカーおよび切断可能なペプチドを含む。

【0025】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、配列番号47～88、464～469、および479～508から選択されるアミノ酸配列を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、スパーサーリンカーは、切断可能なペプチドのN末端またはC末端に直接連結される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、アミノ酸配列を含むスパーサーリンカーは、配列番号89～112および415～420から選択される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、少なくとも1つのアミノ酸であるが20以下のアミノ酸は、マスキングペプチドのN末端に直接連結される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、少なくとも1つのアミノ酸は、アラニン（A）またはグリシン-アラニン（GA）である。

【0026】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対の軽鎖または重鎖は、NからC末端またはCからN末端方向に、a) マスキングペプチド、b) 切断可能なペプチド、およびc) 軽鎖または重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、マスキングペプチドと切断可能なペプチドとの間にスパーサーリンカーを含み、第1の対は、切断可能なペプチドと軽鎖または重鎖との間にスパーサーリンカーを含む。

【0027】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、二重特異性抗体は、マウス抗体である。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、二重特異性抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはヒト抗体である。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、二重特異性抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプを有する。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、IgG1は、S298A、E333A、およびK334A；S239DおよびI332E；S239D、A330L、およびI332E；P247IおよびA339DまたはA339Q；D280H、S298DありまたはなしのK290S、もしくはS298V；F243L、R292P、およびY300L；F243L、R292P、Y300L、およびP396L；F243L、R292P、Y300L、V305I、およびP396L；G236A、S239D、およびI332E；K326AおよびE333A；K326WおよびE333S；またはK290EもしくはK290N、S298G、T299A、および／もしくはK326Eなどのアミノ酸置換を含み、アミノ酸残基は、Kababchikにあるように、EUIndexに従って番号付けされる。

【0028】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i) 配列番号402もしくは408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403もしくは409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404もしくは410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または重鎖可変領域は、(i) 配列番号405もしくは411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406もしくは412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407もしくは413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。

【0029】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i) 配列番号402のアミノ酸配列を含むCDR-L

10

20

30

40

50

10

20

30

40

、(i) 配列番号 441 のアミノ酸配列を含む CDR-H1、(ii) 配列番号 442 のアミノ酸配列を含む CDR-H2、および (iii) 配列番号 443 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む。

【0033】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、配列番号 232 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号 233 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、配列番号 237 ～ 318 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、および／または配列番号 319 もしくは 320 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、配列番号 321 もしくは 322 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号 323 もしくは 324 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、配列番号 321 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号 323 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、配列番号 322 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号 324 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0034】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、配列番号 327 ～ 341 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、ならびに／または配列番号 366 ～ 380、421、および 478 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、配列番号 327、334、もしくは 342 ～ 365 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、ならびに／または配列番号 366 もしくは 380 ～ 397 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、配列番号 327 のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号 366 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、配列番号 327 のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号 478 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、配列番号 334 のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号 380 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の対は、配列番号 334 のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号 421 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0035】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、CTLA4 を発現する細胞または組織を含む領域内で共局在化されるプロテアーゼの基質である。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、ABHD12、ADAM12、ABHD12B、ABHD13、ABHD17A、ADAM19、ADAM20、ADAM21、ADAM28、ADAM30、ADAM33、ADAM8、ABHD17A、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS10、ADAMTS12、ADAMTS13、ADAMTS14、ADAMTS15、ADAMTS16、ADAMTS17、ADAMTS18、ADAMTS19、ADAMTS2、ADAMTS20、ADAMTS3、ADAMTS4、ABHD17B、ADAMTS5、ADAMTS6、ADAMTS7、ADAMTS8、ADAMTS9、ADAMTSL1、ADAMTSL2、ADAMTSL3、ABHD17C、ADAMTSL5、ASTL、BMP1、CELA1、CELA2A、CELA2B、CELA3A、CELA3B、ADAM10、ADAM15、ADAM17、ADAM9、ADAMTS4、CTSE、CTS F、ADAMTSL4、CMA1、CTRB1、CTRC、CTSO、CTRL、CTSA、CTSW、CTSB、CTSC、CTSD、ESP1、CTSG、CTSH、GZMA、GZMB、GZMH、CTSK、GZMM、CTSL、CTSS、CTSV、CTS Z、HTRA4、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、KLK2、KLK4、DPP4、KLK6、KLK7、KLKB1、ECE1、ECE2、ECEL1、MASP2、MEP1A、MEP1B、ELANE、FAP、GZMA、MMP11、GZMK、HGFAC

、HPN、HTRA1、MMP11、MMP16、MMP17、MMP19、HTRA2、MMP20、MMP21、HTRA3、HTRA4、KEL、MMP23B、MMP24、MMP25、MMP26、MMP27、MMP28、KLK5、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、LG MN、LNPEP、MASP1、PAPPA、PAPPA2、PCSK1、NAPSA、PCSK5、PCSK6、MME、MMP1、MMP10、PLAT、PLAU、PLG、PRSS1、PRSS12、PRSS2、PRSS21、PRSS3、PRSS33、PRSS4、PRSS55、PRSS57、MMP12、PRSS8、PRSS9、PRTN3、MMP13、MMP14、ST14、TMPRSS10、TMPRSS11A、TMPRSS11D、TMPRSS11E、TMPRSS11F、TMPRSS12、TMPRSS13、MMP15、TMPRSS15、MMP2、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、TMPRSS5、TMPRSS6、TMPRSS7、TMPRSS9、NRDC、OVCH1、PAMR1、PCSK3、PHEX、TINAG、TPSAB1、TPSD1、およびTPSG1からなる群から選択される1つ以上の酵素によって切断される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、ADAM17、HTRA1、PRSS1、FAP、GZMK、NAPSA、MMP1、MMP2、MMP9、MMP10、MMP7、MMP12、MMP28、ADAMTS9、HGFAC、およびHTRA3からなる群から選択される1つ以上の酵素によって切断される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、二重特異性抗体は、薬剤と複合体化される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、薬剤は、チューブリン重合の阻害剤、DNA損傷剤、またはDNA合成阻害剤である。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、薬剤は、メイタンシノイド、アウリスタチン、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)二量体、カリチアマイシン、デュオカルマイシン、インドリノベンゾジアゼピン二量体、またはエキサテカン誘導体Dxdである。

【0036】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、本明細書に提供されるマスクされた二重特異性抗体の第1の対および第2の対は各々、同じであっても互いに異なってもよい最適な閉塞比を呈する。いくつかの実施形態では、最適な閉塞比は、約20対約10,000である。さらなる実施形態では、最適な閉塞比は、約20対約1,000である。さらなる実施形態では、最適な閉塞比は、約80対約100である。

【0037】

CTLA4に結合する第1の鎖および第2の鎖を含むリガンド結合ドメインと、配列番号1~46から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドと、膜貫通ドメインと、シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含む、マスクされたキメラ受容体もまたは本明細書に提供され、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、リガンド結合ドメインの第1の鎖または第2の鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端に連結される。

【0038】

いくつかの実施形態では、第1の鎖は、軽鎖可変ドメインであり、第2の鎖は、重鎖可変ドメインである。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端は、切断可能なペプチドを含むリンカーに連結される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドを含むリンカーは、スペーサーリンカーおよび切断可能なペプチドを含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、配列番号47~88、464~469、および479~508から選択されるアミノ酸配列を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、スペーサーリンカーは、切断可能なペプチドのN末端またはC末端に直接連結される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、アミノ酸配列を含むスペーサーリンカーは、配列番号89~112および415~420から選択される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、少なくとも1つのアミノ酸であるが20以下のアミノ酸は、マスキングペプチドのN末端に直接連結される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、少なくとも1つのアミノ酸は、アラニン(A)またはグリシン-アラニン(GA)である。任意のかかる実

10

20

30

40

50

施形態のうちのいくつかでは、リガンド結合ドメインの第1の鎖または第2の鎖は、NからC末端またはCからN末端方向に、a) マスキングペプチド、b) 切断可能なペプチド、およびc) 第1の鎖または第2の鎖を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、リガンド結合ドメインは、マスキングペプチドと切断可能なペプチドとの間にスペーサーリンカーを含み、リガンド結合ドメインは、切断可能なペプチドと第1の鎖または第2の鎖との間にスペーサーリンカーを含む。

【0039】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、リガンド結合ドメインは、第1の鎖および第2の鎖を含み、第1の鎖は、(i) 配列番号402もしくは408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403もしくは409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404もしくは410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または第2の鎖は、(i) 配列番号405もしくは411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406もしくは412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407もしくは413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。

【0040】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の鎖は、(i) 配列番号402のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または第2の鎖は、(i) 配列番号405のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、(i) 配列番号402のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、第2の鎖は、(i) 配列番号405のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。

【0041】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の鎖は、(i) 配列番号432のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号433のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号444のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または第2の鎖は、(i) 配列番号435のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号436のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号437のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の鎖は、(i) 配列番号432のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号433のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号434のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、第2の鎖は、(i) 配列番号435のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号436のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号437のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。

【0042】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の鎖は、(i) 配列番号408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または第2の鎖は、(i) 配列番号411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第1の鎖は、(i) 配列番号408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、第2の鎖は、(i) 配列番号411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、およ

び (i i i) 配列番号 4 1 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む。

【 0 0 4 3 】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第 1 の鎖は、(i) 配列番号 4 3 8 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(i i) 配列番号 4 3 9 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および (i i i) 配列番号 4 4 0 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含み、かつ／または第 2 の鎖は、(i) 配列番号 4 4 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 4 4 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および (i i i) 配列番号 4 4 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第 1 の鎖は、(i) 配列番号 4 3 8 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(i i) 配列番号 4 3 9 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および (i i i) 配列番号 4 4 0 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含み、第 2 の鎖は、(i) 配列番号 4 4 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 4 4 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および (i i i) 配列番号 4 4 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む。

【 0 0 4 4 】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第 1 の鎖は、配列番号 2 3 2 のアミノ酸配列を含み、かつ／または第 2 の鎖は、配列番号 2 3 3 のアミノ酸配列を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第 1 の鎖は、配列番号 3 2 1 もしくは 3 2 2 から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ／または第 2 の鎖は、配列番号 3 2 3 もしくは 3 2 4 から選択されるアミノ酸配列を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第 1 の鎖は、配列番号 3 2 1 のアミノ酸配列を含み、第 2 の鎖は、配列番号 3 2 3 のアミノ酸配列を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、第 1 の鎖は、配列番号 3 2 2 のアミノ酸配列を含み、第 2 の鎖は、配列番号 3 2 4 のアミノ酸配列を含む。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、C T L A 4 を発現する細胞または組織を含む領域内で共局在化されるプロテアーゼの基質である。

【 0 0 4 5 】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、A B H D 1 2、A D A M 1 2、A B H D 1 2 B、A B H D 1 3、A B H D 1 7 A、A D A M 1 9、A D A M 2 0、A D A M 2 1、A D A M 2 8、A D A M 3 0、A D A M 3 3、A D A M 8、A B H D 1 7 A、A D A M D E C 1、A D A M T S 1、A D A M T S 1 0、A D A M T S 1 2、A D A M T S 1 3、A D A M T S 1 4、A D A M T S 1 5、A D A M T S 1 6、A D A M T S 1 7、A D A M T S 1 8、A D A M T S 1 9、A D A M T S 2、A D A M T S 2 0、A D A M T S 3、A D A M T S 4、A B H D 1 7 B、A D A M T S 5、A D A M T S 6、A D A M T S 7、A D A M T S 8、A D A M T S 9、A D A M T S L 1、A D A M T S L 2、A D A M T S L 3、A B H D 1 7 C、A D A M T S L 5、A S T L、B M P 1、C E L A 1、C E L A 2 A、C E L A 2 B、C E L A 3 A、C E L A 3 B、A D A M 1 0、A D A M 1 5、A D A M 1 7、A D A M 9、A D A M T S 4、C T S E、C T S F、A D A M T S L 4、C M A 1、C T R B 1、C T R C、C T S O、C T R L、C T S A、C T S W、C T S B、C T S C、C T S D、E S P 1、C T S G、C T S H、G Z M A、G Z M B、G Z M H、C T S K、G Z M M、C T S L、C T S S、C T S V、C T S Z、H T R A 4、K L K 1 0、K L K 1 1、K L K 1 3、K L K 1 4、K L K 2、K L K 4、D P P 4、K L K 6、K L K 7、K L K B 1、E C E 1、E C E 2、E C E L 1、M A S P 2、M E P 1 A、M E P 1 B、E L A N E、F A P、G Z M A、M M P 1 1、G Z M K、H G F A C、H P N、H T R A 1、M M P 1 1、M M P 1 6、M M P 1 7、M M P 1 9、H T R A 2、M M P 2 0、M M P 2 1、H T R A 3、H T R A 4、K E L、M M P 2 3 B、M M P 2 4、M M P 2 5、M M P 2 6、M M P 2 7、M M P 2 8、K L K 5、M M P 3、M M P 7、M M P 8、M M P 9、L G M N、L N P E P、M A S P 1、P A P P A、P A P P A 2、P C S K 1、N A P S A、P C S K 5、P C S K 6、M M E、M M P 1、M M P 1 0、P L A T、P L A U、P L G、P R S S 1、P R S S 1 2、P R S S 2、P R S S 2 1、P R S S 3、P R S S 3 3、P R S S 4、P R S S 5 5、P R S S 5 7、M M P 1 2、P R S S 8、P R S S 9、P R T N 3、M M P 1 3、M M P 1 4、S T 1 4、T M

PRSS10、TMPRSS11A、TMPRSS11D、TMPRSS11E、TMPRSS11F、TMPRSS12、TMPRSS13、MMP15、TMPRSS15、MMP2、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、TMPRSS5、TMPRSS6、TMPRSS7、TMPRSS9、NRDC、OVCH1、PAMR1、PCSK3、PHEX、TINAG、TPSAB1、TPSD1、およびTPSG1からなる群から選択される1つ以上の酵素によって切断される。任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、ADAM17、HTRA1、PRSS1、FAP、GZMK、NAPSA、MMP1、MMP2、MMP9、MMP10、MMP7、MMP12、MMP28、ADAMTS9、HGFAC、およびHTRA3からなる群から選択される1つ以上の酵素によって切断される。

10

【0046】

任意のかかる実施形態のうちのいくつかでは、本明細書に提供されるマスクされたキメラ受容体は、約20対約10,000の最適な閉塞比を呈する。さらなる実施形態では、最適な閉塞比は、約20対約1,000である。さらなる実施形態では、最適な閉塞比は、約80対約100である。

【0047】

前述の実施形態のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体をコードする核酸もまた提供される。前述の実施形態の核酸を含むベクターもまた提供される。いくつかの実施形態では、ベクターは、発現ベクターである。前述の核酸の実施形態を含む宿主細胞もまた提供される。

20

【0048】

マスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体を生成する方法も提供され、前述の宿主細胞を、マスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体を生成する条件下で培養することを含む。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、アルファ1,6-フコシルトランスフェラーゼ(Fut8)ノックアウトを有する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、 β 1,4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnT-III)を過剰発現する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、さらに、ゴルジ μ -マンノシダーゼII(ManII)を過剰発現する。任意のかかる実施形態のうちのいくつかは、宿主細胞によって生成されるマスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体を回収することをさらに含む。いくつかの実施形態では、前述の方法によって生成されるマスクされた二重特異性抗体またはマスクされたキメラ受容体。

30

【0049】

前述の実施形態のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体を含む組成物もまた提供される。いくつかの実施形態は、前述の実施形態のマスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体を含む組成物を包含する。いくつかの実施形態では、組成物は、薬学的組成物である。

【0050】

前述の実施形態のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、マスクされたキメラ受容体、または組成物を含むキットもまた提供される。

40

【0051】

対象において腫瘍性疾患を治療または予防する方法もまた提供され、方法は、前述の実施形態のうちのいずれか1つの、有効量のマスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、マスクされたキメラ受容体、または組成物を対象に投与することを含む。一実施形態では、腫瘍性疾患は、癌である。いくつかの実施形態では、癌は、白血病、リンパ腫、頭頸部癌、結腸直腸癌、前立腺癌、脾臓癌、黒色腫、乳癌、神経芽細胞腫、肺癌、卵巣癌、骨肉腫、膀胱癌、子宮頸癌、肝臓癌、腎臓癌、皮膚癌、または精巣癌である。

【0052】

本明細書に記載される様々な実施形態の特性のうちの1つ、いくつか、またはすべてを

50

組み合わせて、本発明の他の実施形態を形成し得ることが理解されるべきである。本発明のこれらおよび他の態様は、当業者にとって明らかとなるであろう。本発明のこれらおよび他の実施形態は、以下の詳細な説明によってさらに説明される。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】図1Aおよび1Bは、マスキングペプチドによる抗CTLA4抗体の閉塞のインビトロ分析を示す一連のグラフである。表面プラズモン共鳴（SPR）を行い、A）反応速度論と、B）9D9抗体（リガンド）およびマスキングペプチドCNLIVEGHC（分析物）の間の親和性とを調べた。分析物を、37℃で、0.1～50μMの2倍連続希釈の増加する濃度で実行した。参照減算された応答をプロットした。SPRを3回行い、1つの実験からの代表的なトレースを示す。

10

【図2】図2A～2Cは、マスクされたマウス抗CTLA4抗体のプロテアーゼ活性化を示す一連のグラフである。図2A）活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体は、親抗CTLA4抗体（9D9、黒色の丸）と比較して、マウスCTLA4-Fc（9D9、黒色の四角）への90倍低い結合を呈した。活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体のプロテアーゼ活性化は、親CTLA4抗体と同等のレベルで、マウスCTLA4-Fc（プロテアーゼ活性化、アスタリスク）への結合を完全に回復させた。X軸は、試験された抗体の量を示す。図2B）活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体（マスク9D9、黒色の逆三角）および非切断性（non-cleavable）のマスクされた抗CTLA4抗体（NCマスク9D9、白色の四角）は、親抗CTLA4抗体（9D9、黒色の丸）と比較して、それぞれ、マウスCTLA4への約156倍および約218倍低い結合を示した。X軸は、試験された抗体の量を示す。図2C）EC50を、組換えMMP2の不在下または存在下で、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体（マスク9D9）、非切断性のマスクされた抗CTLA4抗体（NCマスク9D9）、および親抗CTLA4抗体（9D9）について、ELISAにより決定した。各群を少なくとも3回行い、平均EC50+/-SEを報告する。

20

【図3】図3A～3Dは、腫瘍体積の低減におけるプロテアーゼ活性化マスク抗CTLA4抗体（マスク9D9）の有効性が、親抗CTLA4抗体（9D9 IgG2a）の有効性と同等であったことを示す一連のグラフである。MC38同系腫瘍を、C57BL/6マウスに移植した。図3A）muIgG2a対照抗体、図3B）IgG2aアイソタイプ（9D9、IgG2a）を有する親抗CTLA4抗体、図3C）活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体（マスク9D9）の単一200μg用量を、腫瘍のサイズが60～120mm³に達するとマウスに腹腔内投与し、図3D）ヒト化IgG1抗CTLA4抗体1（抗体1）は、3B）親抗CTLA4抗体（9D9 IgG2a）または3A）muIgG2a対照抗体で処置されたマウスと比較して、MC38マウス腫瘍モデルにおける腫瘍体積の低減において類似のインビボ有効性を示した。

30

【図4】プロテアーゼ活性化マスク抗CTLA4抗体（マスク9D9）および親抗CTLA4抗体（9D9 IgG2a）による、腫瘍浸潤物における制御性Tリンパ球（Treg）の同等の枯渇を示すグラフである。対照は、muIgG2a対照抗体を用いた処置を示す。

40

【図5】図5Aおよび5Bは、プロテアーゼ活性化マスク抗CTLA4抗体（マスク9D9）が、処置されたマウスの脾臓におけるA）CD4+T細胞およびB）CD8+T細胞の増殖を著しく低減させたことを示す一連のグラフである。矢印は、親抗CTLA4抗体（9D9 IgG2a）およびプロテアーゼ活性化マスク抗CTLA4抗体（マスク9D9）を用いた治療群間の平均値を指している。

【図6】図6A～6Dは、マスクされた抗CTLA4抗体の有効性および安全性研究を示す一連のグラフである。図6A）アイソタイプ対照抗体（IgG2a対照）、図6B）非切断性のマスクされた抗CTLA4抗体（NCマスク9D9）、図6C）親抗CTLA4抗体（9D9）、および図6D）活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体（マスク9D9）の腫瘍抑制活性を、MC38腫瘍担持C57BL/6マウス（n=10）で調べた。

50

【図 7】図 7 A および 7 B は、A) 腫瘍における制御性 T リンパ球 (T r e g) の枯渇と、B) アイスタイプ対照抗体 (I g G 2 a 対照)、親抗 C T L A 4 抗体 (9 D 9)、活性化可能なマスクされた抗 C T L A 4 抗体 (マスク 9 D 9)、および非切断性のマスクされた抗 C T L A 4 抗体 (N C マスク 9 D 9) で処置されたマウス (n = 6) の脾臓における T r e g 増殖とを示す一連のグラフである。

【図 8】マスクされたヒト化抗 C T L A 4 抗体 1 のプロテアーゼ活性化を示すグラフである。マスクされたヒト化抗 C T L A 4 抗体 1 は、親ヒト化抗 C T L A 4 抗体 1 (親、白色の丸) と比較して、ヒト C T L A 4 - F c (マスクされた、黒色の四角) へのより低い結合を呈した。マスクヒト化抗 C T L A 4 抗体のプロテアーゼ活性化は、親ヒト化抗 C T L A 4 抗体 1 と同等のレベルで、ヒト C T L A 4 - F c (プロテアーゼ活性化、アスタリスク) への結合を完全に復元した。X 軸は、試験された抗体の量を示す。y 軸上の親の分子 / R L U の R L U は、親ヒト化抗 C T L A 4 抗体 1 と比較した相対光単位の割合を示す。

【図 9】図 9 A および 9 B は、ある範囲の抗体濃度にわたるヒト C T L A 4 - F c へのマスクされていない抗 C T L A 4 抗体の結合を示すグラフである。図 9 A は、示される抗体間で類似の結合を示した、ある範囲の抗体濃度にわたるヒト C T L A 4 - F c への抗体 1 (抗体 1 - 1 および抗体 1 - 2) の形態の結合を示す。図 9 B は、示される抗体間で類似の結合を示す、ある範囲の抗体濃度にわたるヒト C T L A 4 - F c への抗体 2 (抗体 2 - 1、抗体 2 - 2、抗体 2 - 3、抗体 2 - 4、および抗体 2 - 5) の形態の結合を示す。

【図 10 A】図 10 A および 10 B は、ある範囲の抗体濃度にわたるヒト C T L A 4 - F c へのマスクされた抗 C T L A 4 抗体の結合を示すグラフである。図 10 A は、プロテアーゼによる活性化の不在下でのマスクされた抗体による結合を示す。図 10 B は、プロテアーゼによる活性化後のマスクされた抗体による結合を示す。抗体 2 - 6 は、抗体 2 - 7、抗体 2 - 8、抗体 2 - 9、抗体 2 - 10、抗体 2 - 11、抗体 2 - 12、および抗体 2 - 13 のマスクされていない親抗体である。図 10 A および 10 B は、プロテアーゼによる活性化の後、マスクされた抗体が、マスクされていない親抗体である抗体 2 - 6 と類似の結合特性を示すことを示す。

【図 10 B】図 10 A の説明を参照のこと。

【図 11 - 1】図 11 A ~ 11 H は、様々な切断可能なペプチド配列を含む抗体 2 のマスクされた形態のレーダープロットを示す。抗体 2 - 15 は、切断可能ではない切断可能ペプチド配列を含む。レーダープロット上に示される各プロテアーゼによる図 11 A ~ 11 H に示される各抗体の活性化は、活性化が 0 (活性化なし) から 1.0 (完全活性化) までの範囲で表されるレーダープロットを使用して示される。

【図 11 - 2】図 11 - 1 の説明を参照のこと。

【図 11 - 3】図 11 I ~ 11 M は、健康なマウスの血漿中 (図 11 I および 11 J)、および M C 38 腫瘍担持マウスの血漿中 (図 11 K ~ 11 M) の選択抗体を用いたプロテアーゼ切断の、S D S P - P A G E ウェスタンブロット分析の結果を示す。

【図 11 - 4】図 11 - 3 の説明を参照のこと。

【図 11 - 5】図 11 - 3 の説明を参照のこと。

【図 12】図 12 A および 12 B は、プロテアーゼ活性化の存在下または不在下での、ヒト C T L A 4 - F c へのマスクされた抗 C T L A 4 抗体の結合を示すグラフである。プロテアーゼの存在下で、マスクされた抗体は、切断可能なペプチドのプロテアーゼ切断によって「活性化」される。図 12 A は、対照として活性化可能ではないアイソタイプ対照、およびその切断可能なペプチド配列が非切断性であるために活性化可能ではないマスクされた抗体 (抗体 2 - 15) を含む。図 12 B は、対照としてアイソタイプ対照、およびその切断可能なペプチド配列が非切断性であるために活性化可能ではないマスクされた抗体 (抗体 2 - 10) を含む。抗体 2 - 14 の活性化は、マスクされてない親抗体である抗体 2 - 6 と類似のレベルでのヒト C T L A 4 - F c へのその結合を完全に回復させた (図 12 B)。

【図 13 A】図 13 A ~ 13 D は、抗体 1 および抗体 2 のマスクされていない形態について、ブドウ球菌 (S t a p h y l o c c o c c a l) エンテロトキシン B (S E B) アッセ

10

20

30

40

50

イを使用して決定された場合の、IL-2レベル (pg/mL) (図13Aおよび13C)、またはIL-2レベルの変化倍率 (図13Bおよび13D) を示すグラフである。抗体1 (抗体1-1および1-2) のマスクされていない形態 (図13Aおよび13B)、ならびに抗体2 (抗体2-1、抗体2-2、抗体2-3、抗体2-4、および抗体2-5) のマスクされていない形態 (図13Cおよび13D) を、SEBアッセイを使用して末梢単核細胞からのIL-2生成を促進する能力について試験した。すべての試験された抗体1および抗体2の形態は、非抗体対照と比較してIL-2レベルを増加させる能力を示した (図13Aおよび13C)。

【図13B】図13Aの説明を参照のこと。

【図13C】図13Aの説明を参照のこと。

【図13D】図13Aの説明を参照のこと。

【図14A】図14A~14Dは、抗体2のマスクされた形態について、ブドウ球菌エンテロトキシンB (SEB) アッセイを使用して決定された場合の、IL-2レベル (pg/mL) (図14Aおよび14C)、またはIL-2レベルの変化倍率 (図14Bおよび14D) を示すグラフである。抗体2のマスクされていない形態 (抗体2-6) を、抗体2-6 (抗体2-7、抗体2-8、抗体2-9、抗体2-10、抗体2-11、抗体2-12、および抗体2-13) のマスクされた形態とともに試験した。図14Aおよび14Bは、非活性化状態 (すなわち、プロテアーゼへの曝露なし) での、IL-2レベルに対する抗体の影響 (図14A) およびIL-2レベルの変化倍率 (図14B) を示す。マスクされていない親抗体である抗体2-6は、IL-2レベルを著しく増加させる能力を示し、マスクされた抗体 (抗体2-12) のうちの1つのみがIL-2レベルの著しい増加を示すが、抗体2-6よりもはるかに低いレベルである (図14Aおよび14B)。図14Cおよび14Dは、活性化状態 (すなわち、プロテアーゼへの曝露後) での、IL-2レベルに対する抗体の影響 (図14C) およびIL-2レベルの変化倍率 (図14D) を示す。図14Cおよび14Dは、プロテアーゼへの曝露が、マスクされていない親抗体である抗体2-6と類似のレベルでIL-2生成を促進する抗体2-7、抗体2-8、および抗体2-9の能力をレスキューすることを示す。

【図14B】図14Aの説明を参照のこと。

【図14C】図14Aの説明を参照のこと。

【図14D】図14Aの説明を参照のこと。

【図15A】図15A~15Dは、ウェスタンブロット分析によって示されるように、健康なマウスの血漿中のマスクされた抗CTLA4 抗体のインビボでの切断の程度を示す。健康なマウスにおける抗体2 (抗体2-14、抗体2-19、および抗体2-20) のマスクされた形態のインビボでの切断は、抗体の腹腔内投与後2、4、および7日目に示されている。インビトロでプロテアーゼの存在下または不在下でマスクされた抗体を処置した標準試料を、切断の対照として使用した。抗体2-14 (図15A) および抗体2-20 (図15C) の両方をインビボで活性化した。図15Bは、抗体2-19の活性化の欠如を示す。2日目から7日目までの活性化の割合の増加を、抗体2-14および抗体2-20について図15Dに示す。

【図15B】図15Aの説明を参照のこと。

【図15C】図15Aの説明を参照のこと。

【図15D】図15Aの説明を参照のこと。

【図16A】図16A~16Dは、ウェスタンブロット分析によって示されるように、腫瘍担持マウスの血漿中のマスクされた抗CTLA4 抗体のインビボでの切断の程度を示す。MC38腫瘍担持マウスにおける抗体2 (抗体2-14、抗体2-19、および抗体2-20) のマスクされた形態のインビボでの切断は、抗体の腹腔内投与後2、4、および7日目に示されている。インビトロでプロテアーゼの存在下または不在下でマスクされた抗体を処置した標準試料を、切断の対照として使用した。抗体2-14 (図16A) および抗体2-20 (図16C) の両方をインビボで活性化した。図16Bは、抗体2-19の活性化の欠如を示す。2日目から7日目までの活性化の割合の増加を、抗体2-14

および抗体 2-20 について図 16D に示す。抗体 2-14 の活性化率は、二元配置分散分析（調整された P 値 = 0.0113）によって決定された場合に、健康な非腫瘍担持マウスと比較して、MC38 腫瘍担持マウスで有意に大きかった（図 16D）。

【図 16B】図 16A の説明を参照のこと。

【図 16C】図 16A の説明を参照のこと。

【図 16D】図 16A の説明を参照のこと。

【図 17】プロテアーゼへの以前の曝露の結果として、マスクされた状態および「活性化された」状態で、ADCC レポーターバイオアッセイを使用して決定された場合に、マスクされた抗 CTLA4 抗体が ADCC 活性を促進する能力を示すグラフである。図 17 は、マスクされていない親抗体（抗体 2-6）および抗体 2-6（抗体 2-14 および抗体 2-15）のマスクされたバージョンによるレポーター活性化の程度を示す。抗体 2-15 は、陰性対照として使用するための非切断性である切断可能ペプチド配列を含む。また、アイソタイプ対照も試験された。以前のプロテアーゼへの曝露を有する抗体は、「活性化された」ものとして示される。以前のプロテアーゼへの曝露を有することなく試験した場合、マスクされた抗体である抗体 2-14 および抗体 2-15 は、マスクされていない親抗体（抗体 2-6）と比較して、低減されたレポーター活性化を示した（図 17）。プロテアーゼによって活性化可能ではない抗体 2-15 の低減されたレポーター活性化は、以前のプロテアーゼへの曝露によってレスキューされなかった（図 17）。プロテアーゼによって活性化可能な抗体 2-14 のレポーター活性化は、マスクされていない親抗体である抗体 2-6 によって誘導されるものに似ているレベルにレスキューされた（図 17）。

【図 18A】図 18A および 18B は、CTLA4 遮断バイオアッセイを使用して決定された、抗 CTLA4 抗体が、そのリガンドである CD80 および CD86 を含む CTLA4 の相互作用を遮断する能力を示すグラフである。図 18A は、CTLA4 のそのリガンドへの結合を遮断する、抗体 2 のマスクされていない形態（抗体 2-2）および抗体 2 のマスクされた形態（抗体 2-14）の能力を示す。抗体 2-14 を、マスクされた状態（すなわち、以前のプロテアーゼへの曝露なし）で、および以前のプロテアーゼへの曝露のために「活性化された」状態で試験した。比較のために、アッセイもアイソタイプ対照を使用して実行し、また抗体なしで（すなわち、抗体なし対照として）実行した。図 18A は、プロテアーゼの不在によりマスクされた（非活性化された）形態にある場合、抗体 2-14 が、そのリガンドへの CTLA4 結合を効果的に遮断する能力を示さなかったことを示す。抗体なし対照を上回る変化倍率の分析は、マスクされた（非活性化された）形態にある場合の抗体 2-14 の能力と、CTLA4 のそのリガンドへの結合を遮断するアイソタイプ対照の能力との間に有意差を示さなかった（図 18B）。しかしながら、図 18A は、抗体 2-14 が以前のプロテアーゼへの曝露のために「活性化された」形態にある場合、それは、ある範囲の濃度にわたって CTLA4 のそのリガンドへの結合を効果的に遮断する能力を示したことを示す。そのリガンドへの CTLA4 結合を遮断する「活性化された」抗体 2-14 の能力は、マスクされていない抗体 2-2 のものと類似していた（図 18A および 18B）。抗体対照なしを上回る変化倍率の分析は、そのリガンドへの CTLA4 結合を遮断する「活性化された」抗体 2-14 とマスクされていない抗体 2-2 の能力の間に有意差（「n.s.」）を示さなかった（図 18B）。

【図 18B】図 18A の説明を参照のこと。

【図 19A】図 19A～19D は、以下を含むマーカーを発現する CD45+ 細胞の割合を評価した免疫表現型研究の結果を示す：CD3+/ICOS+、CD3+T 細胞、CD4+/Ki67+、CD3+/Ki67+、CD4+/ICOS+、CD4+T 細胞、CD8+/ICOS+、CD8+T 細胞、Treg+/ICOS+、CD8+/Ki67+、Treg、Treg+/Ki67+。

【図 19B】図 19A の説明を参照のこと。

【図 19C】図 19A の説明を参照のこと。

【図 19D】図 19A の説明を参照のこと。

【図 19E】図 19E および 19F は、試験された抗体を比較する統計量を提供する（群

1 : I g G、群 2 : 抗体 2 - 1、群 3 : 抗体 2 - 1 0、群 4 : イピリムマブ、群 5 : イピリムマブ - a F u c)。

【図 1 9 F】図 1 9 E の説明を参照のこと。

【図 2 0 A】図 2 0 A および 2 0 B は、 $20\mu\text{g}$ 、 $7\mu\text{g}$ 、または $2\mu\text{g}$ の試験抗体の単回注射の投与後の経時的な腫瘍体積を示すグラフを示す。

【図 2 0 B】図 2 0 A の説明を参照のこと。

【図 2 1】抗体 2 - 6、抗体 2 - 1 0、抗体 2 - 1 4、抗体 2 - 1 6、またはアイソタイプ対照の投与後の、総 C D 4 + 細胞のうちの K i 6 7 + 細胞の割合を評価することによって、カニクイザルにおける薬力学的効果を評価した、2 つの実験のセット（実験 1 および実験 2）の結果を示すグラフを示す。

10

【図 2 2】以下の試験抗体のうちの 1 つの投与後のカニクイザルにおける薬物動態を評価した実験の結果を示す：R S V - m 対照、イピリムマブ、抗体 2 - 6、抗体 2 - 1 0、抗体 2 - 1 4、抗体 2 - 1 6、またはイピリムマブ - m - マスク。図 2 2 は、1 4 日間の期間にわたる $\mu\text{g}/\text{mL}$ 単位の各投与された抗体のレベルを示すグラフを示す。

【図 2 3 A】投与後 5 日目の末梢血液中の C D 4 + K i 6 7 + 細胞（左）および C D 4 + I C O S + 細胞（右）の割合に関する有効性研究の結果を示すグラフであり、これは T 細胞活性化のレベルを表す。

【図 2 3 B】 $10\text{mg}/\text{kg}$ （R S V - m 対照）または $3\text{mg}/\text{kg}$ （イピリムマブ、抗体 2 - 6、抗体 2 - 1 4、抗体 2 - 1 5）で処置されたマウスにおいて、7 日目に評価された腫瘍重量（左）および C D 8 / T r e g 比（右）を示すグラフを示す。

20

【図 2 3 C】マウスにおける R S V - m 対照、イピリムマブ、抗体 2 - 6、抗体 2 - 1 4、または抗体 2 - 1 5 の投与後の、腫瘍微小環境における制御性 T 細胞（左）および腫瘍微小環境における C D 8 + T 細胞（右）を示すグラフを示す。

【図 2 3 D】R S V - m 対照、イピリムマブ、抗体 2 - 6、抗体 2 - 1 4、および抗体 2 - 1 5 を含む抗体の $0.3\text{mg}/\text{kg}$ 、 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、または $10\text{mg}/\text{kg}$ の投与後の、マウスにおける経時的な腫瘍体積 (mm^3) を示すグラフを示す。

【図 2 4 A】血漿、腎臓、肝臓、および腫瘍組織における、抗体 2 - 6、抗体 2 - 1 4、抗体 2 - 1 6、および抗体 2 - 1 0 の切断を評価した M C A 2 0 5 線維肉腫細胞を使用した S D S - P A G E ウェスタンブロット分析の結果を示す。

【図 2 4 B】血漿、腎臓、および肝臓組織における、抗体 2 - 6、抗体 2 - 1 4、抗体 2 - 1 6、および抗体 2 - 1 0 の切断を評価した M B 4 9 細胞を使用した S D S - P A G E ウェスタンブロット分析の結果を示す。

30

【図 2 4 C】血漿、腎臓、肝臓、および腫瘍組織における、抗体 2 - 6、抗体 2 - 1 4、抗体 2 - 1 6、および抗体 2 - 1 0 の切断を評価した M C 3 8 細胞を使用した S D S - P A G E ウェスタンブロット分析の結果を示す。

【図 2 4 D】切断を評価した M C 3 8 細胞を使用した S D S - P A G E ウェスタンブロット分析の結果を示し、選択試料に対する切断の割合を提供する。切断の割合は、デンストメトリー強度（切断% = 下側バンド / （下側バンド + 上側バンド））に基づいて計算された。

【図 2 4 E】各抗体と C T L A 4 との間の結合を示すグラフを示し、各抗体は、M B 4 9 担持 B - h C T L A 4 トランスジェニックマウスへの投与後に血漿、腎臓、肝臓、または脾臓から単離された。

40

【図 2 4 F】例示的なプロテアーゼのパネルによる切断可能なペプチド基質のインビトロでの切断のヒートマップを示す。

【図 2 5 A】図 2 5 A ~ 2 5 F は、識別されたマウスモデル（C 5 7 / B l 6 - w t、M C 3 8 - w t、M C 3 8 - h C T L A 4、M B 4 9 - w t、M C A 2 0 5 - w t、B 1 6 - w t）を使用して、調整された培地における切断の頻度を示すレーダープロットを示す。培地を、脾臓、肝臓、腎臓、血漿、または腫瘍など、示されるように組織で調整した。

【図 2 5 B】図 2 5 A の説明を参照のこと。

【図 2 5 C】図 2 5 A の説明を参照のこと。

50

【図 2 5 D】図 2 5 A の説明を参照のこと。

【図 2 5 E】図 2 5 A の説明を参照のこと。

【図 2 5 F】図 2 5 A の説明を参照のこと。

【図 2 6 A】図 2 6 A および 2 6 B は、抗体 2-14 を使用した健康なカニクイザルの血漿におけるインビボでの切断研究の結果を示す。図 2 6 A に示されるように、キャピラリー電気泳動 (CE) および質量分析法 (MS) を使用して、示されるように、抗体 2-14 の切断を計算した。図 2 6 B は、1 時間、24 時間、および 72 時間での抗体 2-14 のインタクトな切断生成物の割合を示すグラフを示す。

【図 2 6 B】図 2 6 A の説明を参照のこと。

【図 2 6 C】示されるように、キャピラリー電気泳動 (CE) および質量分析法 (MS) を使用して計算された切断の評価を含む、抗体 2-16 を使用した健康なカニクイザルの血漿におけるインビボでの切断研究の結果を示す。

【図 2 7 A】図 2 7 A および 2 7 B は、ヒトの肺または結腸腫瘍試料で調整された培地を使用したエクスピボでの切断研究の結果を示す。

【図 2 7 B】図 2 7 A の説明を参照のこと。

【図 2 8-1】図 2 8 A ~ 2 8 D は、結腸腫瘍上清との質量分析を使用した、切断された分子 (抗体 2-14、図 2 8 A ; 抗体 2-15、図 2 8 B ; 抗体 2-16、図 2 8 C ; 抗体 2-10、図 2 8 D) の割合 (%) の分析を示す。

【図 2 8-2】図 2 8-1 の説明を参照のこと。

【図 2 8-3】図 2 8 E は、抗体 2-6、抗体 2-14、抗体 2-15、抗体 2-10、抗体 2-16、およびマスクされたイピリムマブームを使用して行われた ELISA アッセイの結果を示し、各試験された抗体は、結腸腫瘍調整培地 (結腸 24 sept 結腸腫瘍試料) または対照としての RPMI のいずれかで培養された。

【図 2 9】示される細胞株または腫瘍 / NAT 組織から調整された無血清またはウシ胎仔血清 (FCS) 補充培地において完了した LDH 放出アッセイを使用して測定された細胞の細胞傷害性を示す。

【図 3 0】MC38 および H2228 細胞株の基質切断を、ice Logo グラフィックとして示す。

【図 3 1 A】図 3 1 A および 3 1 B は、NAT および腫瘍 (TUM) 組織の基質切断を、ice Logo として示す。

【図 3 1 B】図 3 1 A の説明を参照のこと。

【図 3 1 C】P4-P4' 位置での Zスコアの差をヒートマップとして示し、NAT または腫瘍特異的切断で好ましい残基を強調表示する。ノルロイシン (n) は、ライブラリ内の Met のプロキシである。

【図 3 1 D】P4-P4' 位置での Zスコアの差をヒートマップとして示し、NAT または腫瘍試料のいずれかと比較して、H2228 特異的切断で好ましい残基を強調表示する。ノルロイシン (n) は、ライブラリ内の Met のプロキシである。

【図 3 2 A】図 3 2 A および 3 2 B は、MC38 調整培地を用いた選択された基質の生成物形成曲線を示す; AK10-01 (図 3 2 A、左)、AK10-02 (図 3 2 A、右)、AK10-04 (図 3 2 B、左)、および AK10-05 (図 3 2 B、右)。

【図 3 2 B】図 3 2 A の説明を参照のこと。

【図 3 3】AK10 ライブラリペプチドとの MC38 AMS P-MS 反応からの主要な切断生成物の相対効率を示す。

【図 3 4 A】図 3 4 A および 3 4 B は、H2228 調整培地を用いた選択された基質の生成物形成曲線を示す; AK10-01 (図 3 4 A、左上)、AK10-02 (図 3 4 A、右上)、AK10-04 (図 3 4 A、下)、AK10-09 (図 3 4 B、左)、および AK10-10 (図 3 4 B、右)。

【図 3 4 B】図 3 4 A の説明を参照のこと。

【図 3 5】それらの相対効率とともに AMS P-MS を介して H2228 調整培地によって切断された上位の基質を示す。

10

20

30

40

50

【図36A】図36A～36Cは、腫瘍調整培地を用いた選択された基質の生成物形成曲線を示す；AK10-01（図36A、左上）、AK10-02（図36A、上中央）、AK10-03（図36A、下）、AK10-04（図36B、左上）、およびAK10-05（図36B、右上）、AK10-09（図36B、下）、AK10-09酸化ペプチド（図36C、左）、およびAK10-10（図36C、右）。

【図36B】図36Aの説明を参照のこと。

【図36C】図36Aの説明を参照のこと。

【図36D】それらの相対効率とともに示されるAMSP-MSを介して腫瘍調整培地によって切断された上位の基質を示す。

【図37A】図37A～37Dは、NAT調整培地を用いた選択された基質の生成物形成曲線を示す；AK10-01（図37A、上）、AK10-02（図37A、下）、AK10-04（図37B、上）、およびAK10-05（図37B、下）、AK10-09（図37C、上）、AK10-09酸化ペプチド（図37C、下）、およびAK10-10（図37D）。

【図37B】図37Aの説明を参照のこと。

【図37C】図37Aの説明を参照のこと。

【図37D】図37Aの説明を参照のこと。

【図37E】相対効率とともにペプチドのAK10ライブラリを有するNAT調整培地によって生成された上位の切断を示す。

【図38】腫瘍対NAT組織試料において、火山型プロットとして差次的に発現されたタンパク質を示す。統計的に有意なタンパク質は、 ≥ 2 倍の変化の差の閾値倍率を有する。腫瘍（右側上、セクション2）またはNAT（左側上、セクション1）に顕著に富むタンパク質が、これらのセクションに存在する。

【発明を実施するための形態】

【0054】

詳細な説明

チェックポイント阻害剤などの治療は、癌において前例のない応答を示すが、その使用は、免疫関連有害事象（irAE）および他の毒性（例えば、下垂体炎）によって制限される。例えば、腫瘍微小環境で、標的部位でのプロテアーゼによる活性化後に特異的にCTLA4を結合させ、持続的な応答速度の増加および有意に改善された安全性プロファイルを達成するために、タンパク質治療薬が本明細書に提供される。本明細書に提供されるタンパク質治療薬は、癌の特徴のうちの1つである高局所濃度の活性プロテアーゼを利用することによって、腫瘍微小環境に対する薬理学的活性を正確に標的化するように操作される。腫瘍微小環境のこの特徴は、全身的に不活性な分子を局所的に活性な薬物へと形質転換するために使用される。腫瘍微小環境での薬物の活性化は、活性形態で対象に投与される薬物と関連付けられ得る全身毒性を有意に低減させる。

【0055】

I. 定義

本発明を詳細に説明する前に、本発明は、当然のことながら変化し得る特定の組成物または生物学系に限定されないことが理解されるべきである。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明する目的のためのものであるに過ぎず、制限を意図するものではないことを理解されたい。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「1つ（a）」、「1つ（an）」、および「その（the）」は、内容が他に明確に指示されない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、抗体への言及は、任意に、2つ以上のかかる抗体の組み合わせなどを含む。

【0056】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、この技術分野の当業者に容易に知られているそれぞれの値に対する通常の誤差範囲を指す。本明細書の「約」の値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータを本質的に対象とする実施形態を含む（および記載する）。

10

20

30

40

50

【0057】

本明細書に記載される本発明の態様および実施形態は、態様および実施形態を「含む」、「からなる」、および「から本質的になる」を含むことが理解される。

【0058】

「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（イムノグロブリンFc領域を有する完全長抗体を含む）、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体、ダイアボディ、および単鎖分子、ならびに抗体断片（例えば、Fab、F(ab')₂、およびFv）を含む。「イムノグロブリン（Ig）」という用語は、本明細書において「抗体」と互換的に使用される。

【0059】

塩基性4鎖抗体ユニットは、2つの同一の軽（L）鎖と2つの同一の重（H）鎖とから構成されるヘテロ四量体糖タンパク質である。IgM抗体は、J鎖と呼ばれる追加のポリペプチドとともに、5個の塩基性ヘテロ四量体ユニットからなり、10個の抗原結合部位を含むが、一方でIgA抗体は、J鎖と組み合わせた多価集合体を形成するように重合することができる2〜5個の塩基性4鎖ユニットからなる。IgGの場合、4鎖ユニットは、概して、約150,000ダルトンである。各L鎖は、1つの共有結合ジスルフィド結合によってH鎖に連結されるが、一方で2つのH鎖は、H鎖アイソタイプに応じて、1つ以上のジスルフィド結合によって互いに連結される。各H鎖およびL鎖はまた、規則的な間隔を置いた鎖内ジスルフィド架橋を有する。各H鎖は、N末端に可変ドメイン（VH）を有し、続いて各α鎖およびγ鎖に対して3つの定常ドメイン（CH）、ならびにμおよびεアイソタイプに対して4つのCHドメインを有する。各L鎖は、N末端に可変ドメイン（VL）を有し、続いてその他方の末端に定常ドメインを有する。VLは、VHと整列し、CLは、重鎖（CH1）の第1の定常ドメインと整列する。特定のアミノ酸残基は、軽鎖および重鎖可変ドメインの間の界面を形成すると考えられる。VHおよびVLの対合は一緒に単一の抗原結合部位を形成する。抗体の異なるクラスの構造および特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6を参照されたい。

【0060】

任意の脊椎動物種由来のL鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパおよびラムダと呼ばれる、2つの明確に異なるタイプのうちの1つに割り当てることができる。その重鎖の定常ドメイン（CH）のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てることができる。免疫グロブリンには5つのクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、それぞれ、指定されたα、δ、ε、γ、およびμの重鎖を有する。γおよびαのクラスは、CH配列および機能における比較的小さな差異に基づいてサブクラスにさらに分割され、例えば、ヒトは、以下のサブクラス：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2を発現する。IgG1抗体は、アロタイプと称される複数の多型バリエーション（Jefferys and Lefranc 2009, mAbs Vol 1 Issue 4 1-7）に存在してもよく、そのいずれも本発明での使用に好適である。ヒト集団における一般的なアロタイプバリエーションは、a、f、n、zという文字で示されるものである。

【0061】

「単離された」抗体は、その生成環境（例えば、天然または組換え）の構成要素から識別され、分離され、および／または回収された抗体である。いくつかの実施形態では、単離されたポリペプチドは、その生成環境から他のすべての構成要素と無関連である。組換えトランスフェクト細胞から生じるものなどのその生成環境の汚染成分は、抗体の研究、診断、または治療用途に典型的には干渉する材料であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性もしくは非タンパク質性溶質を含み得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、（1）例えば、Lowry法によって決定される抗体の95重量%超まで、およ

10

20

30

40

50

びいくつかの実施形態では、99重量%超まで、(1)回転カップシークエンサーの使用によってN末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも15個の残基を得るのに十分な程度まで、または(3)Coomassieブルーまたは銀染色を使用した非還元もしくは還元条件下でのSDS-PAGEによる均質性まで精製される。抗体の天然環境の少なくとも1つの構成要素が存在しないため、単離された抗体は、組換え細胞内で*in situ*で抗体を含む。しかしながら、通常、単離されたポリペプチドまたは抗体は、少なくとも1つの精製ステップによって調製される。

【0062】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、わずかな量で存在し得る可能な天然発生型変異および／または翻訳後修飾（例えば、異性化、アミド化）を除き、同一である。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、重鎖および／または軽鎖でC末端切断を有する。例えば、1、2、3、4、または5個のアミノ酸残基は、重鎖および／または軽鎖のC末端で切断される。いくつかの実施形態では、C末端切断は、重鎖からC末端リジンを除去する。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、重鎖および／または軽鎖でN末端切断を有する。例えば、1、2、3、4、または5個のアミノ酸残基は、重鎖および／または軽鎖のN末端で切断される。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体の短縮型形態は、組換え技術によって作製され得る。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に配向されている。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、複数の抗原部位（例えば、二重特異性抗体または多重特異性抗体など）に配向されている。「モノクローナル」という修飾語句は、実質的に均質な抗体群から取得されたときの抗体の特徴を示すが、任意の特定の方法による抗体の生成が必要とはみなされないものとする。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージ提示技術、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の一部もしくはすべてまたはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子を有する動物においてヒトまたはヒト様抗体を生成するための技術を含む、様々な技術によって作製され得る。

【0063】

「ネイキッド抗体」という用語は、細胞傷害性部分または放射性標識と複合体化されていない抗体を指す。

【0064】

「親抗体」という用語は、マスキングペプチドを用いた抗体のマスキングなど、修飾前の抗体を指す。

【0065】

「マスクされた抗体」という用語は、マスキングペプチド、およびいくつかの実施形態では、好ましい環境でマスキングペプチドの活性化または除去を可能にする他の構成要素を含むように修飾された抗体を指す。

【0066】

「抗体-薬物複合体」または「ADC」は、細胞傷害性薬剤を含むがこれに限定されない、1つ以上の異種分子（複数可）と複合体化された抗体を指す。

【0067】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、または「全抗体」という用語は、抗体断片とは対照的に、その実質的にインタクトな形態の抗体を指すように互換的に使用される。具体的には、全抗体は、Fc領域を含む重鎖および軽鎖を有するものを含む。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列バリエーションであってもよい。いくつかの場合では、インタクトな抗体は、1つ以上のエフェクター機能を有してもよい。

【0068】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部、抗原結合、および／またはインタクトな抗体の可変領域を含む。抗原結合抗体断片の例としては、ドメイン抗体（dAbs）、F

a b、F a b'、F (a b')₂、およびF v断片；抗体；線形抗体（米国特許第5,641,870号、実施例2、Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995]を参照されたい）；一本鎖抗体分子、および抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。単一の重鎖抗体または単一の軽鎖抗体は、操作することができ、または重鎖の場合には、単一の重鎖分子を生成するように操作されたラクダ、サメ、ライブラリ、またはマウスから単離することができる。

【0069】

抗体のパパイン消化は、「F a b」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片と、容易に結晶化する能力を反映する名称である残留「F c」断片とを生成した。F a b断片は、H鎖（V H）の可変領域ドメイン、および1つの重鎖（C H1）の第1の定常ドメインとともに、L鎖全体からなる。各F a b断片は、抗原結合に関して一価であり、すなわち、単一の抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理は、異なる抗原結合活性を有する2つのジスルフィド結合したF a b断片にほぼ対応する単一の大きなF (a b')₂断片を産出し、依然として抗原を架橋することができる。F a b'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含むC H1ドメインのカルボキシ末端に数個の追加の残基を有することによって、F a b断片とは異なる。F a b'-S Hは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を有するF a b'の本明細書における名称である。F (a b')₂抗体断片は、元々、それらの間にヒンジシステインを有するF a b'断片の対として生成された。抗体断片の他の化学結合もまた既知である。

【0070】

F c断片は、ジスルフィドによって一緒に保持される両方のH鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、F c領域内の配列およびグリカンによって決定され、F c受容体（F c R）によっても認識される領域は、ある特定の細胞型上に見られる。

【0071】

「F v」は、完全な抗原認識および結合部位を含む最小抗体断片である。この断片は、緊密な非共有結合の会合における1つの重鎖可変領域ドメインおよび1つの軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる。これら2つのドメインのフォールディングから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、かつ抗体に抗原結合特異性を付与する、6つの超可変ループ（それぞれH鎖およびL鎖から3ループ）が発せられる。しかしながら、単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な3つのH V Rのみを含むF vの半分）でさえも、抗原を認識し結合する能力を有するが、結合部位全体よりも低い親和性である。

【0072】

また、「s F v」または「s c F v」と省略される「一本鎖F v」は、単一のポリペプチド鎖に結合されたV HおよびV L抗体ドメインを含む抗体断片である。いくつかの実施形態では、s F vポリペプチドは、V HドメインとV Lドメインとの間にポリペプチドリinkerをさらに含み、それにより、s F vが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする。s F vの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照されたい。

【0073】

本発明の抗体の「機能性断片」は、インタクトな抗体の一部を含み、概して、インタクトな抗体の抗原結合領域もしくは可変領域、または修飾F c R結合能を保持するもしくは有する抗体のF v領域を含む。抗体断片の例としては、線形抗体、一本鎖抗体分子、および抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。

【0074】

本明細書のモノクローナル抗体は、具体的には、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか、または相同である、「キメラ」抗体（イムノグロブリン）を含むが、残りの鎖（複数可）は、それらが所望の生物学的活性を呈する限り、別の種に由

来する抗体、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体、ならびにかかる抗体の断片の対応する配列と同一であるか、または相同である（米国特許第4,816,567号、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)）。本明細書の目的のキメラ抗体は、PRIMATIZED（登録商標）抗体を含み、抗体の抗原結合領域は、例えば、目的の抗原を有するマカクザルを免疫化することによって生成される抗体に由来する。本明細書で 사용되는場合、「ヒト化抗体」は、「キメラ抗体」のサブセットとして使用される。

【0075】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。一実施形態では、ヒト化抗体は、レシピエントのHV Rからの残基が、所望の特異性、親和性、および／または能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）のHV Rからの残基によって置き換えられるヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのFR残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に見出されない残基を含み得る。これらの修飾は、結合親和性などの抗体性能をさらに精密化するために行われてもよい。概して、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、および典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、その中で、超可変ループのすべてまたは実質的にすべては、非ヒト免疫グロブリン配列のものに対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべては、非ヒト免疫グロブリンのものであるが、FR領域は、結合親和性、異性化、免疫原性などの抗体性能を改善する1つ以上の個々のFR残基置換を含み得る。いくつかの実施形態では、FRにおけるこれらのアミノ酸置換の数は、H鎖では6個以下であり、L鎖では3個以下である。またヒト化抗体は任意に、少なくとも、免疫グロブリン定常領域（Fc）の一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの一部を含む。さらなる詳細については、例えば、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)、およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照されたい。例えば、Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)、Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)、Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)、ならびに米国特許第6,982,321号および第7,087,409号もまた参照されたい。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、単一の抗原部位に対して配向される。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は、複数の抗原部位に対して配向される。代替的なヒト化方法は、米国特許第7,981,843号および米国特許出願公開第2006/0134098号に記載されている。

【0076】

抗体の「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体の重鎖または軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。したがって、本明細書で 사용되는場合、「可変領域」および「可変ドメイン」は、互換的に使用され得る。重鎖および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ「VH」および「VL」と称され得る。これらのドメインは、概して、抗体の最も可変な部分（同じクラスの他の抗体と比較して）であり、抗原結合部位を含む。重鎖および軽鎖の可変ドメインは、任意の利用可能な方法または番号付けスキームを使用して決定することができ、例えば、WO2018/207701に記載される可変ドメインを含んでもよく、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、重鎖および／または軽鎖の可変ドメインは、可変ドメインのカルボキシル末端上に（すなわち、第4のフレームワークドメインのカルボキシル末端に）1つ以上のアミノ酸残基を欠いていてもよく、そうでなければ、ある特定の番号付けスキームに基づく可変ドメインの説明に含まれてもよい。いくつかの実施形態では、重鎖および／または軽鎖の可変ドメインは、可変ドメインのカルボキシル末端上に（すなわち、第4のフレームワークドメインのカルボキシル

10

20

30

40

50

末端に) 1つ以上のアミノ酸残基を含んでもよく、そうでなければ、ある特定の番号付けスキームに基づく可変ドメインの説明に含まれていなくてもよい。

【0077】

本明細書で使用される場合、「超可変領域」、「HVR」、または「HV」は、配列において超可変であり、かつ／または構造的に画定されたループを形成する、抗体可変ドメインの領域を指す。概して、抗体は、6つのHVRを含み、VHに3つ(H1、H2、H3)、VLに3つ(L1、L2、L3)である。天然抗体では、H3およびL3は、6つのHVRの最も多様性を示し、特にH3は、抗体に微細な特異性を付与する上で固有の役割を果たすと考えられる。例えば、Xu et al. *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003))を参照されたい。実際に、重鎖のみからなる天然発生型ラクダ科抗体は、軽鎖の不在下で機能的かつ安定的である。例えば、Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-448 (1993)およびSheriff et al., *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996)を参照されたい。

10

【0078】

いくつかのHVRの説明が使用されており、本明細書に包含される。Kabat相補性決定領域(CDR)であるHVRは、配列変動性に基づき、最も一般的に使用される(Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991))。Chothia HVRは、代わりに構造ループの位置を指す(Chothia and Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。「コンタクト」HVRは、利用可能な複雑な結晶構造の分析に基づく。これらのHVRの各々からの残基を以下に記載する。

20

ループ	Kabat	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L26-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 番号付け)
H1	H31-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 番号付け)
H2	H50-H65	H53-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H93-H101

30

【0079】

別段の示唆が無い限り、可変ドメイン残基(HVR残基およびフレームワーク領域残基)は、Kabatらの上記に従って番号付けされる。

40

【0080】

「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書に定義されるHVR残基以外の可変ドメイン残基である。

【0081】

「Kabatにある可変ドメイン残基番号付け」または「Kabatにあるアミノ酸位置番号付け」という表現、またはその変形は、Kabatらの上記の抗体の編集物の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに使用される番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを使用して、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFRもしくはHVRの短縮、またはFRもしくはHVRへの挿入に対応する、より少ないまたは追加のアミノ

50

酸を含んでもよい。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52後の単一アミノ酸挿入（Kabattによる残基52a）、および重鎖FR残基82後の挿入された残基（例えば、Kabattによる残基82a、82b、および82cなど）を含み得る。残基のKabatt番号付けは、所与の抗体について、「標準」のKabatt番号付けされた配列とともに抗体の配列の相同性の領域での整列によって決定されてもよい。

【0082】

本明細書の目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来するVLまたはVHフレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに「由来」するアクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでもよく、または既存のアミノ酸配列変化を含んでもよい。いくつかの実施形態では、既存のアミノ酸変化の数は、10個以下、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下、または2個以下である。

【0083】

参照ポリペプチド配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、それらの配列を整列させ、必要であればギャップを導入して配列同一性の最大パーセントを達成した後の、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の割合として定義され、配列同一性の一部としての任意の保存的置換を考慮していない。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するための整列は、当該技術分野の技術範囲内にある種々の方法、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign（DNASTAR）ソフトウェアなどの公開されている入手可能なコンピューターソフトウェアを用いて実現することができる。当業者であれば、比較する配列の完全長にわたる最大整列を達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列するための適切なパラメータを決定することができる。例えば、所与のアミノ酸配列Bに対する、所与のアミノ酸配列Bとの、または所与のアミノ酸配列Bに対する、所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性％（所与のアミノ酸配列Bに対する、所与のアミノ酸配列Bとの、または所与のアミノ酸配列Bに対する、ある一定のアミノ酸配列同一性％を有するかまたは含む所与のアミノ酸配列Aと代替的に称され得る）は、以下のように計算される。

$$100 \times \text{分数 } X / Y$$

式中、Xは、そのプログラムのAおよびBの整列における配列によって同一の一致としてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Yは、Bにおけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、A対Bのアミノ酸配列同一性％は、B対Aのアミノ酸配列同一性％とは等しくないことが理解されよう。

【0084】

特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに「結合する」、「特異的に結合する」、または「特異的である」抗体は、任意の他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに結合する抗体である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）の、関連のない抗CTLA4ポリペプチドへの結合は、当該技術分野で既知の方法（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA））によって測定された場合、CTLA4への抗体結合の約10％未満である。いくつかの実施形態では、CTLA4（例えば、マウスCTLA4および／またはヒトCTLA4）に結合する結合タンパク質（例えば、抗体）は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 2 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.7 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.6 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.5 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、または $\leq 0.001 \text{ nM}$ （例えば、 10^{-8} M 以下、例えば、 $10^{-8} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば、 $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ ）の平衡解離定数（ K_D ）を有する。

【0085】

本明細書に提供される「CTLA4」または「CTLA4タンパク質」という用語は、

CTLA4タンパク質活性（例えば、CTLA4と比較して少なくとも50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の活性以内）を維持する、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA4）またはそのバリエーションもしくは相同体の組換え型または天然発生型の形態のうちのいずれかを含む。いくつかの態様では、バリエーションまたは相同体は、天然発生型CTLA4ポリペプチドと比較して、配列全体または配列の一部（例えば、50、100、150、または200の連続アミノ酸部分）にわたって、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、CTLA4は、NCBI配列参照GI:83700231、相同体、またはその機能性断片によって識別されるタンパク質である。いくつかの実施形態では、CTLA4は、ヒトCTLA4である。いくつかの実施形態では、CTLA4は、マウスCTLA4である。

10

【0086】

抗体「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（天然配列のFc領域またはアミノ酸配列バリエーションのFc領域）に起因する生物学的活性を指し、抗体アイソタイプによって変化する。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合および補体依存性細胞障害、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、貪食作用、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御、ならびにB細胞活性化が挙げられる。

【0087】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」は、ある特定の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）に存在するFc受容体（FcR）上で結合された分泌されたIgが、これらの細胞傷害性エフェクター細胞を抗原担持標的細胞に特異的に結合させ、その後、標的細胞を細胞毒素で殺傷することを可能にする、ある形態の細胞傷害を指す。抗体は、細胞傷害性細胞を「アーム」し、この機構によって標的細胞を殺傷するために必要である。ADCC、NK細胞を媒介するための初代細胞は、FcγRIIIのみを発現し、一方、単球は、FcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIを発現する。造血細胞上のFc発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991) の464ページ目の表3に要約されている。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）は、Fcグリカンをつコシル化してADCCを強化させる能力を欠く細胞において操作または発現される。目的の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号に記載されるアッセイなどのインビトロADCCアッセイが行われ得る。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。あるいは、またはさらに、対象分子のADCC活性は、例えば、Clynes et al., *PNAS USA* 95:652-656 (1998) に開示されるものなどの動物モデルにおいてインビボで評価されてもよい。ADCC活性および他の抗体特性を変化させる他のFcバリエーションには、Ghetie et al., *Nat Biotech.* 15:637-40, 1997、Duncan et al., *Nature* 332:563-564, 1988、Lund et al., *J. Immunol* 147:2657-2662, 1991、Lund et al., *Mol Immunol* 29:53-59, 1992、Alegre et al., *Transplantation* 57:1537-1543, 1994、Hutchins et al., *Proc Natl. Acad Sci USA* 92:11980-11984, 1995、Jefferys et al., *Immunol Lett.* 44:111-117, 1995、Lund et al., *FASEB J* 9:115-119, 1995、Jefferys et al., *Immunol Lett* 54:101-104, 1996、Lund et al., *J Immunol* 157:4963-4969, 1996、Armour et al., *Eur J Immunol* 29:2613-2624, 1999、Idusogie et al., *J Immunol* 164:4178-418

20

30

40

50

4, 2000, Reddy et al, J Immunol 164:1925-1933, 2000, Xu et al., Cell Immunol 200:16-26, 2000, Idusogie et al, J Immunol 166:2571-2575, 2001, Shields et al., J Biol Chem 276:6591-6604, 2001, Jefferis et al, Immunol Lett 82:57-65. 2002, Presta et al., Biochem Soc Trans 30:487-490, 2002, Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005-4010, 2006、米国特許第5, 624, 821号、第5, 885, 573号、第5, 677, 425号、第6, 165, 745号、第6, 277, 375号、第5, 869, 046号、第6, 121, 022号、第5, 624, 821号、第5, 648, 260号、第6, 194, 551号、第6, 737, 056号、第6, 821, 505号、第6, 277, 375号、第7, 335, 742号、および第7, 317, 091号によって開示されるものを含む。

【0088】

本明細書の「Fc領域」という用語は、天然配列Fc領域およびバリエーションFc領域を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を画定するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化し得るが、ヒトIgG重鎖のFc領域は通常、Cys226の位置のアミノ酸残基、またはPro230の位置のアミノ酸残基から、そのカルボキシル末端に及ぶと画定される。本発明の抗体で使用するための好適な天然配列Fc領域には、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4が含まれる。

【0089】

本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、分子（例えば、抗体）およびその結合パートナー（例えば、抗原）の単一結合部位間の非共有結合相互作用の強度を指す。いくつかの実施形態では、CTLA4に対する結合タンパク質（例えば、抗体）の親和性は、概して、平衡解離定数（ K_D ）によって表され得る。親和性は、本明細書に記載されるものを含む当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定することができる。

【0090】

本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、分子（例えば、抗体）およびその結合パートナー（例えば、抗原）の複数の結合部位の結合強度を指す。

【0091】

本明細書の抗体をコードする「単離された」核酸分子は、それが生成された環境で通常関連する少なくとも1つの汚染核酸分子から識別および分離される核酸分子である。いくつかの実施形態では、単離された核酸は、生成環境と関連付けられたすべての構成要素と無関連である。本明細書のポリペプチドおよび抗体をコードする単離された核酸分子は、それが天然に見出される形態または環境以外の形態である。したがって、単離された核酸分子は、細胞内に天然に存在する本明細書のポリペプチドおよび抗体をコードする核酸と区別される。

【0092】

「薬学的製剤」という用語は、活性成分の生物学的活性が効果的であることを可能にするような形態であり、かつ製剤が投与される対象に対して許容できない毒性を有する追加の構成要素を含まない、調製物を指す。かかる製剤は滅菌されている。

【0093】

本明細書で使用される場合、「担体」は、用いられる用量および濃度でそれに曝露される細胞または哺乳動物に非毒性である薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤を含む。生理学的に許容される担体は、水性pH緩衝溶液であることが多い。生理学的に許容される担体の例としては、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸を含む抗酸化物質；低分子量（約10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、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、もしくはデキスト

リンを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；ならびに／またはTWEEN（商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、およびPLURONICS（商標）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0094】

本明細書で使用される場合、「治療」という用語は、臨床病理の経過中に治療されている個体または細胞の自然経過を変えるように設計された臨床介入を指す。治療の望ましい効果には、疾患進行の速度の低下、疾患状態の改善または緩和、ならびに寛解または予後の改善が含まれる。個体は、例えば、障害（例えば、腫瘍性疾患）に関連する1つ以上の症状が軽減または除去される場合、首尾よく「治療される」。例えば、治療が、疾患を患う個体の生活の質の向上、疾患の治療に必要な他の薬剤の用量の減少、疾患の再発頻度の低減、疾患の重症度の低減、疾患の発症もしくは進行の遅延、および／または個体の生存の延長をもたらす場合、個体は、首尾よく「治療される」。

10

【0095】

本明細書で使用される場合、「と併用して」または「と組み合わせて」は、別の治療モダリティに加えて、1つの治療モダリティの投与を指す。したがって、「と併用して」または「と組み合わせて」は、個体への他の治療モダリティの投与の前、その間、またはその後の、1つの治療モダリティの投与を指す。

【0096】

本明細書で使用される場合、「予防」という用語は、個体における疾患の発生または再発に関して予防を提供することを含む。個体は、障害の素因がある、障害にかかりやすい、または障害を発症するリスクがあるが、障害と診断されていない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体）は、障害の発症を遅らせるために使用される。

20

【0097】

本明細書で使用される場合、障害を発症する「リスクがある」個体は、検出可能な疾患または疾患の症状を有してもよく、または有さなくてもよく、本明細書に記載される治療方法の前に、検出可能な疾患または疾患の症状を示していても、または示さなくてもよい。「リスクがある」とは、当該技術分野で既知であるように、個体が、疾患の発症と相関する測定可能なパラメータである1つ以上のリスク因子を有することを示す。これらのリスク因子のうちの1つ以上を有する個体は、これらのリスク因子のうちの1つ以上を有しない個体よりも、障害を発症する確率が高い。

30

【0098】

「有効量」は、少なくとも、治療結果または予防的結果を含む、所望のまたは示された効果を達成するために、必要な投与量および期間で有効な量を指す。有効量は、1つ以上の投与で提供され得る。「治療有効量」は、少なくとも、特定の障害の測定可能な改善に影響を与えるために必要な最小濃度である。本明細書における治療有効量は、患者の疾患状態、年齢、性別、および体重などの因子、ならびに個体において所望の応答を誘発する抗体の能力に応じて変化し得る。治療有効量はまた、治療上有益な効果が抗体の任意の毒性または有害な効果を上回る量であり得る。「予防有効量」は、所望の予防的結果を達成するために、必要な投与量および期間で有効な量を指す。典型的には、必ずしもではないが、予防用量は、疾患の前または早期の段階の対象において使用されるため、予防有効量は、治療有効量よりも少なくともよい。

40

【0099】

「慢性的」投与は、長期間にわたる初期治療効果（活性）を主流にするように、急性モードとは対照的に、連続での医薬（複数可）の投与を指す。「断続的」投与は、中断することなく連続的に行われるのではなく、むしろ本質的に周期的である治療である。

【0100】

本明細書で使用される場合、「個体」または「対象」は、哺乳動物である。治療の目的

50

のための「哺乳動物」には、ヒト、家畜および農場動物、ならびにイヌ、ウマ、ウサギ、ウシ、ブタ、ハムスター、スナネズミ、マウス、フェレット、ラット、ネコなどの動物園、スポーツ、またはペット動物が含まれる。いくつかの実施形態では、個体または対象は、ヒトである。

【0101】

II. 活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質

一態様では、(i) CTLA4結合ドメイン、(ii) CTLA4結合ドメインマスキングペプチド（本明細書では「マスキングペプチド」とも称される）、および(iii) マスキングペプチドをCTLA4結合ドメインに結合する切断可能なペプチドを含むリンカーを含む、活性化可能なマスクされた細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA4）結合タンパク質が提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされたCTLA4結合タンパク質は、マスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされたCTLA4結合タンパク質は、CTLA4に結合するマスクされた二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされたCTLA4結合タンパク質は、CTLA4に結合するマスクされたキメラ受容体である。

【0102】

本明細書に提供される活性化可能なマスクされたCTLA4結合タンパク質は、様々な種に由来するCTLA4に結合することができ、例えば、ヒトCTLA4および／またはマウスCTLA4、もしくはカニクイザルCTLA4に結合するものもある。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、以下の特徴のうちの1つ以上を有する：(1) CTLA4（例えば、ヒトCTLA4）を結合する、(2) マスキングペプチドを結合タンパク質に連結するペプチドリリンカーのプロテアーゼ切断後のより高い親和性でCTLA4を結合する（例えば、活性化）、および(3) CTLA4を腫瘍部位でインビボで結合する。

【0103】

一態様では、特にCTLA4が役割を果たす腫瘍性疾患の治療に有用な活性化可能なマスクされたCTLA4結合タンパク質が本明細書に提供される。本明細書に提供される活性化可能なマスクされたCTLA4結合タンパク質は、細胞（例えば、癌細胞またはT細胞）の表面上に発現されるCTLA4タンパク質と相互作用（例えば、結合）することができる結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、マスキングペプチドが、CTLA4結合ドメインがCTLA4タンパク質に結合するのを妨げるように、切断可能なペプチドを含むリンカーによりマスキングペプチドに結合される。切断可能なペプチドの切断時に、マスキングペプチドが放出され、それによって結合ドメインがCTLA4タンパク質と相互作用することを可能にする。

【0104】

また、いくつかの実施形態では、(a) CTLA4結合タンパク質（例えば、第1の鎖および第2の鎖を含む抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）、および(b) マスキングペプチドを含む、マスクされたCTLA4結合タンパク質（例えば、マスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）も本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、CTLA4結合タンパク質は、第1の鎖および第2の鎖を含む抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片であり、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗体またはその抗原結合断片の第1の鎖もしくは第2の鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端に連結される。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、重鎖であるかもしくはそれを含み、第2の鎖は、軽鎖であるかもしくはそれを含み、または第1の鎖は、軽鎖であるかもしくはそれを含み、第2の鎖は、重鎖であるかもしくはそれを含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、重鎖可変領域であるかしくはそれを含み、第2の鎖は、軽鎖可変領域であるかしくはそれを含み、または第1の鎖は、軽鎖可変領域であるかしくはそれを含み、第2の鎖は、重鎖可変領域であるかしくはそれを含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、アミノ末端からカルボキシ末

端の方向に、スパーサーリンカー、切断可能なペプチド、およびスパーサーリンカーを含む。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのC末端は、切断可能なペプチドを含むリンカーのN末端に連結され、切断可能なペプチドを含むリンカーのC末端は、第1の鎖、例えば、軽鎖または軽鎖可変領域のN末端に連結される。

【0105】

CTLA4結合タンパク質

本明細書に提供される「CTLA4結合タンパク質」という用語は、CTLA4タンパク質に結合することができるか、またはそうでなければCTLA4タンパク質に対する親和性を呈することができるCTLA4結合ドメインを含むポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、CTLA4結合タンパク質は、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片、二重特異性抗体、抗原結合断片、一本鎖抗体などである。いくつかの実施形態では、CTLA4結合タンパク質は、CTLA4に結合する抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、CTLA4に結合する抗体またはその抗原結合断片は、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片である。したがって、いくつかの実施形態では、CTLA4結合タンパク質は、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、CTLA4結合タンパク質は、CTLA4に結合するキメラ抗原受容体の構成要素である。

【0106】

「CTLA4結合ドメイン」という用語は、細胞中または細胞上に見出されるCTLA4タンパク質に結合することができるか、またはそうでなければCTLA4タンパク質に対する親和性を呈することができる組換え発現ポリペプチドドメインを指す。CTLA4結合ドメインのCTLA4への結合の程度を決定する方法は、当該技術分野で周知である。

【0107】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはヒト抗体である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、抗体断片（抗原結合断片を含む）、例えば、dAb、Fab'-SH、Fv、scFv、または(Fab')₂断片である。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、二量体である。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、ホモ二量体である。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、ヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、重鎖および軽鎖を含むヘテロ二量体などの第1の鎖および第2の鎖を含むヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、第1の鎖および第2の鎖を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、重鎖であるかもしくはそれを含み、第2の鎖は、軽鎖であるかもしくはそれを含み、または第1の鎖は、軽鎖であるかもしくはそれを含み、第2の鎖は、重鎖であるかもしくはそれを含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、重鎖可変領域であるかもしくはそれを含み、第2の鎖は、軽鎖可変領域であるかしくはそれを含み、または第1の鎖は、軽鎖可変領域であるかしくはそれを含み、第2の鎖は、重鎖可変領域であるかしくはそれを含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、第1の鎖および第2の鎖（例えば、軽鎖および重鎖）を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、2つの第1の鎖および2つの第2の鎖（例えば、2つの軽鎖および2つの重鎖）を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i) 配列番号402もしくは408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403もしくは409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404もしくは410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または重鎖可変領域は、(i) 配列番号405もしくは411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406もしくは412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407もしくは413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。

10

20

30

40

50

10

20

30

50

び重鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、(i) 配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、重鎖可変領域は、(i) 配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。

【0112】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号232のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、かつ／または配列番号233のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号232のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、配列番号233のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号232のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号233のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号232のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および配列番号233のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0113】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号321のアミノ酸配列を含むVLドメイン内に含まれるCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、配列番号323のアミノ酸配列を含むVHドメイン内に含まれるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号322のアミノ酸配列を含むVLドメイン内に含まれるCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、配列番号324のアミノ酸配列を含むVHドメイン内に含まれるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む。

【0114】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号321もしくは322から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号323もしくは324から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号321のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸

配列を含む軽鎖可変領域を含み、かつ／または配列番号 3 2 3 のアミノ酸配列に対して 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の相同性を有するかまたは約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、もしくは約 100 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号 3 2 1 のアミノ酸配列に対して 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の相同性を有するかまたは約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、もしくは約 100 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、配列番号 3 2 3 のアミノ酸配列に対して 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の相同性を有するかまたは約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、もしくは約 100 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号 3 2 2 のアミノ酸配列に対して 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の相同性を有するかまたは約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、もしくは約 100 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、かつ／または配列番号 3 2 4 のアミノ酸配列に対して 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の相同性を有するかまたは約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、もしくは約 100 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号 3 2 2 のアミノ酸配列に対して 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の相同性を有するかまたは約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、もしくは約 100 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含み、配列番号 3 2 4 のアミノ酸配列に対して 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の相同性を有するかまたは約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、もしくは約 100 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号 3 2 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号 3 2 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0115】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 3 3 4 のアミノ酸配列に対して 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の相同性を有するかまたは約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、もしくは約 100 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、かつ／または配列番号 4 2 1 のアミノ酸配列に対して 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、90 %、91 %、92 %、

10

20

30

40

50

94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約90%、約91%、約92%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号334のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、配列番号421のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、90%、91%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約90%、約91%、約92%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、かつ／または配列番号421のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、配列番号421のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0116】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号237～318から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、および／または配列番号319もしくは320から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号327～341から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、ならびに／または配列番号366～380、421、および478から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号327、334、もしくは342～365から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、および／または配列番号366もしくは380～397から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプを有する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載されるエフェクター機能を強化するアミノ酸置換を含むIgG1アイソタイプを有する。

【0117】

いくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、二重特異性抗体の抗原結合アームの軽鎖および重鎖を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、(i) 配列番号402もしくは408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403もしくは409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404もしくは410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または重鎖は、(i) 配列番号405もしくは411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406もしくは412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407もしくは413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、(i) 配列番号402のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、重鎖は、(i) 配列番号405のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、(i) 配列番号432のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号433のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号434のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、重鎖は、(i) 配列番号435のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号436のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号437のアミノ酸配列を含むCDR-H

3を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、(i) 配列番号408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、重鎖は、(i) 配列番号411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、(i) 配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、重鎖は、(i) 配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。

10

【0118】

二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、配列番号321のアミノ酸配列を含むVLドメイン内に含まれるCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、重鎖は、配列番号323のアミノ酸配列を含むVHドメイン内に含まれるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、配列番号322のアミノ酸配列を含むVLドメイン内に含まれるCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、重鎖は、配列番号324のアミノ酸配列を含むVHドメイン内に含まれるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む。

【0119】

20

二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、配列番号232のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または重鎖は、配列番号233のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または重鎖は、配列番号321のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または重鎖は、配列番号323のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または重鎖は、配列番号322のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または重鎖は、配列番号324のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%

30

40

50

、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。

【0120】

二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、配列番号 232 のアミノ酸配列を含み、かつ／または重鎖は、配列番号 233 のアミノ酸配列を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、配列番号 321 もしくは 322 から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ／または重鎖は、配列番号 323 もしくは 324 から選択されるアミノ酸配列を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、配列番号 237～318 から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ／または重鎖は、配列番号 319 もしくは 320 から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0121】

二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、配列番号 327～341 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100%の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または重鎖は、配列番号 366～380、421、および 478 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100%の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、配列番号 327～341 から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ／または重鎖は、配列番号 366～380、421、および 478 から選択されるアミノ酸配列を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、配列番号 327、334、もしくは 342～365 から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ／または重鎖は、配列番号 366、380～397、421、および 478 から選択されるアミノ酸配列を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、配列番号 334 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100%の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または重鎖は、配列番号 421 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、90%、91%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100%の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 90%、約 91%、約 92%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、軽鎖は、配列番号 334 のアミノ酸配列を含み、重鎖は、配列番号 421 のアミノ酸配列を含む。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、CTLA4 は、ヒト CTLA4 である。二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、CTLA4 は、マウス CTLA4 である。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、マウス抗体である。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはヒト抗体である。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、または IgG4 アイソタイプを有する。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、本明細書に記載されるエフェクター機能を強化するアミノ酸置換を含む IgG1 アイソタイプを有する。

20

30

40

【0122】

いくつかの実施形態では、CTLA4 結合ドメインは、キメラ受容体で使用するためのリガンド結合ドメインの一部など、CTLA4 に結合する第 1 の鎖および第 2 の鎖を含む

50

。キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、軽鎖可変ドメインである。いくつかの実施形態では、第2の鎖は、重鎖可変ドメインである。キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、(i) 配列番号402もしくは408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403もしくは409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404もしくは410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または第2の鎖は、(i) 配列番号405もしくは411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406もしくは412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407もしくは413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、(i) 配列番号402のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、第2の鎖は、(i) 配列番号405のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、(i) 配列番号432のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号433のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号434のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、第2の鎖は、(i) 配列番号435のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号436のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号437のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、(i) 配列番号408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、第2の鎖は、(i) 配列番号411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、(i) 配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、第2の鎖は、(i) 配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。

【0123】

キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号321のアミノ酸配列を含むVLドメイン内に含まれるCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、第2の鎖は、配列番号323のアミノ酸配列を含むVHドメイン内に含まれるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む。キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号322のアミノ酸配列を含むVLドメイン内に含まれるCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含み、第2の鎖は、配列番号324のアミノ酸配列を含むVHドメイン内に含まれるCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む。

【0124】

キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号232のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または第2の鎖は、配列番号233のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約10

0%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号321のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または第2の鎖は、配列番号323のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号322のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または第2の鎖は、配列番号324のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号232のアミノ酸配列を含み、かつ／または第2の鎖は、配列番号233のアミノ酸配列を含む。キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号321もしくは322から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ／または第2の鎖は、配列番号323もしくは324から選択されるアミノ酸配列を含む。キメラ受容体のいくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号322のアミノ酸配列を含み、第2の鎖は、配列番号324のアミノ酸配列を含む。

【0125】

マスキングペプチド

本明細書に提供されるCTLA4結合ドメインマスキングペプチド（「マスキングペプチド」とも称される）は、CTLA4結合ドメインに結合することができるか、またはそうでなければCTLA4結合ドメインに対する親和性を呈することができるペプチドを指す。CTLA4結合ドメインに結合したとき、マスキングペプチドは、その同族受容体またはタンパク質（すなわち、CTLA4）に対するCTLA4結合ドメインの活性または結合を遮断、閉塞、阻害（例えば、減少する）するか、またはそうでなければ防ぐ（例えば、マスキングする）。CTLA4結合ドメインのCTLA4タンパク質への結合の程度を決定する方法は、当該技術分野で周知である。

【0126】

実施形態では、マスキングペプチドは、少なくとも4個のアミノ酸の長さを有する。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、線形ペプチドである。いくつかの実施形態では、線形ペプチドは、4mer～24merである。実施形態では、マスキングペプチドは、環状ペプチドである。実施形態では、環状ペプチドは、2つのシステイン間のアミノ酸数によって定義されるように、3mer～12merである。実施形態では、環状ペプチドは、3mer～20merである。マスキングペプチドが環化ペプチドである場合、環化ペプチドは、2つのシステインアミノ酸残基を結合するジスルフィド結合によって形成される。いくつかの実施形態では、システインアミノ酸残基は、末端システインである（すなわち、マスキングペプチドのN末端および／もしくはC末端またはその近くに位置する）。実施形態では、ジスルフィド結合は、N末端システインをC末端システインと結合させる。

【0127】

いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の軽鎖または重鎖のN末端に連結される。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の軽鎖可変領域または重鎖可変領域のN末端に連結される。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の軽鎖または重鎖のC末端に連結される。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の軽鎖可変領域または重鎖可変領域のC末端に連結される。

【0128】

いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の軽鎖または重鎖のN末端に連結される。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の軽鎖のN末端に連結される。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の軽鎖可変領域または重鎖可変領域のN末端に連結される。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の軽鎖可変領域のN末端に連結される。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の軽鎖または重鎖のC末端に連結される。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の軽鎖可変領域または重鎖可変領域のC末端に連結される。

【0129】

いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。したがって、実施形態では、マスキングペプチドは、

10

20

30

40

50

CNLIVEGHC (配列番号 1),
MQTRCKEYPRWCEHWL (配列番号 2), CKHAPYALC (配列番号 3), CPFPAKILC
(配列番号 4), CPGKGLPSC (配列番号 5), NWLGEWLPPGKV (配列番号 6),
QFIECPNFPRQCPGKN (配列番号 7), VRQQCSLNPGRCPYLV (配列番号 8),
VWQECHTAPQLCPGKI (配列番号 9), DSYTCRGPTWMCAGNM (配列番号 10),
FNHDCSGHWMRCLDQQ (配列番号 11), NKSPCRPKMVACYGIL (配列番号 12),
PTPQCWNQYYECWIPS (配列番号 13), SQKCPWTKETCMHYM (配列番号 14),
WHLSMYPKPPAE (配列番号 15), WHTDGFYTRLPA (配列番号 16), CIHAPYAKC
(配列番号 17), CPAKIGQEC (配列番号 18), CPFPALELC (配列番号 19),
CTKPAKALC (配列番号 20), DTATCYTTTGWCEGMV (配列番号 21),
NSDNCGPAKSTCMYND (配列番号 22), PPGKCTQPHRCPLN (配列番号 23),
DDPVCWDSNPTCQTIA (配列番号 24), ISDQCSVLFLSCNTRV (配列番号 25),
ACHFPHPGEC (配列番号 26), CLPPFPTKC (配列番号 27), CPDHVFPKC (配列番号
28), CWLPKPDMC (配列番号 29), CWSWPSKAC (配列番号 30), CYPFGKYE
(配列番号 31), ALTPAKWLPADD (配列番号 32), DDKECDWMHFACTGPQ (配列
番号 33), DEMKCAWSLEMCVRTS (配列番号 34), DPILCPNTRMSCDNQT (配列
番号 35), GNALYDSPGTML (配列番号 36), KNYECREVMPPCEPNT (配列番号
37), NSYTSPYWLPDS (配列番号 38), SLTPPYWIPREW (配列番号 39),
SPLTPHDRPSFL (配列番号 40), TADVFSSTRYTR (配列番号 41),
TDLQCPPSSPICQIEH (配列番号 42), TKCHCDGNCVMCYQMQ (配列番号 43),
TLAYETPLLWLP (配列番号 44), TNWHCNNDGSSCNVRA (配列番号 45), または
CNLIVQGHC (配列番号 46)

の amino 酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100% の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100% の相同性を有する amino 酸配列を含む。

【0130】

いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、配列番号 1～46 から選択される amino 酸配列に対して約 90% の相同性を有する amino 酸配列を含む。例えば、マスキングペプチドは、配列番号 1 の amino 酸配列に対して約 90% の相同性を有する amino 酸配列を含む。

【0131】

いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、配列番号 1～46 から選択される amino 酸配列に対して約 80% の相同性を有する amino 酸配列を含む。例えば、マスキング

ペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して約 80 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む。

【0132】

いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、配列番号 1 ~ 46 から選択されるアミノ酸配列に対して約 70 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む。例えば、マスキングペプチドは、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して約 70 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む。

【0133】

いくつかの実施形態では、マスキングペプチドアミノ酸配列は、配列番号 1 ~ 46 から選択されるアミノ酸配列である。例えば、マスキングペプチドアミノ酸配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列である。

【0134】

いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の相同性を有するかまたは約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、もしくは約 100 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む。

【0135】

いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、配列番号 19 のアミノ酸配列に対して 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の相同性を有するかまたは約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約 96 %、約 97 %、約 98 %、約 99 %、もしくは約 100 % の相同性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む。

【0136】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つのアミノ酸であるが 20 以下のアミノ酸は、マスキングペプチドの N 末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つのアミノ酸であるが 30 以下のアミノ酸は、マスキングペプチドの N 末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つのアミノ酸であるが 40 以下のアミノ酸は、マスキングペプチドの N 末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つのアミノ酸であるが 50 以下のアミノ酸は、マスキングペプチドの N 末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドの N 末端に直接連結された少なくとも 1 つのアミノ酸は、アラニン (A) またはグリシン-アラニン (GA) である。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドの N 末端に直接連結された少なくとも 1 つのアミノ酸は、検出可能なタグである。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドの N 末端に直接連結された少なくとも 1 つのアミノ酸は、

YPYDVDPDYA (配列番号 398),

DYKDDDDK (配列番号 399), EQKLISEEDL (配列番号 400), または

GLNDIFEAQKIEWHE (配列番号 401)

である。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つのアミノ酸であるが 50 以下のアミノ酸は、配列番号 1 ~ 46 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の相同性を有するかまたは約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 91 %、約 92 %、約 93 %、約 94 %、約 95 %、約

96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含むマスキングペプチドのN末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが50以下のアミノ酸は、配列番号1～46からなる群から選択されるマスキングペプチドのN末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが50以下のアミノ酸は、配列番号1～46からなる群から選択されるマスキングペプチドのN末端に直接連結され、少なくとも1つのアミノ酸は、アラニン（A）またはグリシン-アラニン（GA）である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが50以下のアミノ酸は、配列番号1～46からなる群から選択されるマスキングペプチドのN末端に直接連結され、少なくとも1つのアミノ酸は、アラニン（A）である。

【0137】

リンカー

いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、リンカー、例えば、スペーサーリンカーを含む。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、リンカー、例えば、第1のスペーサーリンカーおよび第2のスペーサーリンカーを含む。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、切断可能なペプチドを含むリンカーを含む。本明細書で使用される場合、「切断可能なペプチドを含むリンカー」は、CTLA4結合ドメインに共有結合され、かつマスキングペプチドに共有結合される酵素的に切断可能なリンカーを指す。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、組換え発現される。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、例えば、複合体化学を使用して、リンカーに結合された官能性（反応性）基をマスキングペプチドと反応させることによって形成されるリンカーである。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、例えば、複合体化学を使用して、リンカーに結合された官能性（反応性）基をCTLA4結合ドメインと反応させることによって形成されるリンカーである。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、マスキングペプチドをCTLA4結合ドメインのN末端（例えば、軽鎖のN末端）に結合する。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、マスキングペプチドをCTLA4結合ドメインのC末端（例えば、軽鎖のC末端）に結合する。

【0138】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、核酸がリンカーおよびマスキングペプチドをコードする時などにマスキングペプチドと融合され、リンカーおよびマスキングペプチドをコードするアミノ酸配列として細胞から発現される。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、核酸がリンカーおよびCTLA4結合ドメインをコードする時などにCTLA4結合ドメインと融合され、リンカーおよびCTLA4結合ドメインをコードするアミノ酸配列として細胞から発現される。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、マスキングペプチドをCTLA4結合ドメインのN末端（例えば、軽鎖のN末端）に結合する。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、マスキングペプチドをCTLA4結合ドメインのC末端（例えば、軽鎖のC末端）に結合する。

【0139】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、1つ以上のグリシン残基、セリン残基、アラニン残基、ヒスチジン残基、および／またはプロリン残基を含む可撓性リンカーである。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、切断可能なペプチドのN末端および／またはC末端に直接連結したスペーサーリンカーを含む。いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、1つ以上のグリシン残基、セリン残基、アラニン残基、ヒスチジン残基、および／またはプロリン残基を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、スペーサーリンカーおよび切断可能なペプチドを含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、第1のスペーサーリンカー、切断可能なペプチド、および第2のスペーサーリンカー

を含む。したがって、いくつかの実施形態では、マスクされた C T L A 4 結合タンパク質（例えば、マスクされた抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片）は、切断可能なペプチドの N 末端に連結されたスペーサーリンカー（例えば、第 1 のスペーサーリンカー、またはスペーサーリンカー 1）と、切断可能なペプチドの C 末端に連結されたスペーサーリンカー（例えば、第 2 のスペーサーリンカー、またはスペーサーリンカー 2）とを含む切断可能なペプチドを含むリンカーを含み、各スペーサーリンカーは、配列番号 89～112 および 415～420 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーの C 末端は、抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片の軽鎖または軽鎖可変ドメインに連結され、切断可能なペプチドを含むリンカーの N 末端は、マスキングペプチドに連結される。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーの C 末端は、抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片の重鎖または重鎖可変ドメインに連結され、切断可能なペプチドを含むリンカーの N 末端は、マスキングペプチドに連結される。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーの N 末端は、抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片の軽鎖または軽鎖可変ドメインに連結され、切断可能なペプチドを含むリンカーの C 末端は、マスキングペプチドに連結される。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーの N 末端は、抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片の重鎖または重鎖可変ドメインに連結され、切断可能なペプチドを含むリンカーの C 末端は、マスキングペプチドに連結される。

【0140】

いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、配列番号 89～112 および 415～420 から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、切断可能なペプチドの N 末端に直接連結され、配列番号 89～100 から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、切断可能なペプチドの C 末端に直接連結され、配列番号 101～112 および 415～420 から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるマスキングペプチドは、スペーサーリンカーの N 末端に直接連結される。したがって、いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、N 末端から C 末端の方向に、1) スペーサーリンカー（例えば、配列番号 89～112 および 415～420 のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含むスペーサーリンカー）、2) 本明細書に記載されるものなどの切断可能なペプチド（例えば、配列番号 47～88、464～469、および 479～508 のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む切断可能なペプチド）、および 3) スペーサーリンカー（例えば、配列番号 89～112 および 415～420 のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含むスペーサーリンカー）を含む。

【0141】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、N 末端から C 末端の方向に、1) 配列番号 89～112 および 415～420 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むスペーサーリンカー、2) 配列番号 47～88、464～469、および 479～508 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む切断可能なペプチド、ならびに 3) 配列番号 89～112 および 415～420 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むスペーサーリンカーを含む。

【0142】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、N 末端から C 末端の方向に、1) 配列番号 420 のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカー、2) 配列番号 50 のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチド、および 3) 配列番号 102 のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカーを含む。

【0143】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、N 末端から C 末端の方向に、1) 配列番号 96 のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカー、2) 配列番号 86 のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチド、および 3) 配列番号 102 のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカーを含む。

【0144】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、N末端からC末端の方向に、1) 配列番号415のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカー、2) 配列番号86のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチド、および3) 配列番号102のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカーを含む。

【0145】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、N末端からC末端の方向に、1) 配列番号416のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカー、2) 配列番号47のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチド、および3) 配列番号102のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカーを含む。

【0146】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、N末端からC末端の方向に、1) 配列番号417のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカー、2) 配列番号57のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチド、および3) 配列番号102のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカーを含む。

【0147】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、N末端からC末端の方向に、1) 配列番号418のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカー、2) 配列番号48のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチド、および3) 配列番号102のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカーを含む。

【0148】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、N末端からC末端の方向に、1) 配列番号417のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカー、2) 配列番号72のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチド、および3) 配列番号102のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカーを含む。

【0149】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、N末端からC末端の方向に、1) 配列番号418のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカー、2) 配列番号51のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチド、および3) 配列番号102のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカーを含む。

【0150】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、N末端からC末端の方向に、1) 配列番号419のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカー、2) 配列番号54のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチド、および3) 配列番号102のアミノ酸配列を含むスペーサーリンカーを含む。

【0151】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、配列番号454～462からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、配列番号454～462からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、配列番号454のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含むリンカーは、配列番号455のアミノ酸配列を含む。

【0152】

リンカーは、当該技術分野で周知の様々な方法によって、マスキングペプチドおよび／またはCTL A4結合タンパク質と複合体化され得る。「複合体」および「複合体化学」という用語は、比較的軽度の条件下で進行する既知の反応性基との反応を指す。これらに

10

20

30

40

50

は、求核置換（例えば、アミンおよびアルコールの、ハロゲン化アシル、活性エステルとの反応）、求電子置換（例えば、エナミン反応）、ならびに炭素-炭素および炭素-ヘテロ原子多重結合（例えば、マイケル反応、ディールス・アルダー付加）への付加が含まれるが、これらに限定されない。これらの反応および他の有用な反応は、例えば、March, *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985、Hermanson, *Biocoujugate Techniques*, Academic Press, San Diego, 1996、および Feeney et al., *Modification of Proteins; Advances in Chemistry Series*, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D. C., 1982で議論されている。

10

【0153】

本明細書の複合体化学に使用される有用な反応性官能性基には、例えば、(a) これらに限定されないが、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、N-ヒドロキシベンズトリアゾールエステル、酸ハロゲン化物、アシルイミダゾール、チオエステル、p-ニトロフェニルエステル、アルキル、アルケニル、アルキニル、および芳香族エステルを含むカルボキシル基およびその様々な誘導体、(b) エステル、エーテル、アルデヒドなどに変換され得るヒドロキシル基、(c) ハロアルキル基であって、ハロゲン化物が後に、アミン、カルボキシレートアニオン、チオールアニオン、カルバニオン、またはアルコキシドイオンなどの求核基で置き換えられ得、それによりハロゲン原子の部位における新しい基の共有結合をもたらす、ハロアルキル基、(d) 例えば、マレイミド基などの、ディールス・アルダー反応に関与することができるジエノフィル基、(e) グリニャール付加またはアルキルリチウム付加などの機構を介して、例えば、イミン、ヒドラゾン、セミカルバゾン、またはオキシムなどのカルボニル誘導体の形成を介してその後の誘導体化が可能になるようなアルデヒド基またはケトン基、(f) 例えば、スルホンアミドを形成する、アミンとのその後の反応のためのスルホニルハロゲン基、(g) ジスルフィドに変換することができ、ハロゲン化アシルと反応することができ、または金などの金属に結合され得る、チオール基、(h) 例えば、アシル化、アルキル化、または酸化され得る、アミン基またはスルフヒドリル基、(i) 例えば、環状付加、アシル化、マイケル追加などの経ることができる、アルケン、(j) 例えば、アミンおよびヒドロキシル化合物と反応し得る、エポキシド、(k) 核酸合成に有用なホスホロアミダイトおよび他の標準的な官能性基、(l) 金属酸化ケイ素結合、ならびに (m) 例えば、リン酸ジエステル結合を形成する反応性リン基（例えば、ホスフィン）への金属結合が含まれる。

20

30

【0154】

反応性官能性基は、本明細書に記載される組成物の化学的安定性に関与しないか、または干渉しないように選択することができる。あるいは、反応性官能性基は、保護基の存在によって架橋反応に関与することから保護され得る。

【0155】

いくつかの実施形態では、リンカーは、当該技術分野で周知の様々な方法によって、マスキングペプチドおよび／またはCTLA4結合タンパク質に融合されるように操作され得る。例えば、核酸は、宿主細胞から組換え発現されたときに融合タンパク質を生成するために、マスキングペプチドおよび／またはCTLA4結合タンパク質を含むリンカーをコードするように操作され得る。

40

【0156】

切断可能なペプチド

本明細書に提供されるマスクされたCTLA4結合タンパク質（例えば、マスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）は、いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドを含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカー内に含まれる。本明細書に提供される切断可能なペプチドを含むリンカーは、切断可能なペプチド内にプロテアーゼ切断部位を含み得る。本明細書で使用される場合

50

、「切断部位」は、本明細書に記載されるＣＴＬＡ４結合タンパク質中に見出されるリンカー（例えば、上述の切断可能なペプチドを含むリンカー）の一部の切断のための認識可能な部位を指す。したがって、切断部位は、その実施形態を含む、本明細書に記載される切断可能なペプチドの配列に見出され得る。いくつかの実施形態では、切断部位は、切断剤によって認識され、切断されるアミノ酸配列である。例示的な切断剤としては、タンパク質、酵素、ＤＮＡザイム、ＲＮＡザイム、金属、酸、および塩基が挙げられる。切断可能なペプチドは、プロテアーゼ切断部位を含む任意のペプチドであり得る。例示的な切断可能なペプチドを表１に示す。

【０１５７】

（表１）代表的な切断可能なペプチド

例示的な切断可能なペプチド		
MPYDLYHP (配列番号 47)	RAAAVKSP (配列番号 72)	IYDQKT (配列番号 481)
GGIGQLTA (配列番号 48)	DLLAVVAAS (配列番号 73)	AHNYKT (配列番号 482)
DLGRFQTF (配列番号 49)	VQTVTWPD (配列番号 74)	MMDQAN (配列番号 483)
DSGGFMLT (配列番号 50)	AIPMSIPP (配列番号 75)	MLGEFVSE (配列番号 484)
TSVLMAAP (配列番号 51)	GYEVHHQK (配列番号 76)	GLVALRGA (配列番号 485)
TSEFVFAPDQ (配列番号 52)	VHHQKLVF (配列番号 77)	KEHKYKAE (配列番号 486)
KLVLVPVLP (配列番号 53)	IRRVSYSF (配列番号 78)	LAQAVRSS (配列番号 487)
KPILFFRL (配列番号 54)	MPYDLYHPILFFRL (配列番号 79)	LGGSGRSNAQVRLE (配列番号 488)
ANQLKG (配列番号 55)	GGIGQLTSVLMAAP (配列番号 80)	LGGSGRKASLSLE (配列番号 489)
QSQLKE (配列番号 56)	DSGGFMLTLVLVPVLP (配列番号 81)	SGRIGFLRTA (配列番号 490)
HEQLTV (配列番号 57)	TSEFVFAPDLGRFQTF (配列番号 82)	SGAIGFLRTA (配列番号 491)
PANLVAPDP (配列番号 58)	TSTSGRSANPR (配列番号 83)	RPARSGRSAGGSVA (配列番号 492)
PAPGVYPGP (配列番号 59)	TSTSGRSANPG (配列番号 84)	VTGRGDSPASS (配列番号 493)
APAGLIVPYN (配列番号 60)	TSTSGRSANPH (配列番号 85)	PRFKIIGG (配列番号 494)
PQALVA (配列番号 61)	VPLSLY (配列番号 86)	LSGRIGFLRTA (配列番号 495)
VGNLNF (配列番号 62)	TSASGASASAA (配列番号 87)	LSGRSNAGGIGQLTA (配列番号 496)
VANLLYE (配列番号 63)	PSSPGGGSSP (配列番号 88)	LSGRSNAVPLSLY (配列番号 497)
VYNLMD (配列番号 64)	ISSGLLSGRSDNH (配列番号 464)	LSGRSNADSGGFMLT (配列番号 498)
TFNIQK (配列番号 65)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (配列番号 465)	LSGRSNAHEQLTA (配列番号 499)
DLWKLLP (配列番号 66)	VPLSLYSG (配列番号 466)	LSGRSNARAAVKSP (配列番号 500)
PGSTKRA (配列番号 67)	RQARVVG (配列番号 467)	LSGRSNATSVLMAAP (配列番号 501)
QQYRALKS (配列番号 68)	LSGRSNAMPYDLYHP (配列番号 468)	VPLSLYLSGRSNA (配列番号 502)
YVPRAVL (配列番号 69)	MPYDLYHPRQARVVG (配列番号 469)	DSGGFMLTLSGRSNA (配列番号 503)
GVNKWPT (配列番号 70)	IPESLRAG (配列番号 479)	GGIGQLTALSGRSNA (配列番号 504)
LAQAVRSS (配列番号 71)	IPVSLRSG (配列番号 480)	MPYDLYHPLSGRSNA (配列番号 505)
		HEQLTVLSGRSNA (配列番号 506)
		RAAAVKSPLSGRSNA (配列番号 507)
		TSVLMAAPLSGRSNA (配列番号 508)

10

20

30

40

50

【0158】

したがって、いくつかの実施形態では、切断可能ペプチドは、配列番号47～88、464～469、および479～508からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号50のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号86のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号47のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号57のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号48のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号72のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号51のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号54のアミノ酸配列を含む。

10

【0159】

いくつかの実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、腫瘍関連プロテアーゼ切断部位である。本明細書に提供される「腫瘍関連プロテアーゼ切断部位」は、プロテアーゼによって認識されるアミノ酸配列であり、その発現は、腫瘍細胞またはその腫瘍細胞環境に対して特異的である。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、ABHD12、ADAM12、ABHD12B、ABHD13、ABHD17A、ADAM19、ADAM20、ADAM21、ADAM28、ADAM30、ADAM33、ADAM8、ABHD17A、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS10、ADAMTS12、ADAMTS13、ADAMTS14、ADAMTS15、ADAMTS16、ADAMTS17、ADAMTS18、ADAMTS19、ADAMTS2、ADAMTS20、ADAMTS3、ADAMTS4、ABHD17B、ADAMTS5、ADAMTS6、ADAMTS7、ADAMTS8、ADAMTS9、ADAMTSL1、ADAMTSL2、ADAMTSL3、ABHD17C、ADAMTSL5、ASTL、BMP1、CELA1、CELA2A、CELA2B、CELA3A、CELA3B、ADAM10、ADAM15、ADAM17、ADAM9、ADAMTS4、CTSE、CTSF、ADAMTSL4、CMA1、CTRB1、CTRC、CTSO、CTRL、CTSA、CTSW、CTSB、CTSC、CTSD、ESP1、CTSG、CTSH、GZMA、GZMB、GZMH、CTSK、GZMM、CTSL、CTSS、CTSV、CTSZ、HTRA4、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、KLK2、KLK4、DPP4、KLK6、KLK7、KLKB1、ECE1、ECE2、ECE1、MASP2、MEP1A、MEP1B、ELANE、FAP、GZMA、MMP11、GZMK、HGFAC、HPN、HTRA1、MMP11、MMP16、MMP17、MMP19、HTRA2、MMP20、MMP21、HTRA3、HTRA4、KEL、MMP23B、MMP24、MMP25、MMP26、MMP27、MMP28、KLK5、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、LGMN、LNPEP、MASP1、PAPPA、PAPPA2、PCSK1、NAPSA、PCSK5、PCSK6、MME、MMP1、MMP10、PLAT、PLAU、PLG、PRSS1、PRSS12、PRSS2、PRSS21、PRSS3、PRSS33、PRSS4、PRSS55、PRSS57、MMP12、PRSS8、PRSS9、PRTN3、MMP13、MMP14、ST14、TMPRSS10、TMPRSS11A、TMPRSS11D、TMPRSS11E、TMPRSS11F、TMPRSS12、TMPRSS13、MMP15、TMPRSS15、MMP2、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、TMPRSS5、TMPRSS6、TMPRSS7、TMPRSS9、NRDC、OVCH1、PAMR1、PCSK3、PHEX、TINAG、TPSAB1、TPSD1、およびTPSG1からなる群から選択される1つ以上の酵素によって認識される切断部位である。いくつかの実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、ADAM17、HTRA1、PRSS1、FAP、GZMK、NAPSA、MMP1、MMP2、MMP9、MMP10、MMP7、MMP12、MMP28、ADAMTS9、HGFAC、およびHTRA3からなる群から選択される1つ以上の酵素によって認識される切断部位である。

20

30

40

50

【0160】

実施形態では、プロテアーゼ切断部位は、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）切断部位、ジインテグリンおよびメタロプロテアーゼドメイン含有（ADAM）メタロプロテアーゼ切断部位、前立腺特異的抗原（PSA）プロテアーゼ切断部位、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター（uPA）プロテアーゼ切断部位、膜型セリンプロテアーゼ1（MTSP1）プロテアーゼ切断部位、マトリプターゼプロテアーゼ切断部位（ST14）、またはレグマインプロテアーゼ切断部位である。実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）切断部位は、MMP9切断部位、MMP13切断部位、またはMMP2切断部位である。実施形態では、ジインテグリンおよびメタロプロテアーゼドメイン含有（ADAM）メタロプロテアーゼ切断部位は、ADAM9メタロプロテアーゼ切断部位、ADAM10メタロプロテアーゼ切断部位、またはADAM17メタロプロテアーゼ切断部位である。プロテアーゼ切断部位は、特定のアミノ酸配列によって指定されてもよい。

10

【0161】

いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、ABHD12、ADAM12、ABHD12B、ABHD13、ABHD17A、ADAM19、ADAM20、ADAM21、ADAM28、ADAM30、ADAM33、ADAM8、ABHD17A、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS10、ADAMTS12、ADAMTS13、ADAMTS14、ADAMTS15、ADAMTS16、ADAMTS17、ADAMTS18、ADAMTS19、ADAMTS2、ADAMTS20、ADAMTS3、ADAMTS4、ABHD17B、ADAMTS5、ADAMTS6、ADAMTS7、ADAMTS8、ADAMTS9、ADAMTSL1、ADAMTSL2、ADAMTSL3、ABHD17C、ADAMTSL5、ASTL、BMP1、CELA1、CELA2A、CELA2B、CELA3A、CELA3B、ADAM10、ADAM15、ADAM17、ADAM9、ADAMTS4、CTSE、CTS F、ADAMTSL4、CMA1、CTRB1、CTRC、CTSO、CTRL、CTSA、CTSW、CTSB、CTSC、CTSD、ESP1、CTSG、CTSH、GZMA、GZMB、GZMH、CTSK、GZMM、CTSL、CTSS、CTSV、CTS Z、HTRA4、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、KLK2、KLK4、DPP4、KLK6、KLK7、KLKB1、ECE1、ECE2、ECEL1、MASP2、MEP1A、MEP1B、ELANE、FAP、GZMA、MMP11、GZMK、HGFAC、HPN、HTRA1、MMP11、MMP16、MMP17、MMP19、HTRA2、MMP20、MMP21、HTRA3、HTRA4、KEL、MMP23B、MMP24、MMP25、MMP26、MMP27、MMP28、KLK5、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、LGMN、LNPEP、MASP1、PAPPA、PAPPA2、PCSK1、NAPSA、PCSK5、PCSK6、MME、MMP1、MMP10、PLAT、PLAU、PLG、PRSS1、PRSS12、PRSS2、PRSS21、PRSS3、PRSS33、PRSS4、PRSS55、PRSS57、MMP12、PRSS8、PRSS9、PRTN3、MMP13、MMP14、ST14、TMPRSS10、TMPRSS11A、TMPRSS11D、TMPRSS11E、TMPRSS11F、TMPRSS12、TMPRSS13、MMP15、TMPRSS15、MMP2、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、TMPRSS5、TMPRSS6、TMPRSS7、TMPRSS9、NRDC、OVCH1、PAMR1、PCSK3、PHEX、TINAG、TPSAB1、TPSD1、およびTPSG1からなる群から選択される1つ以上の酵素によって切断される。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、ADAM17、HTRA1、PRSS1、FAP、GZMK、NAPSA、MMP1、MMP2、MMP9、MMP10、MMP7、MMP12、MMP28、ADAMTS9、HGFAC、およびHTRA3からなる群から選択される1つ以上の酵素によって切断される。

20

30

40

【0162】

50

実施形態では、切断可能なペプチドは、5mer（すなわち、5アミノ酸長のペプチド）、6mer（すなわち、6アミノ酸長のペプチド）、7mer（すなわち、7アミノ酸長のペプチド）、8mer（すなわち、8アミノ酸長のペプチド）、9mer（すなわち、9アミノ酸長のペプチド）、10mer（すなわち、10アミノ酸長のペプチド）、11mer（すなわち、11アミノ酸長のペプチド）、12mer（すなわち、12アミノ酸長のペプチド）、または13mer（すなわち、13アミノ酸長のペプチド）である。

【0163】

したがって、いくつかの実施形態では、マスキングペプチドと切断可能なペプチドを含むリンカーは、N末端からC末端の方向に、1）マスキングペプチド（例えば、配列番号1～46のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチド）、2）
10
スパーサーリンカー（例えば、配列番号89～112および415～420のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含むスパーサーリンカー）、3）本明細書に記載されるものなどの切断可能なペプチド（例えば、配列番号47～88、464～469、および479～508のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む切断可能なペプチド）、
20
および4）スパーサーリンカー（例えば、配列番号89～112および415～420のアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含むスパーサーリンカー）を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが20以下のアミノ酸は、マスキングペプチドのN末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが30以下のアミノ酸は、マスキングペプチドのN末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが40以下のアミノ酸は、マスキングペプチドのN末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが50以下のアミノ酸は、マスキングペプチドのN末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、アラニン（A）またはグリシン-アラニン（GA）である。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、検出可能なタグである。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、
YPYDVDPDYA（配列番号398）、DYKDDDDK（配列番号399）、

EQKLISEEDL（配列番号400）、またはGLNDIFEAQKIEWHE（配列番号:401）

である。

【0164】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、マスキングペプチド、スパーサーリンカー、および切断可能なペプチドを含むペプチドを含み、ペプチドは、配列番号113～231から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、マスキングペプチド、スパーサーリンカー、および切断可能なペプチドを含むペプチドを含み、ペプチドは、配列番号113～193から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、マスキングペプチド、スパーサーリンカー、および切断可能なペプチドを含むペプチドを含み、ペプチドは、配列番号194～206から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、マスキングペプチド、スパーサーリンカー、および切断可能なペプチドを含むペプチドを含み、ペプチドは、配列番号207～231から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0165】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、マスキングペプチド、第1のスパーサーリンカー、切断可能なペプチド、および第2のスパーサーリンカーを含むペプチドを含み、ペプチドは、配列番号1

13～231、444、446～448、および450～453からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、マスキングペプチド、第1のスペーサーリンカー、切断可能なペプチド、および第2のスペーサーリンカーを含むペプチドを含み、ペプチドは、配列番号113～231、444、446～448、および450～453からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、マスキングペプチド、第1のスペーサーリンカー、切断可能なペプチド、および第2のスペーサーリンカーを含むペプチドを含み、ペプチドは、配列番号444、446～448、および450～453からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、マスキングペプチド、第1のスペーサーリンカー、切断可能なペプチド、および第2のスペーサーリンカーを含むペプチドを含み、ペプチドは、配列番号444、446～448、および450～453からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0166】

例示的なマスクされたCTLA4結合タンパク質

上述のある特定の特征を含むマスクされたCTLA4結合タンパク質のある特定の例示的な実施形態を以下に記載する。これらの実施形態は、単に例示的であり、限定するものであると解釈されるべきではない。

【0167】

いくつかの実施形態では、a) 抗体またはその抗原結合断片が第1の鎖および第2の鎖を含む、CTLA4 (例えば、ヒトCTLA4) に結合する抗体またはその抗原結合断片、およびb) マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗体またはその抗原結合断片の第1の鎖または第2の鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端に連結される、配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドを含む、マスクされた抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、CTLA4に結合する抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載される任意の抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、2つの第1の鎖および2つの第2の鎖を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は軽鎖であり、第2の鎖は重鎖である。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、軽鎖可変ドメインであり、第2の鎖は、重鎖可変ドメインである。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号47～88、464～469、および479～508から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、切断可能なペプチドのN末端および／またはC末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、配列番号89～112および415～420から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが20、30、40、または50以下のアミノ酸は、マスキングペプチドのN末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸は、アラニン (A) またはグリシン-アラニン (GA) である。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、検出可能なタグである。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、

YPYDVDPDYA (配列番号

398), DYKDDDDK (配列番号 399), EQKLISEEDL (配列番号 400), または

GLNDIFEAQKIEWHE (配列番号 401)

である。

【0168】

いくつかの実施形態では、a) 抗体またはその抗原結合断片が第1の鎖および第2の鎖を含む、CTLA4 (例えば、ヒトCTLA4) に結合する抗体またはその抗原結合断片、およびb) マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗体またはその抗原結合断片の第1の鎖および第2の鎖のアミノ末端に連結される、配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドを含む、マスクされた抗体もまた本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、CTLA4に結合する抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載される任意の抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、2つの第1の鎖および2つの第2の鎖を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は軽鎖であり、第2の鎖は重鎖である。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、軽鎖可変ドメインであり、第2の鎖は、重鎖可変ドメインである。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号47～88、464～469、および479～508から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、切断可能ペプチドのN末端および／またはC末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、配列番号89～112および415～420から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが20、30、40、または50以下のアミノ酸は、マスキングペプチドのN末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸は、アラニン (A) またはグリシン-アラニン (GA) である。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、検出可能なタグである。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、

YPYDVDPDYA (配列番号

398), DYKDDDDK (配列番号 399), EQKLISEEDL (配列番号 400), または

GLNDIFEAQKIEWHE (配列番号 401)

である。

【0169】

いくつかの実施形態では、a) 抗体またはその抗原結合断片が第1の鎖および第2の鎖を含む、CTLA4 (例えば、ヒトCTLA4) に結合する抗体またはその抗原結合断片、およびb) マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗体またはその抗原結合断片の第1の鎖および第2の鎖のカルボキシ末端に連結される、配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドを含む、マスクされた抗体が本明細書にさらに提供される。いくつかの実施形態では、CTLA4に結合する抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載される任意の抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、2つの第1の鎖および2つの第2の鎖を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は軽鎖であり、第2の鎖は重鎖である。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、軽鎖可変ドメインであり、第2の鎖は、重鎖可変ドメインである。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号47～88、464～469、および479～508から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、切断可能ペプチドのN末端および／またはC末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、配列番号89～112および415～420から選択されるアミノ酸配列を

含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが20、30、40、または50以下のアミノ酸は、マスキングペプチドのN末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸は、アラニン（A）またはグリシン-アラニン（GA）である。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、検出可能なタグである。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、

YPYDVDPDYA (配列番号

398), DYKDDDDK (配列番号399), EQKLISEEDL (配列番号400),または

GLNDIFEAQKIEWHE (配列番号401)

10

である。

【0170】

いくつかの実施形態では、a) CTLA4（例えば、ヒトCTLA4）に結合する抗体またはその抗原結合断片、およびb) 配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドを含むマスキングペプチドが本明細書にさらに提供され、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗体の第1の鎖のC末端またはN末端に連結され、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗体の第2の鎖のC末端またはN末端に連結される。いくつかの実施形態では、CTLA4に結合する抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載される任意の抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、a) 抗体の第1の鎖は軽鎖であり、抗体の第2の鎖は軽鎖であり、b) 抗体の第1の鎖は重鎖であり、抗体の第2の鎖は重鎖であり、またはc) 抗体の第1の鎖は軽鎖であり、抗体の第2の鎖は重鎖である。したがって、いくつかの実施形態では、単離された抗体は、2つの軽鎖の各々のC末端および／またはN末端、ならびに2つの重鎖の各々のC末端および／またはN末端上にマスキングペプチドを含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号47～88、464～469、および479～508から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、スパーサーリンカーは、切断可能ペプチドのN末端および／またはC末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、スパーサーリンカーは、配列番号89～112および415～420から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが20、30、40、または50以下のアミノ酸は、マスキングペプチドのN末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸は、アラニン（A）またはグリシン-アラニン（GA）である。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、検出可能なタグである。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、

YPYDVDPDYA (配列番号398), DYKDDDDK (配列番号399),

EQKLISEEDL (配列番号400),またはGLNDIFEAQKIEWHE (配列番号401)

20

30

40

である。

【0171】

いくつかの実施形態では、a) 配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域と、配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域とを含む抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片、b) 配列番号1～46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチド、ならびにc) 配列番号47～88、464～469、および479～5

50

08からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む切断可能なペプチドを含む、マスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片もまた本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号50のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号86のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが20、30、40、または50以下のアミノ酸は、マスキングペプチドのN末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸は、アラニン（A）またはグリシン-アラニン（GA）である。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、検出可能なタグである。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、

10

YPYDVDPDYA (配列番号398), DYKDDDDK (配列番号399),

EQKLISEEDL (配列番号400), または GLNDIFEAQKIEWHE (配列番号401)

である。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドに連結され、切断可能なペプチドは、軽鎖可変領域または重鎖可変領域に連結される。いくつかの実施形態では、マスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、マスキングペプチドを切断可能なペプチドに連結する配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むスパーサーリンカーをさらに含み、切断可能なペプチドを軽鎖可変領域または重鎖可変領域に連結する配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むスパーサーリンカーをさらに含む。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドを切断可能なペプチドに連結するスパーサーリンカーは、配列番号420のアミノ酸配列を含み、切断可能なペプチドを軽鎖可変領域または重鎖可変領域に連結するスパーサーリンカーは、配列番号102のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドを切断可能なペプチドに連結するスパーサーリンカーは、配列番号96のアミノ酸配列を含み、切断可能なペプチドを軽鎖可変領域または重鎖可変領域に連結するスパーサーリンカーは、配列番号102のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号322のアミノ酸配列を含み、重鎖可変領域は、配列番号324のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、配列番号421のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号113～231および444～453からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドとを含む。いくつかの実施形態では、マスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、配列番号421のアミノ酸配列を含み、配列番号358および422～431からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

30

【0172】

一態様では、配列番号232のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号233のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。さらなる態様では、配列番号237～318から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、および／または配列番号319もしくは320から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。

40

【0173】

一態様では、配列番号321もしくは322から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号323もしくは324から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、配列番号322のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号324のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、マスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。さらなる態様では、配列番号327～341から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を

50

含み、かつ／または配列番号366～380、421、および478から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。また別のさらなる態様では、配列番号327、334、もしくは342～365から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、かつ／または配列番号366もしくは380～397から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号421のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、マスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、配列番号327のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号478のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、マスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。

10

【0174】

いくつかの実施形態では、配列番号233のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、配列番号323または324から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列に対して置換、挿入、または欠失を含むが、そのアミノ酸配列を含む抗体は、CTLA4（例えば、ヒトCTLA4）に結合する能力を保持する。いくつかの実施形態では、置換、挿入、または欠失（例えば、1、2、3、4、または5個のアミノ酸）は、HVRの外側の領域（すなわち、FR内）で発生する。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、配列番号233のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、配列番号323または324から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

20

30

【0175】

いくつかの実施形態では、配列番号232のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、配列番号321または322から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列に対して置換、挿入、または欠失を含むが、そのアミノ酸配列を含む抗体は、CTLA4（例えば、ヒトCTLA4）に結合する能力を保持する。いくつかの実施形態では、置換、挿入、または欠失（例えば、1、2、3、4、または5個のアミノ酸）は、HVRの外側の領域（すなわち、FR内）で発生する。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、配列番号232のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、配列番号321または322から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

40

【0176】

50

いくつかの実施形態では、a) マスキングペプチド、切断可能なペプチドを含むリンカー、および軽鎖を含むアミノ酸配列、ならびにb) 重鎖を含むアミノ酸配列を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、マスキングペプチド、切断可能なペプチドを含むリンカー、および軽鎖を含むアミノ酸配列は、配列番号358、422、424～426、および428～431からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、重鎖を含むアミノ酸配列は、配列番号421のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、マスキングペプチド、切断可能なペプチドを含むリンカー、および軽鎖を含むアミノ酸配列は、配列番号358、422、424～426、および428～431からなる群から選択され、重鎖を含むアミノ酸配列は、配列番号421のアミノ酸配列を含む。

10

【0177】

いくつかの実施形態では、配列番号358および422～431からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ／または配列番号421のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、配列番号358および422～431からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号421のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、配列番号358および422～431からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ／または配列番号421のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、配列番号358および422～431からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、配列番号421のアミノ酸配列を含む。

20

30

40

【0178】

いくつかの実施形態では、配列番号422のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号421のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、

50

約 98%、約 99%、もしくは約 100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 422 のアミノ酸配列、および配列番号 421 のアミノ酸配列を含む。

【0179】

いくつかの実施形態では、配列番号 358 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100%の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 421 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100%の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 358 のアミノ酸配列、および配列番号 421 のアミノ酸配列を含む。

【0180】

いくつかの実施形態では、配列番号 423 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100%の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 421 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100%の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、マスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 423 のアミノ酸配列、および配列番号 421 のアミノ酸配列を含む。

【0181】

いくつかの実施形態では、配列番号 424 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100%の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 421 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100%の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 424 のアミノ酸配列、および配列番号 421 のアミノ酸配列を含む。

【0182】

いくつかの実施形態では、配列番号 425 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100% の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100% の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 421 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100% の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100% の相同性を有するアミノ酸配列を含む、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 425 のアミノ酸配列、および配列番号 421 のアミノ酸配列を含む。

10

【0183】

いくつかの実施形態では、配列番号 426 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100% の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100% の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 421 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100% の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100% の相同性を有するアミノ酸配列を含む、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 426 のアミノ酸配列、および配列番号 421 のアミノ酸配列を含む。

20

【0184】

いくつかの実施形態では、配列番号 427 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100% の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100% の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 421 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100% の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100% の相同性を有するアミノ酸配列を含む、マスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 427 のアミノ酸配列、および配列番号 421 のアミノ酸配列を含む。

30

40

【0185】

いくつかの実施形態では、配列番号 428 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100% の相同性を有するかまたは約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、もしくは約 100% の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 421 のアミノ酸配列に対して 70%、75%、80%、85%、

50

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、配列番号428のアミノ酸配列、および配列番号421のアミノ酸配列を含む。

【0186】

いくつかの実施形態では、配列番号429のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列、および配列番号421のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、配列番号429のアミノ酸配列、および配列番号421のアミノ酸配列を含む。

【0187】

いくつかの実施形態では、配列番号430のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号421のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片は、配列番号430のアミノ酸配列、および配列番号421のアミノ酸配列を含む。

【0188】

いくつかの実施形態では、配列番号431のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含み、かつ配列番号421のアミノ酸配列に対して70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の相同性を有するかまたは約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、もしくは約100%の相同性を有するアミノ酸配列を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結

10

20

30

40

50

合性断片は、配列番号 4 3 1 のアミノ酸配列、および配列番号 4 2 1 のアミノ酸配列を含む。

【0189】

免疫グロブリンには5つのクラス：Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、およびIg Mがあり、それぞれ、指定された、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ の重鎖を有する。 γ および α のクラスは、サブクラスにさらに分割され、例えば、ヒトは、以下のサブクラス：Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A 1、およびIg A 2を発現する。Ig G 1抗体は、アロタイプと称される複数の多型バリエーション（Jefferys and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4 1-7）に存在してもよく、そのいずれも本明細書の実施形態のうちのいくつかでの使用に好適である。ヒト集団における一般的なアロタイプバリエーションは、a、f、n、z、またはその組み合わせの文字によって指定されるものである。本明細書の実施形態のうちのいくつかでは、抗体は、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、またはIg G 4アイソタイプを有する。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA 4抗体またはその抗原結合性断片は、Ig G 1アイソタイプ（例えば、ヒトIg G 1アイソタイプ）を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体は、配列番号 2 3 5 または 2 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体は、配列番号 3 2 6 のアミノ酸配列を含む重鎖定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体は、配列番号 4 6 3 のアミノ酸配列を含む重鎖定常ドメインを含む。

【0190】

いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA 4抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載されるプロテアーゼなどのプロテアーゼによる切断時にCTLA 4を結合する。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、CTLA 4を発現する細胞または組織を含む領域内で共局在化されるプロテアーゼの基質である。

【0191】

本発明の一態様では、活性化可能なマスクされた抗CTLA 4抗体またはその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドが提供される。ある特定の実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA 4抗体またはその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。ある特定の実施形態では、かかるベクターを含む宿主細胞が提供される。本発明の別の態様では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA 4抗体、または本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA 4抗体をコードするポリヌクレオチドを含む組成物が提供される。ある特定の実施形態では、本発明の組成物は、CTLA 4が、本明細書に列挙されるものなどの役割を果たす腫瘍性疾患の治療のための薬学的製剤である。

【0192】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるCTLA 4結合タンパク質は、CTLA 4に結合することができる二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、結合特異性のうちの一方は、CTLA 4に対するものであり、他方は、任意の他の抗原に対するものである。ある特定の実施形態では、二重特異性抗体は、CTLA 4の2つの異なるエピトープに結合し得る。

【0193】

いくつかの態様では、a) CTLA 4に特異的に結合する第1の対の軽鎖および重鎖、b) 抗原に特異的に結合する第2の対の軽鎖および重鎖、ならびにc) 配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドを含むマスクされた二重特異性抗体が本明細書に提供され、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、第1の対の軽鎖および／または重鎖のアミノ末端に連結される。いくつかの態様では、a) CTLA 4に特異的に結合する第1の対の軽鎖および重鎖、b) 抗原に特異的に結合する第2の対の軽鎖および重鎖、ならびにc) 配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドを含むマスクされた二重特異性抗体が本明細書に提

供され、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、第1の対の軽鎖および／または重鎖のカルボキシ末端に連結される。いくつかの実施形態では、抗原は、CTL A 4とは異なる抗原である。いくつかの実施形態では、第1の対または第2の対の軽鎖は、本明細書に記載される任意の軽鎖である。いくつかの実施形態では、第1の対または第2の対の重鎖は、本明細書に記載される任意の軽鎖である。いくつかの実施形態では、第1の対の軽鎖は、配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、第1の対の重鎖は、配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。いくつかの実施形態では、第2の対の軽鎖は、配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、第2の対の重鎖は、配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む。いくつかの実施形態では、抗原は、CTL A 4の異なるエピトープに対するものである。いくつかの実施形態では、切断可能なペプチドは、配列番号47～88、464～469、および479～508から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、切断可能ペプチドのN末端および／またはC末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、配列番号89～112および415～420から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸であるが20、30、40、または50以下のアミノ酸は、マスキングペプチドのN末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのアミノ酸は、アラニン(A)またはグリシン-アラニン(GA)である。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、検出可能なタグである。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドのN末端に直接連結された少なくとも1つのアミノ酸は、

YPYDVDPDYA (配列番号

398), DYKDDDDK (配列番号399), EQKLISEEDL (配列番号400), または

GLNDIFEAQKIEWHE (配列番号401)

である。

【0194】

マスクされた二重特異性抗体で使用するための本明細書で企図される二重特異性抗体には、マウス二重特異性抗体、ヒト化二重特異性抗体、キメラ二重特異性抗体、およびヒト二重特異性抗体が含まれる。本明細書の実施形態のうちのいくつかでは、二重特異性抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプを有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される二重特異性抗体は、IgG1アイソタイプ（例えば、ヒトIgG1アイソタイプ）を有する。いくつかの実施形態では、抗体は、アミノ酸置換を含むIgG1アイソタイプを有するか、または本明細書に記載されるエフェクター機能を強化するFcグリカンをつコシル化する低減された能力を有さない細胞によって発現される。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるマスクされた二重特異性抗体は、配列番号235または236のアミノ酸配列を含む重鎖定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるマスクされた二重特異性抗体は、配列番号326のアミノ酸配列を含む重鎖定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるマスクされた二重特異性抗体は、配列番号463のアミノ酸配列を含む重鎖定常ドメインを含む。

【0195】

一態様では、配列番号232のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号233のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、活性化可能なマスクされた抗CT

LA4二重特異性抗体が本明細書に提供される。さらなる態様では、配列番号237～318から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、および／または配列番号319もしくは320から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4二重特異性抗体が本明細書に提供される。

【0196】

一態様では、配列番号321もしくは322から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号323もしくは324から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4二重特異性抗体が本明細書に提供される。さらなる態様では、配列番号327～341から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、かつ／または配列番号366～380、421、および478から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4二重特異性抗体が本明細書に提供される。また別のさらなる態様では、配列番号327、334、もしくは342～365から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、かつ／または配列番号366もしくは380～397から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4二重特異性抗体が本明細書に提供される。

【0197】

いくつかの実施形態では、配列番号233のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4二重特異性抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、配列番号323または324から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4二重特異性抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列に対して置換、挿入、または欠失を含むが、そのアミノ酸配列を含む抗体は、CTLA4（例えば、ヒトCTLA4）に結合する能力を保持する。いくつかの実施形態では、置換、挿入、または欠失（例えば、1、2、3、4、または5個のアミノ酸）は、HVRの外側の領域（すなわち、FR内）で発生する。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4二重特異性抗体は、配列番号233のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4二重特異性抗体は、配列番号323または324から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0198】

いくつかの実施形態では、配列番号232のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4二重特異性抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、配列番号321または322から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、活性化可能なマスクされた抗CTLA4二重特異性抗体が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列に対して置換、挿入、または欠失を含むが、そのアミノ酸配列を含む抗体は、CTLA4（例えば、ヒトCTLA4）に結合する能力を保持する。いくつかの実施形態では、置換、挿入、または欠失（例えば、1、2、3、4、または5個のアミノ酸）は、HVRの外側の領域（すなわち、FR内）で発生する。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4二重特異性抗体は、配列番号232のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4二重特異性抗体は、配列番号321または322から

選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0199】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるCTLA4結合タンパク質は、CTLA4に結合することができるキメラ受容体（例えば、キメラ抗原受容体（CAR））である。CARは、所望の抗原（例えば、CTLA4）に対する抗体ベースの特異性を、T細胞受容体活性化細胞内ドメインと組み合わせて、特異的な抗腫瘍細胞活性を呈するキメラタンパク質を生成する分子である。一実施形態では、T細胞抗原受容体複合体ゼータ鎖（例えば、CD3ゼータ）の細胞内シグナル伝達ドメインに融合された、本明細書に記載されるCTLA4結合ドメインを有する細胞外ドメインを含むように操作されたキメラ受容体が本明細書に提供される。CTLA4結合ドメインは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、本明細書に記載されるものなどのマスキングペプチドに連結されるように操作される。本明細書に提供される活性化可能なマスクされたキメラ受容体は、T細胞中で発現された場合、切断可能なペプチドを認識するプロテアーゼによる切断時に抗原結合特異性に基づいて抗原認識をリダイレクトすることができる。いくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、共刺激分子およびゼータ鎖のうちの1つ以上からの細胞内ドメインと融合することが好ましい。いくつかの実施形態では、CTLA4結合ドメインは、CD137（4-1BB）シグナル伝達ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータシグナルドメイン、およびそれらの任意の組み合わせの群から選択される1つ以上の細胞内ドメインと融合される。

【0200】

いくつかの態様では、a) CTLA4に結合する第1の鎖および第2の鎖を含むリガンド結合ドメイン、b) 配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチド、c) 膜貫通ドメイン、ならびにd) シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む、マスクされたキメラ受容体が本明細書に提供され、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、リガンド結合ドメインの第1の鎖および／または第2の鎖のアミノ末端に連結される。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、軽鎖可変ドメインであり、第2の鎖は、重鎖可変ドメインである。本明細書に記載される活性化可能なマスクされたキメラ受容体の実施形態のうちのいくつかでは、第1の鎖は、配列番号232のアミノ酸配列を含み、かつ／または第2の鎖は、配列番号233のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号321もしくは322から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ／または第2の鎖は、配列番号323もしくは324から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0201】

いくつかの態様では、a) CTLA4に結合する第1の鎖および第2の鎖を含むリガンド結合ドメイン、b) 配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチド、c) 膜貫通ドメイン、ならびにd) シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む、マスクされたキメラ受容体が本明細書に提供され、マスキングペプチドは、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、リガンド結合ドメインの第1の鎖および／または第2の鎖のカルボキシ末端に連結される。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、軽鎖可変ドメインであり、第2の鎖は、重鎖可変ドメインである。本明細書に記載される活性化可能なマスクされたキメラ受容体の実施形態のうちのいくつかでは、第1の鎖は、配列番号232のアミノ酸配列を含み、かつ／または第2の鎖は、配列番号233のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の鎖は、配列番号321もしくは322から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ／または第2の鎖は、配列番号323もしくは324から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0202】

本明細書に記載される活性化可能なマスクされたキメラ受容体の実施形態のうちのいくつかでは、切断可能なペプチドは、配列番号47～88、464～469、および479～508から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、スペーサーリンカーは、切断可能ペプチドのN末端および／またはC末端に直接連結される。いくつかの

実施形態では、スペーサーリンカーは、配列番号 89～112 および 415～420 から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つのアミノ酸であるが 20、30、40、または 50 以下のアミノ酸は、マスキングペプチドの N 末端に直接連結される。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つのアミノ酸は、アラニン (A) またはグリシン-アラニン (GA) である。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドの N 末端に直接連結された少なくとも 1 つのアミノ酸は、検出可能なタグである。いくつかの実施形態では、マスキングペプチドの N 末端に直接連結された少なくとも 1 つのアミノ酸は、

YPYDVDPDYA (配列番号

398), DYKDDDDK (配列番号 399), EQKLISEEDL (配列番号 400), または

GLNDIFEAQKIEWHE (配列番号 401)

である。

【0203】

1. 結合親和性

抗体と抗体が特異的である抗原との間のものなど、免疫学的結合相互作用の強度、または親和性は、相互作用の平衡解離定数 (K_D) に関して表すことができ、 K_D が小さいほどより高い親和性を表す。タンパク質の免疫学的結合特性は、当該技術分野で周知の方法を使用して定量化することができる。例えば、1 つの方法は、抗原結合タンパク質 (例えば、抗体) / 抗原複合体形成および解離の速度を測定することを含み、この速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、および両方向の速度に等しく影響する幾何学的パラメータに依存する。「オンレート定数」(K_{on}) および「オフレート定数」(K_{off}) の両方は、濃度ならびに会合および解離の実際の速度の計算によって決定することができる。 K_{off} / K_{on} の速度は、親和性に関連しないすべてのパラメータの削除を可能にし、平衡解離定数 K_D と等しい。Davies et al., Annual Rev Biochem. 59: 439-473, (1990) を参照されたい。

【0204】

いくつかの態様では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 結合タンパク質 (例えば、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片) は、切断可能なペプチドを含まない親抗 CTLA4 結合タンパク質と比較して、プロテアーゼとの切断時にほぼ同じまたはより高い親和性で CTLA4 に結合する。ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗 CTLA4 結合タンパク質は、 $\leq 1 \mu M$ 、 $\leq 150 nM$ 、 $\leq 100 nM$ 、 $\leq 50 nM$ 、 $\leq 10 nM$ 、 $\leq 1 nM$ 、 $\leq 0.1 nM$ 、 $\leq 0.01 nM$ 、または $\leq 0.001 nM$ (例えば、 $10^{-8} M$ 以下、例えば、 $10^{-8} M \sim 10^{-13} M$ 、例えば、 $10^{-9} M \sim 10^{-13} M$) の平衡解離定数 (K_D) を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗 CTLA4 結合タンパク質 (例えば、抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片) は、約 $50 pM \sim$ 約 $5 nM$ の平衡解離定数 (K_D) で標的タンパク質 (例えば、CTLA4 タンパク質) に結合する。結合親和性を評価するためのアッセイは、当該技術分野で周知であり、例えば、本明細書の実施例 3A および実施例 3B に記載されるアッセイなどである。

【0205】

いくつかの態様では、所望の閉塞比を呈する、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 結合タンパク質 (例えば、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片) が提供される。本明細書で使用される場合、「閉塞比」という用語は、(a) 第 1 の条件セットの下でのパラメータの最大検出レベルと、(b) 第 2 の条件セットの下でのそのパラメータの最小検出値との比を指す。例えば、活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片の文脈において、閉塞比は、(a) 活性化可能なマスクされた抗 CTLA4 抗体またはその抗原結合断片の切断可能なペプチドを切断すること

10

20

30

40

50

ができる少なくとも1つのプロテアーゼの存在下で、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片に結合する標的タンパク質（例えば、CTLA4タンパク質）の最大検出レベルと、（b）プロテアーゼの不在下で、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片に結合する標的タンパク質（例えば、CTLA4タンパク質）の最小検出レベルとの比を指す。活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の閉塞比は、プロテアーゼによる切断前の、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の解離定数と、プロテアーゼによる切断後の活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の解離定数との比として計算することができる。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片のより大きな閉塞比は、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片によって結合された標的タンパク質（例えば、CTLA4タンパク質）が、プロテアーゼの不在下よりも、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の切断可能なペプチドを切断することができるプロテアーゼの存在下で、より大きな程度に生じる（例えば、主に生じる）ことを示す。いくつかの実施形態では、最適な閉塞比を有する活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片の最適な閉塞比は、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が、本明細書に企図される方法または組成物に有用な望ましい特性を有することを示す。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、約20対約10,000、例えば、約80対約100の最適な閉塞比を呈する。さらなる実施形態では、閉塞比は、約20対約7,500、約20対約5,000、約20対約2,500、約20対約2,000、約20対約1,000、約20対約900、約20対約800、約20対約700、約20対約600、約20対約500、約20対約400、約20対約300、約20対約200、約20対約100、約20対約50、約30対約100、約40対約100、約50対約100、約60対約100、約70対約100、約80対約100、または約100対約1,000である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、約80対約100の最適な閉塞比を呈する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、約20対約1,000の最適な閉塞比を呈する。切断前および／またはプロテアーゼによる切断後の、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質の標的タンパク質（例えば、CTLA4タンパク質）への結合は、ELISAなど当該技術分野で周知の技術を使用して決定することができる。

【0206】

いくつかの態様では、本明細書に記載されるマスキングペプチドは、抗CTLA4結合タンパク質と標的タンパク質（例えば、CTLA4タンパク質）との間の親和性よりも低い親和性で、抗CTLA4結合タンパク質（例えば、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）に結合する。ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるマスキングペプチドは、 $\leq 1\text{mM}$ 、 $\leq 1\text{ }\mu\text{M}$ 、 $\leq 150\text{ nM}$ 、 $\leq 100\text{ nM}$ 、 $\leq 50\text{ nM}$ 、 $\leq 10\text{ nM}$ 、 $\leq 1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.01\text{ nM}$ 、または $\leq 0.001\text{ nM}$ （例えば、 10^{-5} M 以下、例えば、 $10^{-5}\text{ M} \sim 10^{-13}\text{ M}$ 、例えば、 $10^{-5}\text{ M} \sim 10^{-7}\text{ M}$ ）の平衡解離定数（ K_D ）で、抗CTLA4結合タンパク質（例えば、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）に結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるマスキングペプチドは、約50 nM～約50 μM の平衡解離定数（ K_D ）で抗CTLA4結合タンパク質（例えば、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）に結合する。マスキングペプチドと抗CTLA4結合タンパク質（例えば、抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）との間の結合親和性を評価するための例示的なアッセイは、本明細書の実施例2に見出され得る。

【0207】

2. 生物学的活性アッセイ

いくつかの態様では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、インビボでのマウス腫瘍モデルにおいて腫瘍体積を低減させる。腫瘍体積の低減を評価するためのアッセイは、当該技術分野で周知であり、例えば、本明細書の実施例4Aおよび実施例4Bに記載されるアッセイなどである。

【0208】

III. マスクされた抗CTLA4結合タンパク質の調製

本明細書に記載されるマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、当該技術分野で利用可能な技術を使用して調製され、その例示的な方法は、以下のセクションにより詳細に記載される。

【0209】

1. マスクされた抗CTLA4結合タンパク質：抗体断片

本発明は、マスクされた抗CTLA4結合タンパク質として抗体断片を包含する。マスクされた抗体断片は、酵素消化などの従来手段によって、または組換え技術によって生成され得る。ある特定の状況では、全抗体よりもマスクされた抗体断片を使用する利点がある。ある特定の抗体断片の概説については、Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134を参照されたい。

【0210】

抗体断片の生成のために様々な技術が開発されてきた。従来、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解消化を介して誘導された（例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)、およびBrennan et al., Science, 229:81 (1985)を参照されたい）。しかしながら、これらの断片は現在、組換え宿主細胞によって直接的に生成され得る。Fab、Fv、およびScFv抗体断片はすべて、大腸菌（E. coli）および他の細胞型で発現され、それから分泌されてもよく、したがって、大量のこれらのマスクされた断片の容易な生成を可能にする。あるいは、マスクされたFab'-SH断片は、培養培地から直接回収され、F(ab')₂断片を形成するように化学的に結合され得る（Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)）。別のアプローチによると、マスクされたF(ab')₂断片は、組換え宿主細胞培養物から直接単離され得る。FcRN／サルベージ受容体結合エпитープ残基を含むインビボ半減期の増加を伴うマスクされたFabおよびF(ab')₂断片は、米国特許第5,869,046号に記載されている。マスクされた抗体断片の生成のための他の技術は、当業者に明らかであろう。ある特定の実施形態では、マスクされた抗体は、一本鎖Fv断片（scFv）である。WO93/16185、米国特許第5,571,894号、および第5,587,458号を参照されたい。FvおよびscFvは、定常領域を欠くインタクトな結合部位を有する唯一の種であり、したがって、それらは、インビボでの使用中に低減された非特異的結合に好適であり得る。scFv融合タンパク質は、scFvのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかでエフェクタータンパク質の融合をもたらすように構築され得る。上記のAntibody Engineering, ed. Borrebaeckを参照されたい。また、ポリペプチドリンカーを介して連結された2つのscFvを含む二重scFvを、二重特異性抗体として使用することができる。あるいは、3つ以上のscFvを含むマルチscFvを、多重特異性抗体として使用してもよい。

【0211】

本発明は、線形抗体（例えば、米国特許第5,641,870号に記載されるような）、または適切なリンカーを介して連結された抗体の重鎖配列および軽鎖配列を含む一本鎖免疫グロブリンを含む。かかる線形抗体または免疫グロブリンは、単一特異性または二重特異性であってもよい。かかる一本鎖免疫グロブリンは、二量体化されて、それにより元々四量体である抗体のものと類似の構造および活性を維持することができる。また、本発明の抗体は、単一の重鎖可変領域を有し、かつ軽鎖の配列を有さない抗体であってもよい。単一ドメイン抗体（sdAb）またはナノボディと呼ばれる、かかる抗体。これらの抗

10

20

30

40

50

体はまた、本発明による抗体の機能性断片の意味に包含される。

【0212】

2. マスクされた抗CTLA4結合タンパク質：ヒト化抗体

本発明は、マスクされたヒト化抗体を包含する。ヒト化抗体は、本明細書に提供されるガイダンスに従ってマスクされる。非ヒト抗体をヒト化するための様々な方法が当該技術分野で既知である。例えば、ヒト化抗体は、非ヒトである源から導入される1つ以上のアミノ酸残基を有し得る。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「輸入」可変ドメインから取り込まれる「輸入」残基と称される。ヒト化は、ヒト抗体の対応する配列に超可変領域の配列を置換することによって、Winterの方法（Jones et al. (1986) Nature 321: 522-525、Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-327、Verhoeyen et al. (1988) Science 239: 1534-1536）の後に本質的に行われ得る。したがって、かかる「ヒト化」抗体は、キメラ抗体であり（米国特許第4, 816, 567号）、より実質的に少ないインタクトなヒト可変ドメインが、非ヒト種からの対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの超可変領域残基および場合によりいくつかのFR残基が、げっ歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

10

【0213】

3. マスクされた抗CTLA4結合タンパク質：ヒト抗体

本発明のヒト抗CTLA4抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリから選択されるFvクローン可変ドメイン配列（複数可）を、既知のヒト定常ドメイン配列（複数可）と組み合わせることによって構築することができる。あるいは、本発明のヒトモノクローナル抗CTLA4抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の生成のためのヒト骨髓腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株は、例えば、Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、およびBoerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)によって記載されている。ヒト抗体は、本明細書に提供されるガイダンスに従ってマスクされる。

20

30

【0214】

4. マスクされた抗CTLA4結合タンパク質：二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある特定の実施形態では、二重特異性抗体は、ヒトまたはヒト化抗体である。ある特定の実施形態では、結合特異性のうちの一方は、CTLA4に対するものであり、他方は、任意の他の抗原に対するものである。ある特定の実施形態では、二重特異性抗体は、CTLA4の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異性抗体を使用して、CTLA4を発現する細胞に細胞傷害性薬剤を局在化させてもよい。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片（例えば、F(ab')₂二重特異性抗体）として調製することができる。二重特異性抗体は、本明細書に提供されるガイダンスに従ってマスクされる。

40

【0215】

二重特異性抗体を作製する方法は、当該技術分野で既知である。Milstein and Cuello, Nature, 305: 537 (1983)、1993年5月13日に公開されたWO93/08829、Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655 (1991)、Kontermann and Brinkmann, Drug Discovery Today, 20(7): 838-847を参照されたい。二重特異性抗体の生成のさらなる詳細については、例えば、Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986)を参照されたい。二重特異性抗体には、架橋または「ヘテロ複合体」抗体が含まれる。例えば、ヘ

50

テロ複合体内の抗体の一方は、アビジンに結合され、他方はビオチンに結合され得る。ヘテロ複合体抗体は、任意の好都合な架橋方法を使用して作製され得る。好適な架橋剤は、いくつかの架橋技術とともに、当該技術分野で周知であり、米国特許第4,676,980号に開示されている。

【0216】

5. マスクされた抗CTLA4結合タンパク質：単ドメイン抗体

いくつかの実施形態では、単ドメイン抗体は、本明細書に提供されるガイダンスに従ってマスクされる。単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインのすべてもしくは一部、または軽鎖可変ドメインのすべてもしくは一部を含む単一ポリペプチド鎖である。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である（Domantis, Inc., Waltham, Mass.、例えば、米国特許第6,248,516 B1を参照されたい）。一実施形態では、単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインのすべてまたは一部からなる。

【0217】

6. マスクされた抗CTLA4結合タンパク質：抗体バリエーション

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるマスクされた抗体のアミノ酸配列修飾（複数可）が企図される。例えば、マスクされた抗体の結合親和性および／または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列バリエーションは、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な変化を導入することによって、またはペプチド合成によって調製され得る。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失および／またはそれへの挿入および／またはその置換を含む。欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせを行い、最終構築物を得ることができるが、ただし、最終構築物は、所望の特徴を保有していることを条件とする。アミノ酸変化は、配列が作製されたときに対象の抗体アミノ酸配列に導入されてもよい。

【0218】

変異誘発に好ましい位置である抗体のある特定の残基または領域を特定する有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085により記載されるように、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的残基の残基または群が識別され（例えば、Arg、Asp、His、Lys、およびGluなどの荷電残基）、中性または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）によって置換されて、アミノ酸と抗原の相互作用に影響を及ぼす。次いで、置換に対する機能的感受性を示すそれらのアミノ酸位置は、置換部位に、または置換部位のために、さらなるまたは他のバリエーションを導入することによって精製される。したがって、アミノ酸配列変異を導入するための部位は、予め決められているが、変異自体の性質は予め決められる必要はない。例えば、所与の部位での変異の性能を分析するために、標的コドンまたは領域においてAlaスキャニングまたはランダム変異誘発が実施され、発現された免疫グロブリンが所望の活性についてスクリーニングされる。

【0219】

アミノ酸配列挿入には、1残基から数百以上の残基を含むポリペプチドの長さの範囲のアミノ末端融合および／またはカルボキシル末端融合を含み、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列間挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子のその他の挿入バリエーションには、酵素またはポリペプチドに対する、抗体のN末端またはC末端への融合が含まれ、それにより抗体の血清半減期が延長される。

【0220】

いくつかの実施形態では、薬物動態を改善するFcRn変異には、これらに限定されないが、M428L、T250Q/M428L、M252Y/S254T/T256E、P257I/N434H、D376V/N434H、P257I/Q3111、N434A、N434W、M428L/N434S、V259I/V308F、M252Y/S254T/T256E、V259I/V308F/M428L、T307Q/N434A、T

307Q/N434S、T307Q/E380A/N434A、V308P/N434A、N434H、V308Pが含まれる。いくつかの実施形態では、かかる変異は、低いpHでFcRnへの抗体結合を強化するが、中性pHでは抗体親和性を変化させない。

【0221】

ある特定の実施形態では、本発明の抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少するように改変される。ポリペプチドのグリコシル化は、典型的にはN結合型またはO結合型のいずれかである。N結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指す。Xがプロリン以外の任意のアミノ酸である、トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニンは、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。したがって、これらトリペプチド配列のいずれかがポリペプチド中に存在することで、潜在的にグリコシル化部位が生じる。O結合型のグリコシル化とは、糖であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうちの1つの、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはスレオニンへの結合を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンもまた使用されてもよい。

【0222】

抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、上述のトリペプチド配列（N結合型グリコシル化部位の）のうちの1つ以上が作製または除去されるようにアミノ酸配列を改変することにより好都合に達成される。改変はまた、元の抗体の配列（O結合型グリコシル化部位の）に対して、1つ以上のセリン残基またはスレオニン残基の付加、欠失、または置換により行われてもよい。

【0223】

抗体がFc領域を含む場合、それに結合された炭水化物は改変され得る。例えば、抗体のFc領域に結合されたフコースを欠く成熟炭水化物構造を有する抗体は、米国特許出願第US2003/0157108（Presta, L.）に記載されている。US2004/0093621（Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd）もまた参照されたい。抗体のFc領域に結合された炭水化物中のバイセクティングN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を有する抗体は、WO2003/011878、Jean-Mairet et al.、および米国特許第6,602,684号、Umana et al.で参照されている。抗体のFc領域に結合されたオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体は、WO1997/30087、Patel et al.に報告されている。また、そのFc領域に結合された改変炭水化物を有する抗体に関するWO1998/58964（Raju, S.）およびWO1999/22764（Raju, S.）もまた参照されたい。修飾グリコシル化を有する抗原結合分子に関するUS2005/0123546（Umana et al.）もまた参照されたい。

【0224】

ある特定の実施形態では、グリコシル化バリエーションは、Fc領域を含み、Fc領域に結合された炭水化物構造は、フコースを欠くか、または低減されたフコースを有する。そのようなバリエーションは、改善されたADCC機能を有する。任意に、Fc領域は、ADCCをさらに改善する、その中に1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の位置298、333、および/または334での置換（残基のEUナンバリング）をさらに含む。「アフコシル化（afucosylated）」抗体、「脱フコシル化」抗体、または「フコース欠損」抗体に関連する刊行物の例には、US2003/0157108、WO2000/61739、WO2001/29246、US2003/0115614、US2002/0164328、US2004/0093621、US2004/0132140、US2004/0110704、US2004/0110282、US2004/0109865、WO2003/085119、WO2003/084570、WO2005/035586、WO2005/035778、WO2005/053742、Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249（2004）、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614

(2004)が挙げられる。脱フコシル化抗体を生成する細胞株の例としては、タンパク質フコシル化を欠損したLec13 CHO細胞(Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)、米国特許出願第US2003/0157108A1、Presta, L、およびWO2004/056312A1、Adams et al.、特に実施例11)、およびアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞(Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004))などのノックアウト細胞株、およびβ1, 4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnT-III)とゴルジμ-マンノシダーゼII(ManII)とを過剰発現する細胞が挙げられる。

10

【0225】

本明細書の実施形態のうちのいずれかでは、マスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)活性を改善するために操作され得る。いくつかの実施形態では、マスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、アルファ1, 6-フコシルトランスフェラーゼ(Fut8)ノックアウトを有する細胞株で生成されてもよい。いくつかのさらなる実施形態では、マスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、β1, 4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnT-III)を過剰発現する細胞株で生成されてもよい。さらなる実施形態では、細胞株は、さらに、ゴルジμ-マンノシダーゼII(ManII)を過剰発現する。本明細書の実施形態のうちのいくつかでは、マスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、ADCC活性を改善するFc領域に少なくとも1つのアミノ酸置換を含み得る。

20

【0226】

一実施形態では、マスクされた抗体は、その血清半減期を改善するために改変される。抗体の血清半減期を増加させるために、1つは、例えば、米国特許第5,739,277号に記載されるように、抗体(特に抗体断片)にFcRN/サルベージ受容体結合エピートープを組み込み得る。本明細書で使用される場合、「サルベージ受容体結合エピートープ」という用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加する要因となるIgG分子(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4)のFc領域のエピートープを指す(US2003/0190311、米国特許第6,821,505号、米国特許第6,165,745号、米国特許第5,624,821号、米国特許第5,648,260号、米国特許第6,165,745号、米国特許第5,834,597号)。

30

【0227】

バリエーションの別のタイプは、アミノ酸置換バリエーションである。これらのバリエーションは、異なる残基により置き換えられた抗体分子中の少なくとも1つのアミノ酸残基を有する。置換変異誘発についての目的の部位としては、超可変領域が挙げられるが、FRの改変もまた企図される。保存的置換は、「好ましい置換」の見出しで、表2に示されている。そのような置換により生物活性に望ましい変化が生じる場合、より大きな置換変化は、表2において「例示的な置換」で表示され、またはアミノ酸のクラスに関して以下に詳述されるように、そうした置換変化が導入され、生成物はスクリーニングされ得る。

40

【0228】

(表2)

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【 0 2 2 9 】

抗体の生物学的特性における置換修飾は、（a）置換領域中のポリペプチド主鎖の例えばシート立体構造またはヘリカル立体構造としての構造、（b）標的部位の分子の荷電もしくは疎水性、または（c）側鎖の体積、の維持に対する効果において、大きく異なる置換を選択することにより実現される。アミノ酸は、それらの側鎖の特性の類似性に従ってグループ化され得る（A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)）。

（1）非極性：Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

（2）非荷電極性：Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Ty

r (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

(3) 酸性：Asp (D)、Glu (E)

(4) 塩基性：Lys (K)、Arg (R)、His (H)

【0230】

あるいは、天然発生型残基は、以下の一般的な側鎖の特性に基づいてグループに分けられ得る：

(1) 疎水性：Norleucine、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3) 酸性：Asp、Glu；

(4) 塩基性：His、Lys、Arg；

(5) 鎖の方向性に影響を与える残基：Gly、Pro；

(6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0231】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスのものに交換することを伴う。かかる置換残基はまた、保存的置換部位、または残りの（非保存的）部位に導入されてもよい。

【0232】

置換バリエーションの1つのタイプは、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基を置換することを含む。概して、さらなる開発のために選択された得られたバリエーション（複数可）は、それらが生成される親抗体に対して、修飾された（例えば、改善された）生物学的特性を有する。かかる置換バリエーションを生成するための好都合な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性成熟を伴う。簡潔には、いくつかの超可変領域部位（例えば、6～7部位）を変異させて、各部位ですべての可能なアミノ酸置換を生成する。したがって、生成された抗体は、各粒子内にパッケージングされたファージコートタンパク質（例えば、M13の遺伝子IIII生成物）の少なくとも一部への融合として、繊維状ファージ粒子からディスプレイされる。次いで、ファージディスプレイバリエーションを、その生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。修飾のための超可変領域部位候補を特定するために、スクリーニング変異誘発（例えば、アラニンスクリーニング）を行い、抗原結合に著しく寄与する超可変領域残基を特定することができる。あるいは、または追加的に、抗体と抗原の間の接触点を特定するために、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析することが有益であり得る。かかる接触残基および隣接残基は、本明細書に詳述されるものを含む、当該技術分野で既知の技術による置換の候補である。かかるバリエーションが生成されると、バリエーションのパネルは、本明細書に記載されるものを含む、当該技術分野で既知の技術を使用してスクリーニングされ、1つ以上の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体は、さらなる開発のために選択され得る。

【0233】

マスクされた抗体のアミノ酸配列バリエーションをコードする核酸分子は、当該技術分野で既知の様々な方法によって調製される。これらの方法には、これらに限定されないが、天然源からの単離（天然発生型アミノ酸配列バリエーションの場合）、またはオリゴヌクレオチド媒介性（または部位指向型）変異誘発による調製、PCR変異誘発、および以前に調製された抗体のバリエーションもしくは非バリエーションバージョンのカセット変異誘発が含まれる。

【0234】

本発明の抗体のFc領域に1つ以上のアミノ酸修飾を導入し、それによりFc領域バリエーションを生成することが望ましい場合がある。Fc領域バリエーションは、ヒンジステインのアミノ酸位置を含む1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば、置換）を含むヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域）を含んでもよい。

【0235】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体もしくはその抗

10

20

30

40

50

原結合断片、または活性化可能なマスクされた抗C T L A 4二重特異性抗体)は、強化されたエフェクター機能を有するI g G 1アイソタイプを有する。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗C T L A 4抗体またはその抗原結合断片は、アフコシル化(a f u c o s y l a t e d)される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗C T L A 4二重特異性抗体は、アフコシル化される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗C T L A 4抗体またはその抗原結合断片は、マンノース部分の増加されたレベルを有する。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗C T L A 4抗体またはその抗原結合断片は、バイセクティンググリカン部分の増加されたレベルを有する。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗C T L A 4二重特異性抗体は、マンノース部分の増加されたレベルを有する。いくつかの実施形態では、I g G 1は、アミノ酸変異を含む。

10

【0236】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される活性化可能なマスクされた抗C T L A 4抗体もしくはその抗原結合性断片、または活性化可能なマスクされた抗C T L A 4二重特異性抗体は、I g G 1アイソタイプ(例えば、ヒトI g G 1アイソタイプ)を有する。一実施形態では、I g G 1は、アミノ酸置換S 2 9 8 A、E 3 3 3 A、およびK 3 3 4 Aを含み、アミノ酸残基は、K a b a tのようにE Uインデックスに従って番号付けされる。一実施形態では、I g G 1は、アミノ酸置換S 2 3 9 DおよびI 3 3 2 Eを含み、アミノ酸残基は、K a b a tのようにE Uインデックスに従って番号付けされる。一実施形態では、I g G 1は、アミノ酸置換S 2 3 9 D、A 3 3 0 L、およびI 3 3 2 Eを含み、アミノ酸残基は、K a b a tのようにE Uインデックスに従って番号付けされる。一実施形態では、I g G 1は、アミノ酸置換P 2 4 7 IおよびA 3 3 9 DまたはA 3 3 9 Qを含み、アミノ酸残基は、K a b a tのようにE Uインデックスに従って番号付けされる。一実施形態では、I g G 1は、アミノ酸置換D 2 8 0 H、S 2 9 8 Dを有するかもしれないK 2 9 0 S、またはS 2 9 8 Vを含み、アミノ酸残基は、K a b a tのようにE Uインデックスに従って番号付けされる。一実施形態では、I g G 1は、アミノ酸置換F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、およびY 3 0 0 Lを含み、アミノ酸残基は、K a b a tのようにE Uインデックスに従って番号付けされる。一実施形態では、I g G 1は、アミノ酸置換F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、およびP 3 9 6 Lを含み、アミノ酸残基は、K a b a tのようにE Uインデックスに従って番号付けされる。一実施形態では、I g G 1は、アミノ酸置換F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、V 3 0 5 I、およびP 3 9 6 Lを含み、アミノ酸残基は、K a b a tのようにE Uインデックスに従って番号付けされる。一実施形態では、I g G 1は、アミノ酸置換G 2 3 6 A、S 2 3 9 D、およびI 3 3 2 Eを含み、アミノ酸残基は、K a b a tのようにE Uインデックスに従って番号付けされる。一実施形態では、I g G 1は、アミノ酸置換K 3 2 6 AおよびE 3 3 3 Aを含み、アミノ酸残基は、K a b a tのようにE Uインデックスに従って番号付けされる。一実施形態では、I g G 1は、アミノ酸置換K 3 2 6 WおよびE 3 3 3 Sを含み、アミノ酸残基は、K a b a tのようにE Uインデックスに従って番号付けされる。一実施形態では、I g G 1は、アミノ酸置換K 2 9 0 EもしくはK 2 9 0 N、S 2 9 8 G、T 2 9 9 A、および／またはK 3 2 6 Eを含み、アミノ酸残基は、K a b a tのようにE Uインデックスに従って番号付けされる。

20

30

40

【0237】

この説明および当該技術分野の教示によれば、いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、例えば、F c領域において、野生型の対応する抗体と比較して、1つ以上の改変を含み得ることが企図される。しかしながら、これらの抗体は、その野生型の対応するものと比較して、治療的有用性のために必要とされる実質的に同じ特徴を保持するであろう。例えば、ある特定の改変は、例えば、W O 9 9 / 5 1 6 4 2に記載されるように、改変された(すなわち、改善されたまたは減少されたのいずれか)C 1 q結合および／または補体依存性細胞傷害(C D C)をもたらすであろうF c領域において行われ得る。D u n c a n & W i n t e r N a t u r e 3 2 2 : 7 3 8 - 4 0 (1 9 8 8)、米国特許第5, 6

50

48, 260号、米国特許第5,624,821号、およびFc領域バリエーションの他の例についてのWO94/29351もまた参照されたい。WO00/42072 (Presta) およびWO2004/056312 (Lowman) は、FcRへの結合が改善されたまたは減少した抗体バリエーションを説明する。これらの特許刊行物の内容は、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) もまた参照されたい。増加された半減期と、母体のIgGの胎児への移入の要因となる新生児Fc受容体 (FcRn) への改善された結合とを有する抗体 (Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) およびKim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)) は、US2005/0014934A1 (Hinton et al.) に記載されている。これらの抗体は、Fc領域とFcRnとの結合を改善する、その中の1つ以上の置換を有するFc領域を含む。改変Fc領域アミノ酸配列を有し、C1q結合能が増加または減少したポリペプチドバリエーションは、米国特許第6,194,551B1号、WO99/51642に記載されている。これらの特許刊行物の内容は、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000) もまた参照されたい。

【0238】

7. マスクされた抗体-薬物複合体

本発明はまた、化学療法剤もしくは薬物、成長阻害剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、またはその断片）、または放射性同位体などの1つ以上の細胞傷害性薬剤と複合体化された、本明細書に提供される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質を含むマスクされた抗体-薬物複合体 (ADC) も提供する。

【0239】

一実施形態では、抗体-薬物複合体に複合体化される1つ以上の薬物には、これらに限定されないが、メイタンシノイド（米国特許第5,208,020号、第5,416,064号、および欧州特許EP0425235B1を参照されたい）；モノメチルアウリスタチン薬物部分DEおよびDF (MMAEおよびMMAF) などのアウリスタチン（米国特許第5,635,483号および第5,780,588号、および第7,498,298号を参照されたい）；ドラスタチン；カリチアマイシンまたはその誘導体（米国特許第5,712,374号、第5,714,586号、第5,739,116号、第5,767,285号、第5,770,701号、第5,770,710号、第5,773,001号、および第5,877,296号、Hinman et al., Cancer Res. 53: 3336-3342 (1993)、およびLode et al., Cancer Res. 58: 2925-2928 (1998) を参照されたい）；ダウノマイシンまたはドキソルビシンなどのアントラサイクリン (Kratz et al., Current Med. Chem. 13: 477-523 (2006)、Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16: 358-362 (2006)、Torgov et al., Bioconj. Chem. 16: 717-721 (2005)、Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 829-834 (2000)、Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12: 1529-1532 (2002)、King et al., J. Med. Chem. 45: 4336-4343 (2002)、および米国特許第6,630,579号を参照されたい）；メトトレキサート；ビンデシン；ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、およびオルタタキセルなどのタキサン；トリコテセン；およびCC1065が含まれる。

【0240】

別の実施形態では、抗体-薬物複合体に複合体化される1つ以上の薬物は、これらに限定されないが、チューブリン重合の阻害剤（例えば、メイタンシノイドおよびアウリスタチン）、DNA損傷剤（例えば、ピロロベンゾジアゼピン (PBD) 二量体、カリチアミ

10

20

30

40

50

シン、デュオカルマイシン、およびインドリノベンゾジアゼピン二量体)、およびDNA合成阻害剤(例えば、エキサテカン誘導体Dxd)が含まれる。

【0241】

別の実施形態では、抗体-薬物複合体は、酵素的に活性な毒素またはその断片に複合体化された本明細書に記載される抗体を含み、これらに限定されないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、エキソトキシンA鎖(緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、アルファーサルシン、シナアブラギリ(*Aleurites fordii*)タンパク質、ジアンチン(*dianthin*)タンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(*Phytolacca americana*)タンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ツルレイシ(*momordica charantia*)阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ(*sapaonaria officinalis*)阻害剤、ジェロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンを含む。

【0242】

別の実施形態では、抗体-薬物複合体は、放射性原子に複合体化された本明細書に記載される抗体を含み、放射性複合体を形成する。放射性複合体の生成には、様々な放射性同位体が利用可能である。例としては、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、およびLuの放射性同位体が挙げられる。放射性複合体が検出に使用される場合、放射性複合体は、例えば、 tc^{99m} もしくは I^{123} などのシンチグラフィ-研究用の放射性原子、または再びヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、もしくは鉄などの核磁気共鳴(NMR)画像法(磁気共鳴画像法、MRIとしても知られる)用のスピン標識を含み得る。

【0243】

活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質(例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片)および細胞傷害性薬物の複合体は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミジン酸塩HClなど)、活性エステル(スベリン酸ジスクシンイミジルなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(トルエン2,6-ジイソシアネートなど)、およびビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)などの様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製され得る。例えば、リシンイムノトキシンは、Vitetta et al., Science 238:1098(1987)に記載されるように調製することができる。炭素-14-標識1-イソチオシアネートベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MXDTPA)は、放射性ヌクレオチドを抗体に複合体化するための例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照されたい。リンカーは、細胞における細胞傷害性薬物の放出を促進する「切断可能なリンカー」であってもよい。例えば、酸不安定リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定リンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカー(Chari et al., Cancer Res. 52:127-131(1992)、米国特許第5,208,020号)を使用してもよい。

【0244】

本明細書のADCは、これらに限定されないが、市販されている(例えば、Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, IL, U.S.A)から)BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC

、およびスルホ-SMPB、ならびにSVSB（スクシンイミジルー（４-ビニルスルホン）ベンゾエート）を含む、架橋試薬で調製されたかかる複合体を明確に企図する。

【0245】

8．ベクター、宿主細胞、および組換え法

本発明の活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質の組換え生成については、さらなるクローニング（DNAの増幅）のためまたは発現のために、それをコードする核酸を単離し、複製可能なベクター内に挿入する。抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用することにより（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）容易に単離され、シーケンシングされる。多くのベクターが利用可能である。ベクターの選択は、使用される宿主細胞に部分的に依存する。概して、宿主細胞は、原核細胞または真核細胞（概して哺乳動物）起源のいずれかである。IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgE定常領域を含む、任意のアイソタイプの定常領域をこの目的に使用することができること、ならびにかかる定常領域を任意のヒトまたは動物種から得ることができることが理解されよう。

【0246】

9．原核宿主細胞を使用した結合タンパク質の生成

a) ベクター構築

本発明の活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質のポリペプチド構成要素をコードするポリヌクレオチド配列は、標準的な組換え技術を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列は、ハイブリドーマ細胞などの抗体生成細胞から単離され、配列決定されてもよい。あるいは、ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド合成器またはPCR技術を使用して合成することができる。得られると、ポリペプチドをコードする配列は、原核宿主において異種ポリヌクレオチドを複製および発現することができる組換えベクターに挿入される。当該技術分野で利用可能かつ既知の多くのベクターを、本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主に、ベクターに挿入される核酸のサイズ、およびベクターで形質転換される特定の宿主細胞に依存する。各ベクターは、その機能（異種ポリヌクレオチドの増幅もしくは発現、またはその両方）、およびそれが常駐する特定の宿主細胞とのその適合性に応じて、様々な構成要素を含む。ベクター構成要素には、概して、これらに限定されないが、複製の起源、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位（RBS）、シグナル配列、異種核酸挿入、および転写終結配列が含まれる。

【0247】

概して、レプリコンを含むプラスミドベクターおよび宿主細胞と適合する種に由来する対照配列は、これらの宿主に関連して使用される。ベクターは、通常、複製部位、ならびに形質転換細胞において表現型選択を提供することができるマーキング配列を担持する。例えば、大腸菌は、典型的には、大腸菌の種に由来するプラスミドであるpBR322を使用して形質転換される。pBR322は、遺伝子コードアンピシリン（Amp）およびテトラサイクリン（Tet）耐性を含み、したがって形質転換細胞を特定するための容易な手段を提供する。pBR322、その誘導体、または他の微生物プラスミドもしくはバクテリオファージもまた、内因性タンパク質の発現のために微生物によって使用され得るプロモーターを含み得るか、または含むように修飾され得る。特定の抗体の発現に使用されるpBR322誘導体の例は、Carter et al.、米国特許第5,648,237号に記載されている。

【0248】

さらに、レプリコンを含むファージベクターおよび宿主微生物と適合する制御配列を、これらの宿主に関連した形質転換ベクターとして使用することができる。例えば、大腸菌LE392などの感受性宿主細胞を形質転換するために使用することができる組換えベクターを作製する際に、λGEM.TM.-11などのバクテリオファージが利用されてもよい。

【0249】

本発明の発現ベクターは、ポリペプチド構成要素の各々をコードする2つ以上のプロモーター-シストロン対を含み得る。プロモーターは、その発現を調節するシストロンの上流(5')に位置する非翻訳調節配列である。原核プロモーターは、典型的には、誘導性および恒常性の2つのクラスに分類される。誘導性プロモーターは、培養条件の変化、例えば、栄養素の有無または温度の変化に応答して、その制御下でシストロンの転写のレベルの増加を開始するプロモーターである。

【0250】

様々な潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモーターが周知である。選択されたプロモーターは、制限酵素消化を介してプロモーターをソースDNAから除去し、単離されたプロモーター配列を本発明のベクターに挿入することによって、軽鎖または重鎖をコードするシストロンDNAに動作可能に連結することができる。天然プロモーター配列および多くの異種プロモーターの両方を使用して、標的遺伝子の増幅および／または発現を配向することができる。いくつかの実施形態では、異種プロモーターは、それらが、天然標的ポリペプチドプロモーターと比較して、発現された標的遺伝子のより大きな転写量およびより高い収率を一般的に許容するため、利用される。

【0251】

原核宿主との使用に好適なプロモーターには、PhoAプロモーター、 β -ガラクターゼおよびラクトースプロモーター系、トリプトファン(Trp)プロモーター系、およびtacまたはtrcプロモーターなどのハイブリッドプロモーターが挙げられる。しかしながら、細菌において機能する他のプロモーター(他の既知の細菌またはファージプロモーターなど)も同様に好適である。それらのヌクレオチド配列が公開されており、それによって、当業者が、任意の必要な制限部位を供給するためのリンカーまたはアダプターを使用して、それらを標的軽鎖および重鎖をコードするシストロンに動作可能にライゲーションすることが可能になっている(Siebenlist et al., (1980) Cell 20:269)。

【0252】

本発明の一態様では、組換えベクター内の各シストロンは、膜にわたって発現ポリペプチドの転座を配向する分泌シグナル配列構成要素を含む。概して、シグナル配列は、ベクターの構成要素であってもよく、またはベクターに挿入される標的ポリペプチドDNAの一部であってもよい。本発明の目的のために選択されるシグナル配列は、宿主細胞によって認識および処理される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものであるべきである。異種ポリペプチドに対して天然のシグナル配列を認識および処理しない原核宿主細胞については、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ipp、または熱安定性エンテロトキシンII(STEI)リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpA、およびMBPからなる群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。本発明の一実施形態では、発現系の両方のシストロンで 사용되는シグナル配列は、STEIシグナル配列またはそのバリエーションである。

【0253】

別の態様では、本発明による免疫グロブリンの生成は、宿主細胞の細胞質内で発生し得るため、各シストロン内の分泌シグナル配列の存在を必要としない。この点において、免疫グロブリン軽鎖および重鎖は、マスキングペプチド、リンカー配列などの配列ありまたはなしで発現され、フォールディングされ、アセンブリされて、細胞質内に機能的免疫グロブリンを形成する。ある特定の宿主株(例えば、大腸菌trxB株)は、ジスルフィド結合形成に好ましい細胞質条件を提供し、それにより、発現されたタンパク質サブユニットの適切なフォールディングおよびアセンブリを可能にする。Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)。

【0254】

本発明の活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質はまた、本発明の分泌および適切にアセンブリされた抗体の収率を最大化するために、発現ポリペプチド構成要

10

20

30

40

50

素の定量的比を調節することができる発現系を使用することによって生成することができる。かかる調節は、ポリペプチド構成要素の翻訳強度を同時に調節することによって少なくとも部分的に達成される。

【0255】

本発明の活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質を発現するのに好適な原核宿主細胞には、例えば、グラム陰性またはグラム陽性の生物などの古細菌および真正細菌が含まれる。有用な細菌の例としては、エシェリキア (*Escherichia*) (例えば、大腸菌)、バチルス (*Bacilli*) (例えば、枯草菌 (*B. subtilis*))、腸内細菌 (*Enterobacteria*)、シュードモナス (*Pseudomonas*) の種 (例えば、緑膿菌 (*P. aeruginosa*))、サルモネラ・チフィリウム (*Salmonella typhimurium*)、セラチア・マルセセンス (*Serratia marcescans*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、プロテウス (*Proteus*)、シゲラ (*Shigella*)、根粒菌 (*Rhizobia*)、ビトレオシラ (*Vitreoscilla*)、またはパラコッカス (*Paracoccus*) が挙げられる。一実施形態では、グラム陰性細胞が使用される。一実施形態では、大腸菌細胞は、本発明の宿主として使用される。大腸菌株の例としては、遺伝子型 W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $ptr3$ $lacIq$ $lacL8$ $\Delta ompT$ $\Delta (nmpc-fepE)$ $degP41$ $kanR$ (米国特許第5,639,635号) を有する33D3株を含む、W3110株 (Bachmann, *Cellular and Molecular Biology*, vol. 2 (Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; ATCC Deposit No. 27,325)、およびその誘導体が挙げられる。大腸菌 294 (ATCC 31,446)、大腸菌 B、大腸菌 λ 1776 (ATCC 31,537)、および大腸菌 RV308 (ATCC 31,608) などの他の株およびその誘導体もまた好適である。これらの例は、限定するものではなく例示的なものである。定義された遺伝子型を有する上述の細菌のうちのいずれかの誘導体を構築するための方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、Bass et al., *Proteins*, 8:309-314 (1990) に記載されている。細菌の細胞内のレプリコンの複製可能性を考慮して、適切な細菌を選択することが一般的に必要である。例えば、pBR322、pBR325、pACYC177、または pKN410 などの周知のプラスミドを使用してレプリコンを供給する場合、大腸菌、セラチア (*Serratia*)、またはサルモネラ (*Salmonella*) の種を宿主として好適に使用することができる。典型的には、宿主細胞は、最小限の量のタンパク質分解酵素を分泌すべきであり、追加のプロテアーゼ阻害剤は、細胞培養に組み込まれ得ることが望ましい。

【0256】

b) 結合タンパク質生成

宿主細胞は、上述の発現ベクターで形質転換され、プロモーターを誘導するために、形質転換体を選択するために、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために、適切な場合に修飾された従来の栄養素培地中で培養される。

【0257】

形質転換とは、DNAが、染色体外要素として、または染色体統合体によってのいずれかで複製可能となるように、原核宿主にDNAを導入することを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換は、かかる細胞に適切な標準的な技術を使用して行われる。塩化カルシウムを用いるカルシウム処理は、実質的な細胞壁バリアを含む細菌細胞に一般的に使用される。形質転換のための別の方法は、ポリエチレングリコール/DMSOを用いる。使用されるさらに別の技術は、電気穿孔法である。

【0258】

本発明の活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質を生成するために使用される原核細胞は、当該技術分野で既知の培地中で増殖され、選択された宿主細胞の培養に好適である。好適な培地の例としては、ルリアブロス (LB) に加えて、必要な栄養補

助剤が挙げられる。いくつかの実施形態では、培地はまた、発現ベクターの構築に基づいて選択される選択剤を含み、発現ベクターを含む原核細胞の増殖を選択的に許容する。例えば、アンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖のために、アンピシリンが培地に添加される。

【0259】

炭素、窒素、および無機リン酸源以外の任意の必要な補助剤もまた、単独で、または別の補助剤もしくは複合窒素源などの培地との混合物として、適切な濃度で導入されてもよい。任意に、培養培地は、グルタチオン、システイン、シスタアミン、チオグリコレート、ジチオエリスリトール、およびジチオスレイトールからなる群から選択される1つ以上の還元剤を含み得る。

【0260】

原核宿主細胞は、好適な温度で培養される。ある特定の実施形態では、大腸菌の増殖については、増殖温度は、約20℃～約39℃、約25℃～約37℃、または約30℃の範囲である。培地のpHは、主に宿主生物に応じて、約5～約9の範囲の任意のpHであってもよい。ある特定の実施形態では、大腸菌については、pHは約6.8～約7.4、または約7.0である。

【0261】

誘導性プロモーターが本発明の発現ベクターで使用される場合、タンパク質発現は、プロモーターの活性化に好適な条件下で誘導される。本発明の一態様では、PhoAプロモーターは、ポリペプチドの転写を制御するために使用される。したがって、形質転換された宿主細胞は、誘導のためにリン酸制限培地中で培養される。ある特定の実施形態では、リン酸制限培地は、C.R.A.P.培地である（例えば、Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147を参照されたい）。当該技術分野で既知であるように、用いられるベクター構築物に従って、様々な他の誘導剤が使用されてもよい。

【0262】

一実施形態では、本発明の発現された活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、宿主細胞の周辺質に分泌され、宿主細胞の周辺質から回収される。タンパク質回収は、典型的には、一般に浸透圧ショック、超音波処理、または溶解などのかかる手段によって微生物を破壊することを伴う。細胞が破壊されると、細胞片または細胞全体が、遠心分離または濾過によって除去され得る。タンパク質は、例えば、親和性樹脂クロマトグラフィーによってさらに精製され得る。あるいは、タンパク質は、培養培地に輸送され、その中で単離され得る。細胞を培養物から除去され得、培養上清は、生成されたタンパク質のさらなる精製のために濾過され、濃縮される。発現されたポリペプチドは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)およびウェスタンブロットアッセイなどの一般的に既知である方法を使用して、さらに単離および特定することができる。

【0263】

本発明の一態様では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質生成は、発酵プロセスによって大量に実施される。組換えタンパク質の生成には、様々な大規模な流加発酵手順が利用可能である。大規模な発酵は、少なくとも1000リットルの容量を有し、ある特定の実施形態では、約1,000～100,000リットルの容量を有する。これらの発酵剤は、酸素および栄養素、特にグルコースを分配するために攪拌器インペラーを使用する。小規模の発酵とは、一般的に、体積容量が約100リットル以下であり、かつ約1リットル～約100リットルの範囲であり得る発酵機での発酵を指す。

【0264】

発酵プロセスでは、タンパク質発現の誘導は、典型的には、細胞が好適な条件下で、所望の密度、約180～220のOD₅₅₀へと成長した後を開始され、その段階では細胞は、初期静止期である。様々な誘導剤が、当該技術分野で既知であり、上述されるように、用いられるベクター構築物に従って使用されてもよい。細胞は、誘導の前により短い期間にわたって成長し得る。細胞は通常、約12～50時間誘導されるが、より長いまたは

10

20

30

40

50

より短い誘導時間が使用されてもよい。

【0265】

本発明のポリペプチドの生成収率および品質を改善するために、様々な発酵条件を修飾することができる。例えば、分泌抗体ポリペプチドの適切なアセンブリおよびフォールディングを改善するために、Dsbタンパク質（DsbA、DsbB、DsbC、DsbD、および／またはDsbG）またはFkpA（カペロン活性を有するペプチジルプロリルシス、トランスーイソメラーゼ）などのシャペロンタンパク質を過剰発現する追加のベクターを使用して、宿主原核細胞を共形質転換することができる。シャペロンタンパク質は、細菌宿主細胞中で生成される異種タンパク質の適切なフォールディングおよび溶解性を促進することが実証されている。Chen et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605; Georgiou et al.、米国特許第6,083,715号; Georgiou et al.、米国特許第6,027,888号; Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

10

【0266】

発現された異種タンパク質（特にタンパク質分解感受性のタンパク質）のタンパク質分解を最小化するために、タンパク質分解酵素を欠損したある特定の宿主株を本発明に使用することができる。例えば、宿主細胞株は、プロテアーゼIII、OmpT、DegP、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVI、およびそれらの組み合わせなどの既知の細菌プロテアーゼをコードする遺伝子内の遺伝的変異（複数可）に影響するように修飾され得る。いくつかの大腸菌プロテアーゼ欠損株は、例えば、上記のJoly et al. (1998); Georgiou et al.、米国特許第5,264,365号; Georgiou et al.、米国特許第5,508,192号; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)に記載されている。

20

【0267】

一実施形態では、タンパク質分解酵素を欠損し、かつ1つ以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換された大腸菌株は、本発明の発現系において宿主細胞として使用される。

30

【0268】

c) 結合タンパク質精製

一実施形態では、本明細書の生成されるマスクされた抗体タンパク質は、さらなるアッセイおよび使用のために、実質的に均質な調製物を得るためにさらに精製される。当該技術分野で既知の標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の手順は、好適な精製手順の例である：免疫親和性カラムまたはイオン交換カラム上の分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上またはDEAEなどの陽イオン交換樹脂上でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈殿、および例えば、Sephadex G-75を使用するゲル濾過。

40

【0269】

一態様では、固相上に固定されたプロテインAは、本発明の抗体生成物の免疫親和性精製に使用される。プロテインAは、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）由来の41kD細胞壁タンパク質であり、抗体のFc領域に高い親和性で結合する。Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。プロテインAが固定される固相は、ガラスもしくはシリカ表面、または制御された細孔ガラスカラムもしくはケイ酸カラムを含むカラムであり得る。いくつかの用途では、カラムは、グリセロールなどの試薬でコーティングされ、汚染物質の非特異的な付着を防止する可能性がある。

【0270】

50

精製の第1のステップとして、上述の細胞培養に由来する調製物を、プロテインA固定化固相に適用して、プロテインAへの目的の抗体の特異的結合を可能にすることができる。次いで、固相を洗浄して、固相に非特異的に結合された汚染物質を除去する。最後に、目的の抗体は、溶出によって固相から回収される。

【0271】

10. 真核宿主細胞を使用した結合タンパク質の生成

真核宿主細胞で使用するためのベクターには、概して、以下の非限定的な構成要素：シグナル配列、複製の起源、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、および転写終結配列のうちの1つ以上が含まれる。

【0272】

a) シグナル配列構成要素

真核宿主細胞で使用するためのベクターはまた、シグナル配列、または成熟タンパク質もしくは目的のポリペプチドのN末端に特定の切断部位を有する他のポリペプチドを含み得る。選択される異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識および処理される（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであり得る。哺乳動物細胞発現では、哺乳動物シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスgDシグナルが利用可能である。かかる前駆体領域のDNAは、リーディングフレームで、抗体をコードするDNAにライゲーションされる。

【0273】

b) 複製の起源

概して、複製構成要素の起源は、哺乳動物発現ベクターに必要とされない。例えば、SV40起源は、典型的には、早期プロモーターを含むためにのみ使用され得る。

【0274】

c) 選択遺伝子構成要素

発現ベクターおよびクローニングベクターは、選択遺伝子を含んでもよく、選択マーカーとも称される。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質もしくは他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、もしくはテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク質、(b) 関連する場合、栄養要求性欠損を相補するタンパク質、または(c) 複合培地から利用可能ではない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

【0275】

選択スキームの1つの例は、宿主細胞の増殖を停止するために薬物を利用する。異種遺伝子で正常に形質転換すること成功したそれらの細胞は、薬物抵抗性を付与するタンパク質を生成し、したがって選択レジメンを生き延びる。かかる優性の選択の例は、ネオマイシン、ミコフェノール酸、およびハイグロマイシンの薬物を使用する。

【0276】

哺乳動物細胞に好適な選択可能マーカーの別の例は、DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネインーIおよびーII、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどの核酸をコードする活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質を取り出す能力を有する細胞の識別を可能にするものである。

【0277】

例えば、いくつかの実施形態では、DHFR選択遺伝子で形質転換された細胞は、まず、DHFRの競合的アンタゴニストであるメトトレキサート(Mtx)を含む培養培地中ですべての形質転換体を培養することによって特定される。いくつかの実施形態では、野生型DHFRを用いる場合の適切な宿主細胞は、DHFR活性が欠損したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株(例えば、ATCC CRL-9096)である。

【0278】

あるいは、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質、野生型DHFRタンパク質、およびアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)などの別の選択可能マーカーをコードするDNA配列と形質転換または共形質転換された宿主細胞(

10

20

30

40

50

特に内因性DHFRを含む野生型宿主)は、アミノグリコシド系抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシン、またG418などの選択可能マーカーの選択剤を含む培地中の細胞増殖によって選択され得る。米国特許第4,965,199号を参照されたい。宿主細胞は、グルタミン合成酵素(GS)を欠損した細胞株を含むNS0を含んでもよい。哺乳動物細胞用の選択マーカーとしてのGSの使用方法は、米国特許第5,122,464号および米国特許第5,891,693号に記載されている。

【0279】

d) プロモーター構成要素

発現ベクターおよびクローニングベクターは、通常、宿主生物によって認識され、かつ目的の活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質をコードする核酸に動作可能に連結されるプロモーターを含む。プロモーター配列は、真核生物について既知である。例えば、ほぼすべての真核遺伝子は、転写が開始される部位からおよそ25~30塩基上流に位置するATリッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写の開始から70~80塩基上流に見出される別の配列は、CNCAAT領域であり、Nは任意のヌクレオチドであってもよい。ほとんどの真核遺伝子の3'末端に、コード配列の3'末端へのポリAテールの付加のシグナルであり得るAATAAA配列がある。ある特定の実施形態では、これらの配列のうちのいずれかまたはすべては、真核生物発現ベクターに好適に挿入されてもよい。

【0280】

哺乳動物宿主細胞中のベクターからの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、ファウルポックスウイルス、アデノウイルス(アデノウイルス2など)、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、およびシミアンウイルス40(SV40)などのウイルスのゲノムから、異種哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから、熱ショックプロモーター得られるプロモーターによって制御され、かかるプロモーターが、ただし、かかるプロモーターが宿主細胞系と適合性であることを条件とする。

【0281】

SV40ウイルスの初期プロモーターおよび後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起源も含むSV40制限断片として好都合に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの即時早期プロモーターは、HindIII-E制限断片として好都合に得られる。ウシパピローマウイルスをベクターとして使用して哺乳動物宿主においてDNAを発現するための系は、米国特許第4,419,446号に開示されている。この系の修飾については、米国特許第4,601,978号に記載されている。また、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒトβ-インターフェロンcDNAの発現について記載している、Reyes et al., Nature 297:598-601(1982)も参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

【0282】

e) エンハンサー要素構成要素

より高い真核生物による本発明の抗体をコードするDNAの転写は、エンハンサー配列をベクターに挿入することによってしばしば増加される。多くのエンハンサー配列は、現在、哺乳動物遺伝子(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテイン、およびインスリン)から既知である。しかしながら、典型的には、1つは真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用する。例としては、複製起源の後期側のSV40エンハンサー(bp100~270)、ヒトサイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、マウスサイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、複製起源の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。また、真核生物プロモーターの活性化のエンハンサー要素について記載している、Yaniv, Nature 297:17-18(1982)も参照されたい。エンハンサーは、5'または3'の位置で抗体ポリペプチドコード配列にベクター内にスプライスされてもよいが、概して、プロモーターから5'の部位に位置する。

【0283】

f) 転写終結構成要素

真核宿主細胞で使用する発現ベクターはまた、転写の終結およびmRNAの安定化に必要な配列を含み得る。かかる配列は、真核またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'および場合により3'の非翻訳領域から一般的に利用可能である。これらの領域は、抗体をコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されたヌクレオチドセグメントを含む。1つの有用な転写終結構成要素は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO94/11026およびその中に開示される発現ベクターを参照されたい。

【0284】

g) 宿主細胞の選択および形質転換

本明細書のベクター中のDNAをクローニングまたは発現するための好適な宿主細胞は、脊椎動物宿主細胞を含む、本明細書に記載されるより高い真核細胞を含む。培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は、日常的な手順となっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例としては、SV40（COS-7、ATCC CRL 1651）により形質転換されたサル腎臓CV1株；ヒト胚腎臓株（懸濁培養での増殖用にサブクローニングされた293または293細胞、Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-DHFR（CHO、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)）；マウスセルトリ細胞（TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)）；サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76、ATCC CRL-1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HEL A、ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（MDCK、ATCC CCL 34）；バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A、ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL 75）；ヒト肝臓細胞（Hep G2、HB 8065）；マウス乳癌腫瘍（MMT 060562、ATCC CCL51）；TRI細胞（Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)）；MRC5細胞；FS4細胞；およびヒト肝癌株（Hep G2）が挙げられる。

【0285】

宿主細胞は、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質生成のために上述の発現ベクターまたはクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導するために、形質転換体を選択するために、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために、適切な場合に修飾された従来の栄養素培地中で培養される。

【0286】

h) 宿主細胞の培養

本発明の活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質を生成するために使用される宿主細胞は、様々な培地中で培養されてもよい。ハムF10（Sigma）、最小必須培地（MEM）、Sigma）、RPMI-1640（Sigma）、およびダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、Sigma）などの市販の培地は、宿主細胞を培養するのに好適である。さらに、Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)、米国特許第4,767,704号、第4,657,866号、第4,927,762号、第4,560,655号、もしくは第5,122,469号、WO90/03430、WO87/00195、または米国特許再発行30,985に記載される培地のうちのいずれかは、宿主細胞の培養培地として使用され得る。これらの培地のうちのいずれも、必要な場合、ホルモンおよび／または他の成長因子（インスリン、トランスフェリン、または上皮成長因子など）、塩（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩など）、緩衝剤（HEPESなど）、ヌクレオチド（アデノシンおよびチミジンなど）、抗生物質（GENTAMYCIN（商標）薬物など）、微量元素（通常、

10

20

30

40

50

マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物として定義される)、およびグルコースまたは同等のエネルギー源で補充されてもよい。任意の他のサプリメントも、当業者に既知であろう適切な濃度で含まれてもよい。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞で以前に使用されたものであり、通常の当業者には明らかであろう。

【0287】

i) 結合タンパク質の精製

組換え技術を使用する場合、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質は、細胞内で生成され得るか、または培地中に直接分泌され得る。抗体が第1のステップとして細胞内で生成される場合、宿主細胞または溶解断片のいずれかである微粒子状破片は、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去され得る。活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質が培地中に分泌される場合、かかる発現系由来の上清は、最初に、市販のタンパク質濃度フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用して濃縮されてもよい。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤は、タンパク質分解を阻害するための前述のステップのうちのいずれかに含まれてもよく、抗生物質は、外来性汚染物質の成長を防止するために含まれてもよい。

【0288】

細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、および親和性クロマトグラフィーを使用して精製することができ、親和性クロマトグラフィーは簡便な技術である。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインAを使用して、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、または $\gamma 4$ 重鎖に基づく抗体を精製することができる(Lindmark et al., J. Immunol. Methods 62: 1-13 (1983))。プロテインGは、すべてのマウスアイソタイプ、およびヒト $\gamma 3$ に対して推奨される(Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986))。親和性リガンドが結合するマトリックスは、アガロースであってもよいが、他のマトリックスが利用可能である。制御細孔ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの機械的に安定したマトリックスは、アガロースで達成され得るよりも速い流量および短い処理時間を可能にする。抗体がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX (商標) 樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) は精製に有用である。イオン交換カラム上の分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE (商標) 上のクロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラムなど) 上のクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、および硫酸アンモニウム沈殿などのタンパク質精製のための他の技術もまた、回収される抗体に応じて利用可能である。

【0289】

任意の予備的精製ステップ(複数可)に続いて、目的のマスクされた結合タンパク質および汚染物質を含む混合物は、例えば、低塩濃度(例えば、約0~0.25M塩)で行われる、約2.5~4.5のpHの溶出緩衝液を使用した低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーによって、さらなる精製に晒されてもよい。

【0290】

概して、研究、試験、および臨床使用における使用のための抗体を調製するための様々な方法論は、上述の方法論と一致し、かつ/または特定の目的の抗体について当業者によって適切であるとみなされるように、当該技術分野で定着している。

【0291】

IV. 組成物

いくつかの態様では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質のうちのいずれかを含む組成物(例えば、薬学的組成物)もまた本明細書に提供される。

【0292】

10

20

30

40

50

治療用製剤は、所望の純度を有する活性成分を、任意の薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤と混合することによって保管のために調製される（Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Pub., Genaro Ed., Philadelphia, Pa. 2000）。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、用いられる投与量および濃度でレシピエントにとって非毒性であり、緩衝剤；アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE、ピロ亜硫酸ナトリウムを含む抗酸化物質；防腐剤、等張剤、安定剤、金属複合体（例えば、Znタンパク質複合体）；EDTAおよび／または非イオン性界面活性剤などのキレート剤を含む。

【0293】

緩衝剤を使用して、特に安定性がpH依存性である場合に、治療有効性を最適化する範囲内でpHを調整することができる。緩衝剤は、約20mM～約250mMの範囲の濃度で存在することができる。本発明とともに使用するための好適な緩衝剤は、有機酸および無機酸ならびにその塩の両方を含む。例えば、クエン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、酢酸塩である。さらに、緩衝剤は、トリスなどの、ヒスチジン塩およびトリメチルアミン塩からなってもよい。

【0294】

防腐剤は、微生物の成長を防止するために添加することができ、典型的には、約0.2%～1.0%（w/v）の範囲内に存在する。本発明とともに使用するための好適な防腐剤には、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム塩化物；ヘキサメトニウム塩化物；ベンザルコニウムハロゲン化物（例えば、塩化物、臭化物、ヨウ化物）、ベンゼトニウム塩化物；チメロサル、フェノール、ブチル、また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；レゾルシノール；シクロヘキサノール、3-ペンタノール、およびm-クレゾールが含まれる。

【0295】

等張剤は、時には「安定剤」として知られ、組成物中の液体の等張性を調整または維持するために存在し得る。タンパク質および抗体などの大きな荷電生体分子とともに使用された場合、それらはアミノ酸側鎖の荷電群と相互作用し、それによって分子間相互作用および分子内相互作用の可能性を低減することができるため、しばしば「安定剤」と称される。等張剤は、他の成分の相対量を考慮に入れて、約0.1重量%～約25重量%または約1～約5重量%の任意の量で存在し得る。いくつかの実施形態では、等張剤としては、多価糖アルコール、三価または価数がより多い糖アルコール、例えば、グリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール、およびマンニトールが挙げられる。

【0296】

追加の賦形剤には、（1）増量剤、（2）溶解性エンハンサー、（3）安定剤、および（4）ならびに容器壁への変性または付着を防止する薬剤のうちの1つ以上として作用し得る薬剤が含まれる。かかる賦形剤には、多価糖アルコール（上記に列挙）；アラニン、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、リジン、オルニチン、ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸、トレオニンなどのアミノ酸；スクロース、ラクトース、ラクチトール、トレハロース、スタキオース、マンノース、ソルボース、キシロース、リボース、リビトール、ミオイニシトース、ミオイニシトール、ガラクトース、ガラクトール、グリセロール、シクリトール（例えば、イノシトール）、ポリエチレングリコールなどの有機糖または糖アルコール；尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α -モノチオグリセロール、およびチオ硫酸ナトリウムなどの硫黄含有還元剤；ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、または他の免疫グロブリンなどの低分子量タンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；単糖類（例えば、キシロース、マンノース、フルクトース、グルコース）；二糖類（例えば、ラクトース、マルトース、スクロース）；ラフィノースなどの三糖類；ならびにデキストリンまたはデキストランなどの多糖類が含まれる。

【0297】

非イオン性界面活性剤または洗剤（「湿潤剤」としても知られる）は、治療剤を可溶化させるのを助け、ならびに攪拌誘導凝集から治療用タンパク質を保護するために存在することができ、これはまた、活性治療用タンパク質または抗体の変性を引き起こすことなく、製剤がせん断表面応力に曝露されることを可能にする。非イオン性界面活性剤は、約0.05mg/ml～約1.0mg/mlまたは約0.07mg/ml～約0.2mg/mlの範囲内で存在する。いくつかの実施形態では、非イオン性界面活性剤は、約0.001%～約0.1%w/v、または約0.01%～約0.1%w/v、または約0.01%～約0.025%w/vの範囲内で存在する。

【0298】

好適な非イオン性界面活性剤には、ポリソルベート（20、40、60、65、80など）、ポリオキサマー（184、188など）、PLURONIC（登録商標）ポリオール、TRITON（登録商標）、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル（TWEEN（登録商標）-20、TWEEN（登録商標）-80など）、ラウロマクロゴール 400、ステアリン酸ポリオキシル40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油10、50、および60、モノステアリン酸グリセロール、ショ糖脂肪酸エステル、メチルセルロース、ならびにカルボキシメチルセルロースが挙げられる。使用され得る陰イオン性洗剤には、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、およびジオクチルスルホン酸ナトリウムが含まれる。陽イオン性洗剤には、ベンザルコニウム塩化物またはベンゼトニウム塩化物が含まれる。

【0299】

製剤をインビボでの投与に使用するためには、製剤は滅菌でなければならない。製剤は、滅菌濾過膜を介する濾過によって滅菌され得る。本明細書の治療用組成物は、概して、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば、静注液バッグ、または皮下注射針により穿孔可能なストッパーを有するバイアルに入れられる。

【0300】

投与経路は、例えば、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、病変内、もしくは関節内経路、局所投与、吸入による、または徐放性もしくは持続放出手段による、注射または注入などの好適な様式で、単回もしくは複数回のボーラス、または長期間にわたる注入など、既知の許容された方法に従う。

【0301】

本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）は、単独で、または他の治療剤と組み合わせて、本明細書に記載される方法にあるのと同じように使用することができる。「と組み合わせて」という用語は、同一または別個の製剤に含まれる2つ以上の治療剤（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質および治療剤）を包含する。いくつかの実施形態では、「と組み合わせて」とは、「同時」投与を指し、その場合、本発明の活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質の投与は、1つ以上の追加の治療剤の投与と同時に発生する（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質の投与（複数可）と、1つ以上の追加の治療剤の投与との間と同時にまたは1時間以内）。いくつかの実施形態では、「と組み合わせて」とは、逐次的投与を指し、その場合、本発明の活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質の投与は、1つ以上の追加の治療剤の投与の前および／または後に発生する（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質の投与（複数可）と、1つ以上の追加の治療剤の投与との間の1時間超）。本明細書で意図される薬剤には、これらに限定されないが、細胞傷害性薬剤、サイトカイン、免疫チェックポイント分子を標的とする薬剤、免疫刺激分子を標的とする薬剤、または成長阻害剤が含まれる。

【0302】

本明細書の製剤はまた、治療されている特定の適応症、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有する適応症に必要な場合に、複数の活性化化合物を含み得る。ある

10

20

30

40

50

いは、または追加的に、組成物は、細胞傷害性薬剤、サイトカイン、免疫チェックポイント分子もしくは刺激分子を標的とする薬剤、または成長阻害剤を含んでもよい。かかる分子は、意図される目的に有効な量で、組み合わせて好適に存在する。

【0303】

V. 治療方法

本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）またはその組成物の有効量を対象に投与することを含む、対象における疾患を治療または予防するための方法が提供される。いくつかの実施形態では、対象（例えば、ヒト患者）は、腫瘍性障害（例えば、癌）と診断されたか、またはかかる障害を発症するリスクがある。

【0304】

疾患の予防または治療について、活性薬剤の適切な投与量は、上に定義されるような治療される疾患の種類、疾患の重症度および経過、予防または治療目的のために薬剤が投与されるかどうか、以前の治療、対象の臨床歴および薬剤に対する応答、ならびに担当医師の裁量に依存する。薬剤は、一度に、または一連の治療にわたって、対象に好適に投与される。本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）の投与の間の間隔は、約1ヶ月またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、投与の間の間隔は、約2ヶ月、約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、またはそれ以上である。本明細書で使用される場合、投与の間の間隔は、抗体の1つの投与と抗体の次の投与との間の期間を指す。本明細書で使用される場合、約1ヶ月の間隔は、4週間を含む。いくつかの実施形態では、投与の間の間隔は、約2週間、約3週間、約4週間、約8週間、約12週間、約16週間、約20週間、約24週間、またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、治療は、抗体の複数回投与を含み、投与の間の間隔は、変化し得る。例えば、第1の投与と第2の投与との間の間隔は、約1ヶ月であり、その後の投与の間の間隔は、約3ヶ月である。いくつかの実施形態では、第1の投与と第2の投与との間の間隔は、約1ヶ月であり、第2の投与と第3の投与との間の間隔は、約2ヶ月であり、その後の投与の間の間隔は、約3ヶ月である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）は、フラット用量で投与される。疾患の種類および重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ～ $10\text{mg}/\text{kg}$ ）の抗体は、例えば、1つ以上の別個の投与によって、または連続注入によってにかかわらず、患者への投与のための初期候補投与量であり得る。1つの典型的な1日投与量は、上述の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であり得る。数日以上にわたる反復投与については、状態に応じて、疾患症状の所望の抑制が発生するまで治療が概して維持されるであろう。抗体の1つの例示的な投与量は、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲内であろう。したがって、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 、または約 $10\text{mg}/\text{kg}$ （またはそれらの任意の組み合わせ）のうちの1つ以上の用量が患者に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）は、用量あたり約 25mg ～約 500mg の投与量で対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）は、約 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ または約 $1.0\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の投与量で対象に投与される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）は、約 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $1.0\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $1.5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $2.5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $3.0\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $3.5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 、約4

10

20

30

40

50

・ 5 mg / kg、約 5.0 mg / kg、約 5.5 mg / kg、約 6.0 mg / kg、約 6.5 mg / kg、約 7.0 mg / kg、約 7.5 mg / kg、約 8.0 mg / kg、約 8.5 mg / kg、約 9.0 mg / kg、約 9.5 mg / kg、または約 10.0 mg / kg のうちのいずれかの投与量で対象に投与される。いくつかの実施形態では、活性化可能なマスクされた抗 C T L A 4 結合タンパク質（例えば、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片）は、0.1 mg / kg ~ 10 mg / kg もしくは約 0.1 mg / kg ~ 約 10 mg / kg、10 mg / kg ~ 20 mg / kg もしくは約 10 mg / kg ~ 約 20 mg / kg、20 mg / kg ~ 30 mg / kg もしくは約 20 mg / kg ~ 約 30 mg / kg、30 mg / kg ~ 40 mg / kg もしくは約 30 mg / kg ~ 約 40 mg / kg、40 mg / kg ~ 50 mg / kg もしくは約 40 mg / kg ~ 約 50 mg / kg、50 mg / kg ~ 60 mg / kg もしくは約 50 mg / kg ~ 約 60 mg / kg、60 mg / kg ~ 70 mg / kg もしくは約 60 mg / kg ~ 約 70 mg / kg、または 70 mg / kg ~ 80 mg / kg もしくは約 70 mg / kg ~ 約 80 mg / kg の投与量で対象に投与される。上述の投与頻度のうちのいずれかを使用してよい。

【0305】

本明細書に企図される治療方法は、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗 C T L A 4 結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片）による、障害または疾患の治療である。本発明の製剤により治療可能な障害または疾患には、白血病、リンパ腫、頭頸部癌、結腸直腸癌、前立腺癌、脾臓癌、黒色腫、乳癌、神経芽細胞腫、肺癌、卵巣癌、骨肉腫、膀胱癌、子宮頸癌、肝臓癌、腎臓癌、皮膚癌（例えば、メルケル細胞癌）、または精巣癌が含まれる。

【0306】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗 C T L A 4 結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片）の投与による癌の治療または予防の方法が本明細書に提供される。本明細書で使用される場合、「癌」という用語は、白血病、リンパ腫、黒色腫、神経内分泌腫瘍、癌腫および肉腫を含む、哺乳動物に見られるすべてのタイプの癌、新生物、または悪性腫瘍を指す。本明細書に提供される活性化可能なマスクされた抗 C T L A 4 結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片）、薬学的組成物、または方法により治療され得る例示的な癌には、リンパ腫、肉腫、膀胱癌、骨癌、脳腫瘍、子宮頸癌、結腸癌、食道癌、胃癌、頭頸部癌、腎臓癌、骨髄腫、甲状腺癌、白血病、前立腺癌、乳癌（例えば、トリプルネガティブ、E R 陽性、E R 陰性、化学療法抵抗性、ハーセプチン耐性、H E R 2 陽性、ドキシソルビシン耐性、タモキシフェン耐性、腺管癌、小葉癌、原発性、転移性）、卵巣癌、脾臓癌、肝臓癌（例えば、肝細胞癌）、肺癌（例えば、非小細胞肺癌、扁平上皮細胞肺癌、腺癌、肺大細胞癌、小細胞肺癌、カルチノイド、肉腫）、多形性膠芽腫、神経膠腫、黒色腫、前立腺癌、去勢抵抗性前立腺癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、膠芽腫、卵巣癌、肺癌、扁平上皮細胞癌（例えば、頭、首、または食道）、結腸直腸癌、白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、B 細胞リンパ腫、または多発性骨髄腫が含まれる。追加の例としては、甲状腺の癌、内分泌系の癌、脳の癌、乳房の癌、子宮頸部の癌、結腸の癌、頭頸部の癌、食道の癌、肝臓の癌、腎臓の癌、肺の癌、非小細胞肺癌、黒色腫、中皮腫、卵巣の癌、肉腫、胃の癌、子宮の癌、または髄芽腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、多形性膠芽腫、卵巣癌、横紋筋肉腫、原発性原発性血小板血症、原発性マクログロブリン血症、原発性脳腫瘍、癌、悪性脾臓インスリノーマ、悪性カルチノイド、膀胱癌、前癌性皮膚病変、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、神経芽腫、食道癌、泌尿生殖器癌、悪性高カルシウム血症、子宮内膜癌、副腎皮質癌、内分泌または外分泌臓器の新生物、甲状腺髄様癌、甲状腺髄様癌、黒色腫、結腸直腸癌、甲状腺乳頭癌、肝細胞癌、乳頭パジェット病、葉状腫瘍、小葉癌、腺管癌、脾星細胞の癌、肝星細胞の癌、または前立腺癌が挙げられる。

【0307】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）の投与による白血病の治療または予防の方法が本明細書に提供される。「白血病」という用語は、血液形成器官の進行性の悪性疾患を広く指し、血液および骨髄中の白血球およびその前駆体の歪んだ増殖および発生によって一般的に特徴付けられる。白血病は一般的に、（１）疾患急性または慢性の期間および特徴、（２）関与する細胞の種類、骨髓性（myeloid）（骨髓性（myelogenous））、リンパ性（リンパ行性）、または単球性、および（３）血液白血病または白血病（亜白血病）における異常細胞数の増加または非増加に基づいて、臨床的に分類される。本明細書に提供される化合物、薬学的組成物、または方法により治療され得る例示的な白血病には、例えば、急性非リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髓球性白血病、成人T細胞白血病、非白血性白血病、白血球血症性白血病（leukocytchemic leukemia）、好塩基球性白血病、芽球性白血病、ウシ白血病、慢性骨髓性白血病、皮膚白血病、胎児性白血病、好酸球性白血病、グロス白血病、有毛細胞白血病、血芽球性白血病、血球芽細胞白血病、組織球性白血病、幹細胞性白血病、急性単球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ性（lymphatic）白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ行性白血病、リンパ性（lymphoid）白血病、リンパ肉腫細胞性白血病、肥満細胞白血病、巨核球性白血病、微小骨髓芽球性白血病、単球性白血病、骨髓芽球性白血病、骨髓球性白血病、骨髓性顆粒球性白血病、骨髓単球性白血病、ネーグリ白血病、形質細胞白血病、多発性骨髓腫、形質細胞性白血病、前骨髓球性白血病、リーダー細胞白血病、シリング白血病、幹細胞白血病、亜白血性白血病、または未分化細胞白血病が含まれる。

【0308】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）の投与による肉腫の治療または予防の方法が本明細書に提供される。「肉腫」という用語は、一般に、胚性結合組織のような物質からなり、かつ線維状または均質な物質に埋め込まれた密接に充填された細胞から一般に構成される腫瘍を指す。本明細書に提供される化合物、薬学的組成物、または方法により治療され得る肉腫には、軟骨肉腫、線維肉腫、リンパ肉腫、黒色肉腫、粘液肉腫、骨肉腫、アベメシー肉腫（Abemethy's sarcoma）、脂肪肉腫（adipose sarcoma）、脂肪肉腫（liposarcoma）、胞巣状軟部肉腫、エナメル芽細胞肉腫（ameloblastic sarcoma）、ブドウ状肉腫、緑色腫肉腫、絨毛上皮腫、胎児性肉腫、ウィルムス腫瘍肉腫、子宮内膜肉腫、間質肉腫、ユーイング肉腫、筋膜肉腫、線維芽細胞肉腫、巨細胞肉腫、顆粒球性肉腫、ホジキン肉腫、特発性多発性色素性出血性肉腫、B細胞の免疫芽球性肉腫、リンパ腫、T細胞の免疫芽球性肉腫、イエンセン肉腫、カポジ肉腫、クッパー細胞肉腫、血管肉腫、白血病肉腫（leukosarcoma）、悪性間葉腫肉腫、傍骨性肉腫（parosteal sarcoma）、網状赤血球肉腫（reticulocytic sarcoma）、ラウス肉腫、漿液嚢胞性肉腫（serocystic sarcoma）、滑膜肉腫、または毛細管拡張性肉腫（telangiectaltic sarcoma）が含まれる。

【0309】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）の投与による黒色腫の治療または予防の方法が本明細書に提供される。「黒色腫」という用語は、皮膚および他の器官のメラニン細胞系から生じる腫瘍を意味すると取られる。本明細書に提供される化合物、薬学的組成物、または方法により治療され得る黒色腫には、例えば、末端黒子型黒色腫、無色素性黒色腫、良性若年性黒色腫、クラウドマン黒色腫、S91黒色腫、ハーディング・パッセイ黒色腫、若年性黒色腫、悪性黒子黒色腫、悪性黒色腫、結節型黒色腫、爪下黒色腫、または表在拡大型黒色腫が含まれる。

【0310】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）の投与による癌腫の治療または予防の方法が本明細書に提供される。「癌腫」という用語は、周囲の組織に浸潤し、転移を生じさせる傾向がある上皮細胞からなる悪性の新しい成長を指す。本明細書に提供される化合物、薬学的組成物、または方法により治療され得る例示的な癌腫には、例えば、甲状腺髄様癌、家族性甲状腺髄様癌、腺房癌（acinar carcinoma）、腺房癌（acinous carcinoma）、腺様嚢胞癌（adenocystic carcinoma）、腺様嚢胞癌（adenoid cystic carcinoma）、腺腫様癌（carcinoma adenomatousum）、副腎皮質癌、肺胞上皮癌、肺胞上皮細胞癌、基底細胞癌（basal cell carcinoma）、基底細胞癌（carcinoma basocellulare）、類基底細胞癌、基底有棘細胞癌、気管支肺胞癌、気管支癌、気管支原性癌、脳状癌腫、胆管細胞癌、絨毛癌、膠様癌、面皰癌、子宮体癌（corpus carcinoma）、篩状癌、鑑状癌、皮膚の癌（carcinoma cutaneum）、円筒形癌、円筒細胞癌、導管癌、導管性癌、硬性癌、胎児性癌、脳様癌、類表皮癌、腺様上皮癌（carcinoma epitheliale adenoïdes）、外方増殖性癌（exophytic carcinoma）、潰瘍癌（carcinoma ex ulcere）、線維性癌（carcinoma fibrosum）、膠状癌（gelatiniformi carcinoma）、膠様癌（gelatinous carcinoma）、巨細胞癌（giant cell carcinoma）、巨細胞癌（carcinoma gigantocellulare）、腺癌、顆粒膜細胞癌、毛母癌、血液様癌（hematoid carcinoma）、肝細胞癌、ヒュルトレ細胞癌、硝子様癌（hyaline carcinoma）、副腎様癌（hypernephroid carcinoma）、小児胎児性癌（infantile embryonal carcinoma）、上皮内癌（carcinoma in situ）、表皮内癌、上皮内癌（intraepithelial carcinoma）、クロンペッカー癌（Krompecher's carcinoma）、クルチツキー細胞癌、大細胞癌、レンズ状癌（lenticular carcinoma）、レンズ状癌（carcinoma lentilulare）、脂肪性癌、小葉癌、リンパ上皮癌、髄様癌（carcinoma medullare）、髄様癌（medullary carcinoma）、黒色癌（melanotic carcinoma）、軟性癌（carcinoma molle）、粘液癌（mucinous carcinoma）、粘液腺癌（carcinoma muciparum）、粘液細胞癌（carcinoma mucocellulare）、粘表皮癌（mucoepidermoid carcinoma）、粘液癌（carcinoma mucosum）、粘液癌（mucous carcinoma）、粘液腫様癌（carcinoma myxomatodes）、鼻咽腔癌、燕麦細胞癌、骨化性癌（carcinoma ossificans）、類骨癌（osteoid carcinoma）、乳頭癌、門脈周囲癌、前浸潤癌、有棘細胞癌、粥状癌（pultaceous carcinoma）、腎臓の腎細胞癌、予備細胞癌（reserve cell carcinoma）、肉腫様癌、シュナイダー癌（schneiderian carcinoma）、スキルス癌、陰嚢癌、印環細胞癌、単純癌、小細胞癌、ソラノイド癌（solanoïd carcinoma）、球状細胞癌（spheroidal cell carcinoma）、紡錘細胞癌、海綿様癌、扁平上皮癌、扁平上皮細胞癌、ストリング癌（string carcinoma）、毛細血管拡張性癌（carcinoma telangiectaticum）、毛細血管拡張症様癌（carcinoma telangiectodes）、移行上皮癌、結節癌（carcinoma tuberosum）、管状癌（tubular carcinoma）、結節性癌（tuberous carcinoma）、疣状癌、または絨毛癌が含まれる。

【0311】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）の投与による転移性癌の治療または予防の方法が本明細書に提供される。本明細書で使用される場合、「転移」、「転移性」、および「転移性癌」という用語は、互換的に使用され、腫瘍性疾患または障害、例えば、癌の、1つの器官または別の非隣接器官または身体部分からの広がりを目指す。癌は、原発性腫瘍、例えば、原発性乳癌と称される、例えば、乳房などの起源部位で発生する。原発性腫瘍または起源部位の一部の癌細胞は、局所領域の正常な組織を取り囲むように浸透し浸潤する能力、および／または系を循環するリンパ系または血管系の壁を体内の他の部位および組織に浸透する能力を獲得する。原発性腫瘍の癌細胞から形成される第2の臨床的に検出可能な腫瘍は、転移性または二次性腫瘍と称される。癌細胞が転移すると、転移性腫瘍およびその細胞は、元の腫瘍のものと類似していると推定される。したがって、肺癌が乳房に転移した場合、乳房の部位の二次性腫瘍は、異常な肺細胞からなり、異常な乳房細胞からではない。乳房の二次性腫瘍は、転移性肺癌を指す。したがって、転移性癌という語句は、対象が原発性腫瘍を有するかまたは有した、かつ1つ以上の二次性腫瘍を有する疾患を指す。非転移性癌、または転移性ではない癌を有する対象という語句は、対象が原発性腫瘍を有するが、1つ以上の二次性腫瘍を有さない疾患を指す。例えば、転移性肺癌は、原発性肺腫瘍を有するか、もしくは原発性肺腫瘍の既往歴を有する、および例えば、乳房の第2の位置もしくは複数の位置において1つ以上の二次性腫瘍を有する対象における疾患を指す。

【0312】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるマスクされたCTLA4結合タンパク質によって有益であり得る疾患または障害には、（全体的または部分的に）CTLA4またはCTLA4の活性もしくは機能によって引き起こされる疾患（例えば、糖尿病、癌（例えば、前立腺癌、腎臓癌、転移性癌、黒色腫、去勢抵抗性前立腺癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、膠芽腫、卵巣癌、肺癌、扁平上皮細胞癌（例えば、頭、首、または食道）、結腸直腸癌、白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、B細胞リンパ腫、または多発性骨髄腫））が含まれるか、または疾患の症状は、（全体的または部分的に）CTLA4またはCTLA4の活性もしくは機能によって引き起こされる。

【0313】

VI. 製造物品またはキット

別の態様では、本明細書に記載される活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）を含む製造物品またはキットが提供される。製造物品またはキットは、本発明の方法における結合タンパク質の使用のための説明書をさらに含み得る。したがって、ある特定の実施形態では、製造物品またはキットは、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）の有効量を個体に投与することを含む、個体において障害（例えば、癌）を治療または予防するための方法における、活性化可能なマスクされた抗CTLA4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片）の使用のための説明書を含む。ある特定の実施形態では、個体は、ヒトである。いくつかの実施形態では、個体は、白血病、リンパ腫、頭頸部癌、結腸直腸癌、前立腺癌、脾臓癌、黒色腫、乳癌、神経芽細胞腫、肺癌、卵巣癌、骨肉腫、膀胱癌、子宮頸癌、肝臓癌、腎臓癌、皮膚癌、または精巣癌からなる群から選択される疾患を有する。

【0314】

製造物品またはキットは、容器をさらに含み得る。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル（例えば、デュアルチャンバーバイアル）、シリンジ（シングルチャンバーシリンジまたはデュアルチャンバーシリンジなど）、および試験管が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成されてもよい。容器は製剤を保持する。いくつかの実施形態では、製剤は、凍結乾燥製剤である。

【0315】

製造物品またはキットは、容器上のまたは容器と関連付けられるラベルまたは添付文書をさらに含んでもよく、製剤の再構成および／または使用の指示を示してもよい。ラベルまたは添付文書は、製剤が、個体における障害（例えば、癌）を治療または予防するための、皮下、静脈内、または他の投与様式に有用であるか、または意図されていることをさらに示し得る。製剤を保持する容器は、単回使用バイアルまたは複数回使用バイアルであってもよく、これは再構成された製剤の反復投与を可能にする。製造物品またはキットは、好適な希釈剤を含む第2の容器をさらに含み得る。製造物品またはキットは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および使用説明書を含む添付文書を含む、商業的、治療的、およびユーザーの観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。

【0316】

特定の実施形態では、本発明は、単回用量投与ユニット用のキットを提供する。かかるキットは、単一または複数チャンバーのプレフィルドシリンジの両方を含む治療用抗体の水性製剤の容器を含む。例示的なプレフィルドシリンジは、V e t t e r G m b H (R a v e n s b u r g , G e r m a n y) から入手可能である。

【0317】

本明細書の製造物品またはキットは、任意に、第2の医薬を含む容器をさらに含み、活性化可能なマスクされた抗C T L A 4結合タンパク質（例えば、活性化可能なマスクされた抗C T L A 4抗体またはその抗原結合断片）は、第1の医薬であり、その物品またはキットは、有効量で、第2の医薬で対象を治療するためのラベルまたは添付文書上の説明書をさらに含む。

【0318】

別の実施形態では、自動注射器での投与のための本明細書に記載される製剤を含む製造物品またはキットが本明細書に提供される。自動注射器は、起動時に、患者または投与者からの追加の必要な措置なしにその内容物を送達する、注射装置として説明され得る。これらは、送達速度が一定でなければならず、かつ送達時間が数瞬よりも長い場合、治療用製剤のセルフメディケーションに特に好適である。

【0319】

例示的な実施形態

提供される例示的な実施形態のうち、以下が挙げられる。

1. a) 抗体またはその抗原結合断片が第1の鎖および第2の鎖を含む、C T L A 4に結合する抗体またはその抗原結合断片と、

b) 配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドとを含む、マスクされた抗体であって、

マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、抗体またはその抗原結合断片の第1の鎖または第2の鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端に連結されている、

マスクされた抗体。

2. a) 第1の鎖が、軽鎖であり、

b) 第2の鎖が、重鎖である、

実施形態1のマスクされた抗体。

3. 抗体またはその抗原結合断片が、2つの第1の鎖および2つの第2の鎖を含む、実施形態1または2のマスクされた抗体。

4. a) 第1の鎖が、軽鎖可変ドメインであり、

b) 第2の鎖が、重鎖可変ドメインである、

実施形態1のマスクされた抗体。

5. 抗原結合断片が、d A b、F a b、F a b' - S H、F v、s c F v、または (F a b')₂断片である、実施形態1～4のいずれか1つのマスクされた抗体。

6. マスキングペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端が、切断可能なペプチドを含むリンカーに連結されている、実施形態1～5のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。

10

20

30

40

50

7. 切断可能なペプチドを含むリンカーが、
- a) 第1のスペーサーリンカーおよび切断可能なペプチド、または
- b) 第1のスペーサーリンカー、切断可能なペプチド、および第2のスペーサーリンカーを含む、実施形態1～6のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。
8. 切断可能なペプチドが、配列番号47～88、464～469、および479～508から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態1～7のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。
9. a) 第1のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドのN末端および／もしくはC末端に直接連結されている、または
- b) 第1のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドのN末端に直接連結されており、第2のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドのC末端に直接連結されている、実施形態1～8のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。
10. 第1のスペーサーリンカーが、配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ／または第2のスペーサーリンカーが、配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態7～9のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。
11. 切断可能なペプチドを含むリンカーが、配列番号454～462からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態1～10のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。
12. 少なくとも1つのアミノ酸であるが20以下のアミノ酸が、マスキングペプチドのN末端に直接連結されている、実施形態1～10のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。
13. 少なくとも1つのアミノ酸が、アラニン(A)またはグリシン-アラニン(GA)である、実施形態12のマスクされた抗体。
14. マスクされた抗体が、NからC末端またはCからN末端方向に、a) マスキングペプチド、b) 切断可能なペプチド、およびc) CTLA4に結合する抗体またはその抗原結合断片の第1の鎖または第2の鎖を含む、実施形態1～13のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。
15. a) マスクされた抗体が、マスキングペプチドと切断可能なペプチドとの間にスペーサーリンカーを含み、かつ
- b) マスクされた抗体が、切断可能なペプチドと、CTLA4に結合する抗体またはその抗原結合断片との間にスペーサーリンカーを含む、実施形態14のマスクされた抗体。
16. マスクされた抗体が、配列番号113～231および444～453からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態1～15のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。
17. 抗体またはその抗原結合断片が、マウス抗体である、実施形態1～16のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。
18. 抗体またはその抗原結合断片が、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはヒト抗体である、実施形態1～16のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。
19. 抗体またはその抗原結合断片が、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプを有する、実施形態1～18のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。
20. IgG1が、以下のアミノ酸置換を含み、
- a) S298A、E333A、およびK334A；
- b) S239DおよびI332E；
- c) S239D、A330L、およびI332E；
- d) P247IおよびA339DまたはA339Q；
- e) D280H、S298DありまたはなしのK290S、もしくはS298V；
- f) F243L、R292P、およびY300L；
- g) F243L、R292P、Y300L、およびP396L；

10

20

30

40

50

- h) F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、V 3 0 5 I、および P 3 9 6 L；
- i) G 2 3 6 A、S 2 3 9 D、および I 3 3 2 E；
- j) K 3 2 6 A および E 3 3 3 A；
- k) K 3 2 6 W および E 3 3 3 S；または
- l) K 2 9 0 E もしくは K 2 9 0 N、S 2 9 8 G、T 2 9 9 A、および／または K 3 2 6 E

アミノ酸残基が、K a b a t のように E U インデックスに従って番号付けされる、実施形態 19 のマスクされた抗体。

21. 抗体またはその抗原結合断片が、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、

a) 軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 402 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(i i) 配列番号 403 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および (i i i) 配列番号 404 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含み、かつ／または重鎖可変領域が、(i) 配列番号 405 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 406 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および (i i i) 配列番号 407 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含み、あるいは

b) 軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 408 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(i i) 配列番号 409 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および (i i i) 配列番号 410 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含み、かつ／または重鎖可変領域が、(i) 配列番号 411 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 412 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および (i i i) 配列番号 413 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含み、あるいは

c) 軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 432 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(i i) 配列番号 433 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および (i i i) 配列番号 434 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含み、かつ／または重鎖可変領域が、(i) 配列番号 435 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 436 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および (i i i) 配列番号 437 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含み、あるいは

d) 軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 438 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(i i) 配列番号 439 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および (i i i) 配列番号 440 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含み、かつ／または重鎖可変領域が、(i) 配列番号 441 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 442 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および (i i i) 配列番号 443 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含み、

実施形態 1～20 のうちのいずれか 1 つのマスクされた抗体。

22. 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 232 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号 233 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、実施形態 1～21 のうちのいずれか 1 つのマスクされた抗体。

23. 抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 237～318 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、および／または配列番号 319 もしくは 320 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施形態 22 のマスクされた抗体。

24. 抗体またはその抗原結合断片が、

a) 配列番号 321 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／もしくは配列番号 323 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、または

b) 配列番号 322 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／もしくは配列番号 324 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、実施形態 1～21 のうちのいずれか 1 つのマスクされた抗体。

25. 抗体が、配列番号 327～341 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、ならびに／または配列番号 366～380、421、および 478 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施形態 24 のマスクされた抗体。

26. 抗体もしくはその抗原結合断片が、配列番号 334 のアミノ酸配列を含む軽鎖、

および配列番号 4 2 1 のアミノ酸配列を含む重鎖を含むか、または抗体もしくはその抗原結合断片が、配列番号 3 2 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号 4 7 8 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施形態 2 4 または実施形態 2 5 のマスクされた抗体。

2 7 . 切断可能なペプチドが、CTLA 4 を発現する細胞または組織を含む領域内で共局在化されるプロテアーゼの基質である、実施形態 1 ~ 2 6 のうちのいずれか 1 つのマスクされた抗体。

2 8 . 切断可能なペプチドが、ABHD 1 2、ADAM 1 2、ABHD 1 2 B、ABHD 1 3、ABHD 1 7 A、ADAM 1 9、ADAM 2 0、ADAM 2 1、ADAM 2 8、ADAM 3 0、ADAM 3 3、ADAM 8、ABHD 1 7 A、ADAMDEC 1、ADAMTS 1、ADAMTS 1 0、ADAMTS 1 2、ADAMTS 1 3、ADAMTS 1 4、ADAMTS 1 5、ADAMTS 1 6、ADAMTS 1 7、ADAMTS 1 8、ADAMTS 1 9、ADAMTS 2、ADAMTS 2 0、ADAMTS 3、ADAMTS 4、ABHD 1 7 B、ADAMTS 5、ADAMTS 6、ADAMTS 7、ADAMTS 8、ADAMTS 9、ADAMTSL 1、ADAMTSL 2、ADAMTSL 3、ABHD 1 7 C、ADAMTSL 5、ASTL、BMP 1、CELA 1、CELA 2 A、CELA 2 B、CELA 3 A、CELA 3 B、ADAM 1 0、ADAM 1 5、ADAM 1 7、ADAM 9、ADAMTS 4、CTSE、CTSF、ADAMTSL 4、CMA 1、CTRB 1、CTRC、CTSO、CTRL、CTSA、CTSW、CTSB、CTSC、CTSD、ESP 1、CTSG、CTSH、GZMA、GZMB、GZMH、CTSK、GZMM、CTSL、CTSS、CTSV、CTSZ、HTRA 4、KLK 1 0、KLK 1 1、KLK 1 3、KLK 1 4、KLK 2、KLK 4、DPP 4、KLK 6、KLK 7、KLKB 1、ECE 1、ECE 2、ECEL 1、MASP 2、MEP 1 A、MEP 1 B、ELANE、FAP、GZMA、MMP 1 1、GZMK、HGFAC、HPN、HTRA 1、MMP 1 1、MMP 1 6、MMP 1 7、MMP 1 9、HTRA 2、MMP 2 0、MMP 2 1、HTRA 3、HTRA 4、KEL、MMP 2 3 B、MMP 2 4、MMP 2 5、MMP 2 6、MMP 2 7、MMP 2 8、KLK 5、MMP 3、MMP 7、MMP 8、MMP 9、LGMN、LNPEP、MASP 1、PAPPA、PAPPA 2、PCSK 1、NAPSA、PCSK 5、PCSK 6、MME、MMP 1、MMP 1 0、PLAT、PLAU、PLG、PRSS 1、PRSS 1 2、PRSS 2、PRSS 2 1、PRSS 3、PRSS 3 3、PRSS 4、PRSS 5 5、PRSS 5 7、MMP 1 2、PRSS 8、PRSS 9、PRTN 3、MMP 1 3、MMP 1 4、ST 1 4、TMPRSS 1 0、TMPRSS 1 1 A、TMPRSS 1 1 D、TMPRSS 1 1 E、TMPRSS 1 1 F、TMPRSS 1 2、TMPRSS 1 3、MMP 1 5、TMPRSS 1 5、MMP 2、TMPRSS 2、TMPRSS 3、TMPRSS 4、TMPRSS 5、TMPRSS 6、TMPRSS 7、TMPRSS 9、NRDC、OVCH 1、PAMR 1、PCSK 3、PHEX、TINAG、TPSAB 1、TPSD 1、およびTPSG 1 からなる群から選択される 1 つ以上の酵素によって切断される、実施形態 1 ~ 2 7 のうちのいずれか 1 つのマスクされた抗体。

2 9 . 切断可能なペプチドが、ADAM 1 7、HTRA 1、PRSS 1、FAP、GZMK、NAPSA、MMP 1、MMP 2、MMP 9、MMP 1 0、MMP 7、MMP 1 2、MMP 2 8、ADAMTS 9、HGFAC、およびHTRA 3 からなる群から選択される 1 つ以上の酵素によって切断される、実施形態 2 8 のマスクされた抗体。

3 0 . マスクされた抗体が、配列番号 4 2 1 のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号 3 5 8 および 4 2 2 ~ 4 3 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 1 ~ 2 9 のうちのいずれか 1 つのマスクされた抗体。

3 1 . 抗体またはその抗原結合断片が、薬剤と複合体化されている、実施形態 1 ~ 3 0 のうちのいずれか 1 つのマスクされた抗体。

3 2 . 薬剤が、チューブリン重合の阻害剤、DNA 損傷剤、またはDNA 合成阻害剤である、実施形態 3 1 のマスクされた抗体。

3 3 . 薬剤が、メイタンシノイド、アウリスタチン、ピロロベンゾジアゼピン (PBD) 二量体、カリチアマイシン、デュオカルマイシン、インドリノベンゾジアゼピン二量体

10

20

30

40

50

、またはエキサテカン誘導体 D x d である、実施形態 3 2 のマスクされた抗体。

3 4 . a) C T L A 4 に特異的に結合する第 1 の対の軽鎖および重鎖と、

b) 抗原に特異的に結合する第 2 の対の軽鎖および重鎖と、

c) 配列番号 1 ~ 4 6 から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドとを含む、マスクされた二重特異性抗体であって、

マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、第 1 の対の前記重鎖または前記軽鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端に連結されている、

マスクされた二重特異性抗体。

3 5 . マスキングペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端が、切断可能なペプチドを含むリンカーに連結されている、実施形態 3 4 のマスクされた二重特異性抗体。

3 6 . 切断可能なペプチドを含むリンカーが、

a) 第 1 のスペーサーリンカーおよび切断可能なペプチド、または

b) 第 1 のスペーサーリンカー、切断可能なペプチド、および第 2 のスペーサーリンカーを含む、実施形態 3 4 または 3 5 のマスクされた二重特異性抗体。

3 7 . 切断可能なペプチドが、配列番号 4 7 ~ 8 8 、 4 6 4 ~ 4 6 9 、および 4 7 9 ~ 5 0 8 から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 4 ~ 3 6 のうちのいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

3 8 . a) 第 1 のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドの N 末端もしくは C 末端に直接連結されている、または

b) 第 1 のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドの N 末端に直接連結されており、第 2 のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドの C 末端に直接連結されている、実施形態 3 6 または実施形態 3 7 のマスクされた二重特異性抗体。

3 9 . 第 1 のスペーサーリンカーが、配列番号 8 9 ~ 1 1 2 および 4 1 5 ~ 4 2 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ／または第 2 のスペーサーリンカーが、配列番号 8 9 ~ 1 1 2 および 4 1 5 ~ 4 2 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 6 ~ 3 8 のうちのいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

4 0 . 切断可能なペプチドを含むリンカーが、配列番号 4 5 4 ~ 4 6 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 4 ~ 3 9 のうちのいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

4 1 . 少なくとも 1 つのアミノ酸であるが 2 0 以下のアミノ酸が、マスキングペプチドの N 末端に直接連結されている、実施形態 3 4 ~ 4 0 のうちのいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

4 2 . 少なくとも 1 つのアミノ酸が、アラニン (A) またはグリシン-アラニン (G A) である、実施形態 4 1 のマスクされた二重特異性抗体。

4 3 . 第 1 の対の軽鎖または重鎖が、N から C 末端または C から N 末端方向に、a) マスキングペプチド、b) 切断可能なペプチド、および c) 軽鎖または重鎖を含む、実施形態 3 4 ~ 4 2 のうちのいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

4 4 . a) 第 1 の対が、マスキングペプチドと切断可能なペプチドとの間にスペーサーリンカーを含み、かつ

b) 第 1 の対が、切断可能なペプチドと軽鎖または重鎖との間にスペーサーリンカーを含む、実施形態 4 3 のマスクされた二重特異性抗体。

4 5 . マスクされた二重特異性抗体が、配列番号 1 1 3 ~ 2 3 1 および 4 4 4 ~ 4 5 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態 3 4 ~ 4 4 のうちのいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

4 6 . 二重特異性抗体が、マウス抗体である、実施形態 3 4 ~ 4 5 のいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

4 7 . 二重特異性抗体が、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはヒト抗体である、実施形態 3 4 ~ 4 5 のいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

4 8 . 二重特異性抗体が、I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、または I g G 4 アイソタイ

10

20

30

40

50

プを有する、実施形態 34～47 のいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

49. IgG1 が、以下のアミノ酸置換を含み、

a) S298A、E333A、および K334A；

b) S239D および I332E；

c) S239D、A330L、および I332E；

d) P247I および A339D または A339Q；

e) D280H、S298D ありまたはなしの K290S、もしくは S298V；

f) F243L、R292P、および Y300L；

g) F243L、R292P、Y300L、および P396L；

h) F243L、R292P、Y300L、V305I、および P396L；

i) G236A、S239D、および I332E；

j) K326A および E333A；

k) K326W および E333S；または

l) K290E もしくは K290N、S298G、T299A、および／または K326E

アミノ酸残基が、Kabat のように EU インデックスに従って番号付けされる、実施形態 48 のマスクされた二重特異性抗体。

50. 第 1 の対が、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含み、

a) 軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 402 のアミノ酸配列を含む CDR-L1、(ii) 配列番号 403 のアミノ酸配列を含む CDR-L2、および (iii) 配列番号 404 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含み、かつ／または重鎖可変領域が、(i) 配列番号 405 のアミノ酸配列を含む CDR-H1、(ii) 配列番号 406 のアミノ酸配列を含む CDR-H2、および (iii) 配列番号 407 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む、あるいは

b) 軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 408 のアミノ酸配列を含む CDR-L1、(ii) 配列番号 409 のアミノ酸配列を含む CDR-L2、および (iii) 配列番号 410 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含み、かつ／または重鎖可変領域が、(i) 配列番号 411 のアミノ酸配列を含む CDR-H1、(ii) 配列番号 412 のアミノ酸配列を含む CDR-H2、および (iii) 配列番号 413 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む、あるいは

c) 軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 432 のアミノ酸配列を含む CDR-L1、(ii) 配列番号 433 のアミノ酸配列を含む CDR-L2、および (iii) 配列番号 434 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含み、かつ／または重鎖可変領域が、(i) 配列番号 435 のアミノ酸配列を含む CDR-H1、(ii) 配列番号 436 のアミノ酸配列を含む CDR-H2、および (iii) 配列番号 437 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む、あるいは

d) 軽鎖可変領域が、(i) 配列番号 438 のアミノ酸配列を含む CDR-L1、(ii) 配列番号 439 のアミノ酸配列を含む CDR-L2、および (iii) 配列番号 440 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含み、かつ／または重鎖可変領域が、(i) 配列番号 441 のアミノ酸配列を含む CDR-H1、(ii) 配列番号 442 のアミノ酸配列を含む CDR-H2、および (iii) 配列番号 443 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む、

実施形態 34～49 のうちのいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

51. 第 1 の対が、配列番号 232 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／または配列番号 233 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、実施形態 34～50 のうちのいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

52. 第 1 の鎖が、配列番号 237～318 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、ならびに／または配列番号 319 もしくは 320 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施形態 51 のマスクされた二重特異性抗体。

53. 第 1 の対が、

10

20

30

40

50

a) 配列番号 3 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／もしくは配列番号 3 2 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、または

b) 配列番号 3 2 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、および／もしくは配列番号 3 2 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、実施形態 3 4 ～ 5 0 のうちのいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

5 4 . 第 1 の鎖が、配列番号 3 2 7 ～ 3 4 1 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖、ならびに／または配列番号 3 6 6 ～ 3 8 0 、 4 2 1 、 および 4 7 8 から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施形態 5 3 のマスクされた二重特異性抗体。

5 5 . 第 1 の対が、配列番号 3 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号 4 2 1 のアミノ酸配列を含む重鎖を含むか、または第 1 の対が、配列番号 3 2 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖、および配列番号 4 7 8 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、実施形態 5 3 または 5 4 のマスクされた二重特異性抗体。

5 6 . 切断可能なペプチドが、CTLA 4 を発現する細胞または組織を含む領域内で共局在化されるプロテアーゼの基質である、実施形態 3 4 ～ 5 5 のうちのいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

5 7 . 切断可能なペプチドが、ABHD12、ADAM12、ABHD12B、ABHD13、ABHD17A、ADAM19、ADAM20、ADAM21、ADAM28、ADAM30、ADAM33、ADAM8、ABHD17A、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS10、ADAMTS12、ADAMTS13、ADAMTS14、ADAMTS15、ADAMTS16、ADAMTS17、ADAMTS18、ADAMTS19、ADAMTS2、ADAMTS20、ADAMTS3、ADAMTS4、ABHD17B、ADAMTS5、ADAMTS6、ADAMTS7、ADAMTS8、ADAMTS9、ADAMTSL1、ADAMTSL2、ADAMTSL3、ABHD17C、ADAMTSL5、ASTL、BMP1、CELA1、CELA2A、CELA2B、CELA3A、CELA3B、ADAM10、ADAM15、ADAM17、ADAM9、ADAMTS4、CTSE、CTSF、ADAMTSL4、CMA1、CTRB1、CTRC、CTSO、CTRL、CTSA、CTSW、CTSB、CTSC、CTSD、ESP1、CTSG、CTSH、GZMA、GZMB、GZMH、CTSK、GZMM、CTSL、CTSS、CTSV、CTS Z、HTRA4、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、KLK2、KLK4、DPP4、KLK6、KLK7、KLKB1、ECE1、ECE2、ECE1、MASP2、MEP1A、MEP1B、ELANE、FAP、GZMA、MMP11、GZMK、HGFAC、HPN、HTRA1、MMP11、MMP16、MMP17、MMP19、HTRA2、MMP20、MMP21、HTRA3、HTRA4、KEL、MMP23B、MMP24、MMP25、MMP26、MMP27、MMP28、KLK5、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、LGMN、LNPEP、MASP1、PAPPA、PAPPA2、PCSK1、NAPSA、PCSK5、PCSK6、MME、MMP1、MMP10、PLAT、PLAU、PLG、PRSS1、PRSS12、PRSS2、PRSS21、PRSS3、PRSS33、PRSS4、PRSS55、PRSS57、MMP12、PRSS8、PRSS9、PRTN3、MMP13、MMP14、ST14、TMPRSS10、TMPRSS11A、TMPRSS11D、TMPRSS11E、TMPRSS11F、TMPRSS12、TMPRSS13、MMP15、TMPRSS15、MMP2、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、TMPRSS5、TMPRSS6、TMPRSS7、TMPRSS9、NRDC、OVCH1、PAMR1、PCSK3、PHEX、TINAG、TPSAB1、TPSD1、およびTPSG1からなる群から選択される1つ以上の酵素によって切断される、実施形態 3 4 ～ 5 6 のうちのいずれか 1 つのマスクされた二重特異性抗体。

5 8 . 切断可能なペプチドが、ADAM17、HTRA1、PRSS1、FAP、GZMK、NAPSA、MMP1、MMP2、MMP9、MMP10、MMP7、MMP12、MMP28、ADAMTS9、HGFAC、およびHTRA3からなる群から選択される1つ以上の酵素によって切断される、実施形態 5 7 のマスクされた二重特異性抗体。

10

20

30

40

50

59. マスクされた二重特異性抗体が、配列番号421のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号358および422～431からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態34～58のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体。

60. マスクされた二重特異性抗体が、薬剤と複合体化されている、実施形態34～59のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体。

61. 薬剤が、チューブリン重合の阻害剤、DNA損傷剤、またはDNA合成阻害剤である、実施形態60のマスクされた二重特異性抗体。

62. 薬剤が、メイタンシノイド、アウリスタチン、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)二量体、カリチアマイシン、デュオカルマイシン、インドリノベンゾジアゼピン二量体、またはエキサテカン誘導体Dxdである、実施形態60のマスクされた二重特異性抗体。

63. a) CTLA4に結合する第1の鎖および第2の鎖を含むリガンド結合ドメインと、

b) 配列番号1～46から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドと、

c) 膜貫通ドメインと、

d) シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインと

を含む、マスクされたキメラ受容体であって、

マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、第1の鎖または第2の鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端に連結されている、

マスクされたキメラ受容体。

64. a) 第1の鎖が、軽鎖可変ドメインであり、

b) 第2の鎖が、重鎖可変ドメインである、

実施形態63のマスクされたキメラ受容体。

65. マスキングペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端が、切断可能なペプチドを含むリンカーに連結されている、実施形態63または64のマスクされたキメラ受容体。

66. 切断可能なペプチドを含むリンカーが、

a) 第1のスペーサーリンカーおよび切断可能なペプチド、または

b) 第1のスペーサーリンカー、切断可能なペプチド、および第2のスペーサーリンカーを含む、実施形態63～65のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

67. 切断可能なペプチドが、配列番号47～88、464～469、および479～508から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態63～66のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

68. a) 第1のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドのN末端もしくはC末端に直接連結されている、または

b) 第1のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドのN末端に直接連結されており、第2のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドのC末端に直接連結されている、実施形態66または実施形態67のマスクされたキメラ受容体。

69. 第1のスペーサーリンカーが、配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ／または第2のスペーサーリンカーが、配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態68のマスクされたキメラ受容体。

70. 切断可能なペプチドを含むリンカーが、配列番号454～462からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態63～69のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

71. 少なくとも1つのアミノ酸であるが20以下のアミノ酸が、マスキングペプチドのN末端に直接連結されている、実施形態63～70のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

72. 少なくとも1つのアミノ酸が、アラニン(A)またはグリシン-アラニン(GA)である、実施形態71のマスクされたキメラ受容体。

73. リガンド結合ドメインの第1の鎖または第2の鎖が、NからC末端またはCからN末端方向に、a) マスキングペプチド、b) 切断可能なペプチド、およびc) 第1の鎖

10

20

30

40

50

または第2の鎖を含む、実施形態63～72のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

74. a) リガンド結合ドメインが、マスキングペプチドと切断可能なペプチドとの間にスパーサーリンカーを含み、かつ

b) リガンド結合ドメインが、切断可能なペプチドと軽鎖または重鎖との間にスパーサーリンカーを含む、

実施形態73のマスクされたキメラ受容体。

75. マスクされたキメラ受容体が、配列番号113～231および444～453からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態63～74のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

76. a) 第1の鎖が、(i) 配列番号402のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または第2の鎖が、(i) 配列番号405のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、あるいは

b) 第1の鎖が、(i) 配列番号408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または第2の鎖が、(i) 配列番号411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、あるいは

c) 第1の鎖が、(i) 配列番号432のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号433のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号434のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または重鎖可変領域が、(i) 配列番号435のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号436のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号437のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、あるいは

d) 第1の鎖が、(i) 配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／または重鎖可変領域が、(i) 配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、

実施形態63～75のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

77. 第1の鎖が、配列番号232のアミノ酸配列を含み、かつ／または第2の鎖が、配列番号233のアミノ酸配列を含む、実施形態63～76のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

78. a) 第1の鎖が、配列番号321のアミノ酸配列を含み、かつ／または第2の鎖が、配列番号323のアミノ酸配列を含む、あるいは

b) 第1の鎖が、配列番号322のアミノ酸配列を含み、かつ／または第2の鎖が、配列番号324のアミノ酸配列を含む、

実施形態63～76のいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

79. 切断可能なペプチドが、CTLA4を発現する細胞または組織を含む領域内で共局在化されるプロテアーゼの基質である、実施形態63～78のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

80. 切断可能なペプチドが、ABHD12、ADAM12、ABHD12B、ABHD13、ABHD17A、ADAM19、ADAM20、ADAM21、ADAM28、ADAM30、ADAM33、ADAM8、ABHD17A、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS10、ADAMTS12、ADAMTS13、ADAMTS14

10

20

30

40

50

、ADAMTS15、ADAMTS16、ADAMTS17、ADAMTS18、ADAMTS19、ADAMTS2、ADAMTS20、ADAMTS3、ADAMTS4、ABHD17B、ADAMTS5、ADAMTS6、ADAMTS7、ADAMTS8、ADAMTS9、ADAMTSL1、ADAMTSL2、ADAMTSL3、ABHD17C、ADAMTSL5、ASTL、BMP1、CELA1、CELA2A、CELA2B、CELA3A、CELA3B、ADAM10、ADAM15、ADAM17、ADAM9、ADAMTS4、CTSE、CTSF、ADAMTSL4、CMA1、CTRB1、CTRC、CTSO、CTRL、CTSA、CTSW、CTSB、CTSC、CTSD、ESP1、CTSG、CTSH、GZMA、GZMB、GZMH、CTSK、GZMM、CTSL、CTSS、CTSV、CTSZ、HTRA4、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14、KLK2、KLK4、DPP4、KLK6、KLK7、KLKB1、ECE1、ECE2、ECE1、MASP2、MEP1A、MEP1B、ELANE、FAP、GZMA、MMP11、GZMK、HGFAC、HPN、HTRA1、MMP11、MMP16、MMP17、MMP19、HTRA2、MMP20、MMP21、HTRA3、HTRA4、KEL、MMP23B、MMP24、MMP25、MMP26、MMP27、MMP28、KLK5、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、LGMN、LNPEP、MASP1、PAPPA、PAPPA2、PCSK1、NAPSA、PCSK5、PCSK6、MME、MMP1、MMP10、PLAT、PLAU、PLG、PRSS1、PRSS12、PRSS2、PRSS21、PRSS3、PRSS33、PRSS4、PRSS55、PRSS57、MMP12、PRSS8、PRSS9、PRTN3、MMP13、MMP14、ST14、TMPRSS10、TMPRSS11A、TMPRSS11D、TMPRSS11E、TMPRSS11F、TMPRSS12、TMPRSS13、MMP15、TMPRSS15、MMP2、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、TMPRSS5、TMPRSS6、TMPRSS7、TMPRSS9、NRDC、OVCH1、PAMR1、PCSK3、PHEX、TINAG、TPSAB1、TPSD1、およびTPSG1からなる群から選択される1つ以上の酵素によって切断される、実施形態63～79のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

81. 切断可能なペプチドが、ADAM17、HTRA1、PRSS1、FAP、GZMK、NAPSA、MMP1、MMP2、MMP9、MMP10、MMP7、MMP12、MMP28、ADAMTS9、HGFAC、およびHTRA3からなる群から選択される1つ以上の酵素によって切断される、実施形態80のマスクされたキメラ受容体。

82. 実施形態1～33、100～112、および139～148のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、実施形態34～62および113～121のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体、または実施形態63～82および122～128のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体をコードする、核酸。

83. 実施形態82の核酸を含む、ベクター。

84. 発現ベクターである、実施形態83のベクター。

85. 実施形態82の核酸を含む、宿主細胞。

86. マスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体を生成する方法であって、マスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体を生成する条件下で、実施形態85の宿主細胞を培養することを含む、方法。

87. 宿主細胞が、アルファ1，6-フコシルトランスフェラーゼ（Fut8）ノックアウトを有する、実施形態86の方法。

88. 宿主細胞が、β1，4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（GnT-III）を過剰発現する、実施形態86または87の方法。

89. 宿主細胞が、さらに、ゴルジμ-マンノシダーゼII（ManII）を過剰発現する、実施形態88の方法。

90. 宿主細胞によって生成されるマスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体を回収することをさらに含む、実施形態86～89のい

10

20

30

40

50

いずれか1つの方法。

91. 実施形態86～90のうちのいずれか1つの方法によって生成される、マスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体。

92. 実施形態1～33、100～112、および139～148のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、実施形態34～62および113～121のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体、または実施形態63～82および122～128のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体を含む、組成物。

93. 実施形態91のマスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体を含む、組成物。

94. 実施形態1～33、100～112、および139～148のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、実施形態34～62および113～121のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体、または実施形態63～82および122～128のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

95. 実施形態91のマスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

96. 実施形態1～33、100～112、および139～148のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、実施形態34～62および113～121のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体、実施形態63～82および122～128のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体、または実施形態92～95のうちのいずれか1つの組成物を含む、キット。

97. 対象において腫瘍性疾患を治療または予防する方法であって、有効量の、実施形態1～33、100～112、および139～148のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、実施形態113～121のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体、実施形態63～82および122～128のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体、または実施形態92～95のうちのいずれか1つの組成物を対象に投与することを含む、方法。

98. 腫瘍性疾患が、癌である、実施形態97の方法。

99. 癌が、白血病、リンパ腫、頭頸部癌、結腸直腸癌、前立腺癌、脾臓癌、黒色腫、乳癌、神経芽細胞腫、肺癌、卵巣癌、骨肉腫、膀胱癌、子宮頸癌、肝臓癌、腎臓癌、皮膚癌、または精巣癌である、実施形態98の方法。

100. a) 軽鎖可変(VL)ドメインおよび重鎖可変(VH)ドメインを含む抗CTL A4抗体またはその抗原結合断片と、

b) 配列番号1～46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドと

を含む、マスクされた抗体であって、

マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、VLドメインまたはVHドメインのアミノ末端またはカルボキシ末端に連結されている、マスクされた抗体。

101. 切断可能なペプチドを含むリンカーが、配列番号47～88、464～469、および479～508からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む切断可能なペプチドを含む、実施形態100のマスクされた抗体。

102. 切断可能なペプチドが、アミノ末端およびカルボキシ末端を含み、切断可能なペプチドを含むリンカーが、第1のスペーサーリンカーおよび第2のスペーサーリンカーを含み、第1のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドのアミノ末端に連結されており、かつ配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、第2のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドのカルボキシ末端に連結されており、かつ配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態100または101のマスクされた抗体。

103. 切断可能なペプチドを含むリンカーが、配列番号454～462からなる群か

10

20

30

40

50

ら選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態100～102のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。

104. マスクされた抗体が、配列番号113～231および444～453からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態100～103のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。

105. 抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が、ヒト化抗体、キメラ抗体、またはヒト抗体である、実施形態100～104のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。

106. a) VLドメインが、(i) 配列番号402のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／またはVHドメインが、(i) 配列番号405のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含み、あるいは

b) VLドメインが、(i) 配列番号408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／またはVHドメインが、(i) 配列番号411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含み、あるいは

c) VLドメインが、(i) 配列番号432のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号433のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号434のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／またはVHドメインが、(i) 配列番号435のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号436のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号437のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含み、あるいは

d) VLドメインが、(i) 配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／またはVHドメインが、(i) 配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、

実施形態100～105のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。

107. a) VLドメインが、配列番号321のアミノ酸配列を含み、かつVHドメインが、配列番号323のアミノ酸配列を含む、または

b) VLドメインが、配列番号322のアミノ酸配列を含み、かつVHドメインが、配列番号324のアミノ酸配列を含む、

実施形態100～106のいずれか1つのマスクされた抗体。

108. VLドメインが、配列番号327～341からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖内に含まれ、かつVHドメインが、配列番号366～380、421、および478からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖内に含まれる、実施形態100～107のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。

109. マスクされた抗体が、配列番号421のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号358および422～431からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態100～108のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。

110. 抗CTLA4抗体またはその抗原結合断片が、薬剤と複合体化されている、実施形態100～109のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。

111. 薬剤が、チューブリン重合の阻害剤、DNA損傷剤、またはDNA合成阻害剤である、実施形態110のマスクされた抗体。

112. 薬剤が、メイタンシノイド、アウリスタチン、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)二量体、カリチアマイシン、デュオカルマイシン、インドリノベンゾジアゼピン二量

10

20

30

40

50

体、またはエキサテカン誘導体D x dである、実施形態110のマスクされた抗体。

113. a) CTLA4に特異的に結合する第1の対の軽鎖および重鎖と、

b) 抗原に特異的に結合する第2の対の軽鎖および重鎖と、

c) 配列番号1～46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドと

を含む、マスクされた二重特異性抗体であって、

マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、第1の対の前記重鎖または前記軽鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端に連結されている、

マスクされた二重特異性抗体。

114. 切断可能なペプチドを含むリンカーが、配列番号47～88、464～469、および479～508からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む切断可能なペプチドを含む、実施形態113のマスクされた二重特異性抗体。

115. 切断可能なペプチドが、アミノ末端およびカルボキシ末端を含み、切断可能なペプチドを含むリンカーが、第1のスペーサーリンカーおよび第2のスペーサーリンカーを含み、第1のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドのアミノ末端に連結されており、かつ配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、第2のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドのカルボキシ末端に連結されており、かつ配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態113または114のマスクされた二重特異性抗体。

116. 切断可能なペプチドを含むリンカーが、配列番号454～462からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態113～115のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体。

117. マスクされた二重特異性抗体が、配列番号113～231および444～453からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態113～116のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体。

118. 第1の対の軽鎖が、VLドメインを含み、第1の対の重鎖が、VHドメインを含み、

a) VLドメインが、(i) 配列番号402のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／またはVHドメインが、(i) 配列番号405のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、あるいは

b) VLドメインが、(i) 配列番号408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／またはVHドメインが、(i) 配列番号411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、あるいは

c) VLドメインが、(i) 配列番号432のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号433のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号434のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／またはVHドメインが、(i) 配列番号435のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号436のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号437のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、あるいは

d) VLドメインが、(i) 配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／またはVHドメインが、(i) 配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H

10

20

30

40

50

3を含む、

実施形態113～117のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体。

119. a) VLドメインが、配列番号321のアミノ酸配列を含み、かつVHドメインが、配列番号323のアミノ酸配列を含む、または

b) VLドメインが、配列番号322のアミノ酸配列を含み、かつVHドメインが、配列番号324のアミノ酸配列を含む、

実施形態113～118のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体。

120. 第1の対の軽鎖が、配列番号327～341からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、第1の対の重鎖が、配列番号366～380、421および478からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態113～119のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体。

121. マスクされた二重特異性抗体が、配列番号421のアミノ酸配列を含み、かつ配列番号358および422～431からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態113～120のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体。

122. a) CTLA4に結合するVLドメインおよびVHドメインを含むリガンド結合ドメインと、

b) 配列番号1～46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むマスキングペプチドと、

c) 膜貫通ドメインと、

d) シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインと

を含む、マスクされたキメラ受容体であって、

マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、VLドメインまたはVHドメインのアミノ末端またはカルボキシ末端に連結されている、マスクされたキメラ受容体。

123. 切断可能なペプチドを含む前記リンカーが、配列番号47～88、464～469、および479～508からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む切断可能なペプチドを含む、実施形態122のマスクされたキメラ受容体。

124. 切断可能なペプチドが、アミノ末端およびカルボキシ末端を含み、切断可能なペプチドを含むリンカーが、第1のスペーサーリンカーおよび第2のスペーサーリンカーを含み、第1のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドのアミノ末端に連結されており、かつ配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、第2のスペーサーリンカーが、切断可能なペプチドのカルボキシ末端に連結されており、かつ配列番号89～112および415～420からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態122または123のマスクされたキメラ受容体。

125. 切断可能なペプチドを含むリンカーが、配列番号454～462からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態122～124のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

126. マスクされたキメラ受容体が、配列番号113～231および444～453からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態122～125のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

127. a) VLドメインが、(i) 配列番号402のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号403のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号404のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／またはVHドメインが、(i) 配列番号405のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号406のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii) 配列番号407のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、あるいは

b) VLドメインが、(i) 配列番号408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii) 配列番号410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／またはVHドメインが、(i) 配列番号411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号412のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

を含むCDR-H2、および(iii)配列番号413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、あるいは

c) VLドメインが、(i)配列番号432のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii)配列番号433のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii)配列番号434のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／またはVHドメインが、(i)配列番号435のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号436のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii)配列番号437のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、あるいは

d) VLドメインが、(i)配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii)配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および(iii)配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含み、かつ／またはVHドメインが、(i)配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および(iii)配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む、

実施形態122～126のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

128. a) VLドメインが、配列番号321のアミノ酸配列を含み、かつVHドメインが、配列番号323のアミノ酸配列を含む、または

b) VLドメインが、配列番号322のアミノ酸配列を含み、かつVHドメインが、配列番号324のアミノ酸配列を含む、

実施形態122～127のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体。

129. 実施形態100～112のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、実施形態113～121のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体、または実施形態122～128のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体をコードする、核酸。

130. 実施形態129の核酸を含む、ベクター。

131. 実施形態129の核酸を含む、宿主細胞。

132. マスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体を生成する方法であって、マスクされた抗体を生成する条件下で、実施形態131の宿主細胞を培養することを含む、方法。

133. 実施形態132の方法によって生成される、マスクされた抗体、マスクされた二重特異性抗体、またはマスクされたキメラ受容体。

134. 実施形態100～112のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、実施形態113～121のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体、または実施形態122～128のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体を含む、組成物。

135. 実施形態100～112のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、実施形態113～121のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体、または実施形態122～128のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

136. 実施形態100～112のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、実施形態113～121のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体、または実施形態122～128のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体を含む、キット。

137. 対象において腫瘍性疾患を治療または予防する方法であって、有効量の、実施形態100～112のうちのいずれか1つのマスクされた抗体、実施形態113～121のうちのいずれか1つのマスクされた二重特異性抗体、または実施形態122～128のうちのいずれか1つのマスクされたキメラ受容体を対象に投与することを含む、方法。

138. 対象において腫瘍性疾患を治療または予防する方法であって、実施形態135の薬学的組成物の有効量を対象に投与することを含む、方法。

139. a) 軽鎖可変(VL)ドメインおよび重鎖可変(VH)ドメインを含む抗CTL A4抗体またはその抗原結合断片と、

b) 配列番号5のアミノ酸配列を含むマスクングペプチドとを含む、マスクされた抗体であって、

10

20

30

40

50

マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、V Lドメインのアミノ末端に連結されており、

切断可能なペプチドを含むリンカーが、配列番号 8 6 のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチドを含み、

(a) V Lドメインが、配列番号 4 0 8 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、配列番号 4 0 9 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および配列番号 4 1 0 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3を含み、V Hドメインが、配列番号 4 1 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、配列番号 4 1 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および配列番号 4 1 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3を含む、または

(b) V Lドメインが、配列番号 4 3 8 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、配列番号 4 3 9 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および配列番号 4 4 0 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3を含み、V Hドメインが、配列番号 4 4 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、配列番号 4 4 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および配列番号 4 4 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3を含む、
マスクされた抗体。

1 4 0 . 切断可能なペプチドを含むリンカーが、配列番号 4 5 4 のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 3 9 のマスクされた抗体。

1 4 1 . V Lドメインが、配列番号 3 2 2 のアミノ酸配列を含み、かつ V Hドメインが、配列番号 3 2 4 のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 3 9 または 1 4 0 のマスクされた抗体。

1 4 2 . V Lドメインが、配列番号 3 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖中に含まれ、V Hドメインが、配列番号 4 2 1 のアミノ酸配列を含む重鎖中に含まれる、実施形態 1 3 9 ~ 1 4 1 のうちのいずれか 1 つのマスクされた抗体。

1 4 3 . マスクされた抗体が、配列番号 3 5 8 のアミノ酸配列、および配列番号 4 2 1 のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 3 9 ~ 1 4 2 のうちのいずれか 1 つのマスクされた抗体。

1 4 4 . a) 軽鎖可変 (V L) ドメインおよび重鎖可変 (V H) ドメインを含む抗 C T L A 4 抗体またはその抗原結合断片と、

b) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含むマスキングペプチドと
を含む、マスクされた抗体であって、

マスキングペプチドが、切断可能なペプチドを含むリンカーを介して、V Lドメインのアミノ末端に連結されており、

切断可能なペプチドを含むリンカーが、配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む切断可能なペプチドを含み、

(a) V Lドメインが、配列番号 4 0 8 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、配列番号 4 0 9 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および配列番号 4 1 0 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3を含み、V Hドメインが、配列番号 4 1 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、配列番号 4 1 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および配列番号 4 1 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3を含む、または

(b) V Lドメインが、配列番号 4 3 8 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、配列番号 4 3 9 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および配列番号 4 4 0 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3を含み、V Hドメインが、配列番号 4 4 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、配列番号 4 4 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および配列番号 4 4 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3を含む、
マスクされた抗体。

1 4 5 . 切断可能なペプチドを含むリンカーが、配列番号 4 5 5 のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 4 4 のマスクされた抗体。

1 4 6 . V Lドメインが、配列番号 3 2 2 のアミノ酸配列を含み、かつ V Hドメインが、配列番号 3 2 4 のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 4 4 または 1 4 5 のマスクされた抗体。

147. VLドメインが、配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖中に含まれ、VHドメインが、配列番号421のアミノ酸配列を含む重鎖中に含まれる、実施形態144～146のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。

148. マスクされた抗体が、配列番号422のアミノ酸配列、および配列番号421のアミノ酸配列を含む、実施形態144～147のうちのいずれか1つのマスクされた抗体。

【実施例】

【0320】

本発明は、以下の実施例を参照することにより、より十分に理解されるであろう。しかしながら、それらは、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に記載される実施例および実施形態は、例示目的のためであり、それを考量したその様々な修飾または変更が当業者に提案され、本出願の趣旨および目的、ならびに添付の特許請求の範囲に含まれるべきであることが理解されるべきである。

【0321】

実施例1：活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体の生成

抗CTLA4抗体である9D9 muIgG2b mAb (9D9 mAb) を、バイオパニング実験のためにBioXcellから購入した。他のすべての実験については、マウスCTLA4に対して反応性である親抗CTLA4抗体 (9D9)、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体 (マスク9D9)、および非切断性のマスクされた抗CTLA4抗体 (非切断性マスク9D9) を、ATUMで生成および精製した。

【0322】

活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体、親抗CTLA4抗体、および非切断性のマスクされた抗CTLA4抗体を、発現プラスミドpD2610-v5 (ATUM、Newark CA) を用いたHEK293-過性発現を使用して生成し、マウスIgG2aアイソタイプを使用した遺伝子合成 (ATUM、Newark CA) によって生成した。トランスフェクションの7日後、トランスフェクト細胞からの上清を採取し、マスクされた抗CTLA4抗体ならびに親抗CTLA4抗体を、KanCapA樹脂 (Kaneka) で精製し、緩衝液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に交換した。次いで、抗体を、Source SまたはCaptos ImpAct (GE) を使用したイオン交換によりさらに精製した。抗体濃度を、分光光度計によってOD280の光学密度で決定した。

【0323】

上述のマスク9D9抗体および非切断性のマスクされた9D9抗体の両方に含まれるマスキングペプチドを、ファージディスプレイペプチドライブラリから立体閉塞ペプチドをバイオパニングすることによって得た。9D9 muIgG2b mAb (BioXcell) を、まず、ProteinG Magnetic Beads (MB) (ThermoFisher Scientific) 上で、室温で30分間捕捉した。9D9 muIgG2b mAbをブロッキングした後、スキムミルクでMBを固定化し、Ph.D. TM-C7Cファージペプチドライブラリ (New England Biolabs) を添加して、立体閉塞ペプチドをスクリーニングした。室温で30分間インキュベーションした後、非結合ファージを勢いよく洗浄し、結合ファージを0.2MグリシンpH2.2でpH中和溶液に溶出した。溶出されたファージを、次のバイオパニングのラウンドのために大腸菌K12 ER2738 (New England Biolabs) に感染させることによって増幅した。その後の3ラウンドのバイオパニングを、アイソタイプ対照 (BioXcell) を使用して追加のラウンドのネガティブソーティングで行い、9D9 mAb CDRの外側のペプチド結合を除去した。9D9 mAbとマウスCTLA4との間の界面に特異的に結合したペプチドの特定および濃縮を達成した。

【0324】

最後のバイオパニングのラウンドの後、濃縮集団からの個々のクローンを、ELISAにより9D9 mAbへの特異的結合について評価した。等モルmuCTLA4-hsIgG (R&D Systems) の存在下または不在下での9D9 mAbを、4℃で一晩

10

20

30

40

50

、96ウェルMaxiSorpプレート(Thermo Fisher Scientific)上にコーティングした。固有のペプチドを示す個々のファージを、スキムミルクでブロッキングされたプレートに三重で添加し、室温で1時間インキュベートした。非結合ファージを激しく洗浄した後、HRP複合体化抗M13抗体(GE Healthcare)およびHRP基質(Sigma-Aldrich)を使用して結合ファージを検出した。405nmでの吸光度を、マイクロプレートリーダー(Synergy HT、BioTek)で測定した。

【0325】

高い9D9結合シグナルを生成し、かつ9D9mAbへのマウスCTLA4の結合を阻害したクローンを選択し、DNAをシーケンシングのために抽出した。ペプチドCNLIVEGHCをコードするファージからの配列を、その後の代表的な実験のために選択した。

【0326】

活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体(マスク9D9)の設計については、ペプチドCNLIVEGHCを含む複合体の9D9 Fabの構造特性を、高分解能(1.8 Å、表3)で決定した。9D9を、37℃で一晩、パパイン樹脂(Sigma)で切断した。Fabを、プロテインA、カチオン交換(HiTrap SP-FF、GE Healthcare)、およびサイズ排除(Superdex S75 GE Healthcare)カラムクロマトグラフィーで精製した。10mMのトリス-HCl pH8.0、25mMのNaCl、1mMのEDTA中の精製されたFabの結晶を、0.2Mのギ酸ナトリウムおよび23%(w/v)のPEG3350を母液としたハンギングドロップ蒸気拡散法を使用して得た。結晶を、氷晶防止剤(35%(w/v)のメソ-エリスリトールと貯蔵溶液との1:1の混合)で採取し、Rigaku RAXIS IV++検出器を用いたRigaku MicroMax007-HF回転陽極回折計でデータを収集した。ネイティブデータを100Kで、1.5418 Åで収集し、XDSを使用して処理し、98.5%の完全なデータセットを1.8 Åまで得た。CCP4スイート内のPhaserおよび検索モデルとしてのトラスツズマブFab(PDB ID:4IOI)の分子置換を使用して、初期相を生成した。Donaldson J. M. et al., PNAS, 110:17456-61, (2013)を参照されたい。Cootでの手動構築の数サイクル、続いてPhenixでの精密化を使用して、最終的なモデルを生成した。データ収集および精密化統計を、表3に列挙する。ソフトウェアPDBePISAを使用して、表4の抗体-ペプチド界面を特徴付けた。CNLIVEGHCペプチドが、9D9抗体の重鎖と軽鎖との間の界面においてCDRLープに結合することが決定された。ペプチド:9D9 Fabの界面は、5つの水素結合(表4)からなり、375 Å²の相互作用表面積をもたらす。9D9 Fabの静電表面表現は、重鎖および軽鎖の抗原結合部位界面において大きな疎水性領域を示した。CNLIVEGHCペプチドの中央のLeu-Ile-Valモチーフは、この界面に埋没している。このモデルは、CNLIVEGHCペプチドのC末端が軽鎖のN末端に向いていることを示した。ペプチドのカルボキシ炭素と軽鎖(残基Asp1)のアミド窒素との間の距離は、20.4 Åである。MMP2/7/9切断部位を含むペプチドを、9D9抗体をペプチドに連結させるために選択した。Turk B. E. et al., Nat Biotech, 19:661-667, (2001)を参照されたい。グリシンおよびセリンアミノ酸を使用して、N末端およびC末端のギャップを架橋した。さらに、MMP2/7/9基質配列を変異させて、マスクされた抗CTLA4抗体の「非切断性の」バージョンを作成した(非切断性マスク9D9)。

【0327】

(表3) X線回折データおよび精密化統計

10

20

30

40

50

空間群	P2 ₁ 2 ₁	
単位格子定数 (Å)	37.0 x 88.5 x 128.7	
結晶化条件のpH	8.5	
タンパク質/ペプチド濃度 (μM)	60/600	
データセット		
波長、Å	1.5418	
分解能範囲	50-1.8	10
固有の反射 (合計)	34911 (188519)	
完全性	98.5 (91.1)	
冗長性	5.4% (4.9%)	
R _{meas}	0.073 (0.35)	
CC(1/2)	99.9 (93.0)	
I/σ	20.83 (5.14)	
NCS コピー	1	
モデルの精密化		
分解能範囲、Å	33-1.88	20
反射数	34,855	
タンパク質原子の数	3,936	
水分子数	561	
モデル内の残基	LC: 1-219, HC: 1-216, 閉塞ペプチド: 1-10	
Rwork/Rfree, %	16.31/20.6	
平均二乗偏差		
結合長、Å	0.009	
結合角	1	
ラマチャンドラプロット		30
最も好ましい領域、%	99.08	
追加の許容領域、%	0.92	
許可されていない領域	0	

【 0 3 2 8 】

(表 4) 立体閉塞ペプチドと 9 D 9 - F a b との間の水素結合

立体閉塞ペプチド	9D9-Fab	距離、Å
ASN 3 [OD1]	LC: TYR 101 [OH]	2.58
ASN 3 [ND2]	LC: GLY 96 [O]	2.96
ASN 3 [ND2]	LC: SER 97 [O]	3.16
LEU 4 [O]	HC: TYR 33 [OH]	3.53
ILE 5 [N]	LC: TYR 101 [OH]	3.78

【 0 3 2 9 】

実施例 2 : マスキングペプチドと抗 C T L A 4 抗体との間の結合親和性の決定

合成 C N L I V E G H C ペプチドの 9 D 9 抗体に対する結合親和性を決定した。

【 0 3 3 0 】

方法

10

20

30

40

50

表面プラズモン共鳴を、37℃でGE Biacore T200機器で行った。9D9抗体およびアイソタイプ対照（参照チャネル）を、100RUの固定化レベルでCM5チップ（GE Healthcare）に結合した。ペプチドを合成し、HBS-EP+ランニング緩衝液（GE Healthcare）に希釈した。結合データを、Biacore評価ソフトウェア、バージョン3.0を使用して分析した。

【0331】

結果

SPRにより決定された合成CNLIVEGHCペプチドの9D9抗体に対する結合親和性は、定常状態モデルを使用して $1.1 \times 10^{-6} \pm 2.3 \times 10^{-6} \text{ M}$ であった（図1）。陰性対照ペプチドは9D9抗体に結合せず、CNLIVEGHCペプチドはアイソタイプ対照抗体に結合しなかった。これらの結果は、ファージライブラリから選択されたペプチドが9D9抗体に特異的であることを確認する。

【0332】

実施例3A：マウスCTLA4に対する活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体のインビトロ特徴付け

方法

マスクされた抗原結合部位の評価

ELISAプレートを、マウスCTLA4-Fc（R&D Systems）でTBS中で一晚コーティングし、次いで、0.05% Tween 20を含むTBSで洗浄し、PBS中1% BSAでブロッキングし、続いて、Tween 20を含むTBSで洗浄した。PBS中の親抗CTLA4抗体およびマスクされた抗CTLA4抗体の希釈物を、TBS Tween 20で洗浄する前に、60分間CTLA4に結合させた。結合を、抗m κ -HRP（Abcam）およびSuper Signal Pico Chemiluminescent Substrateで検出した。親抗CTLA4抗体のEC50に対する切断前マスク抗CTLA4抗体のEC50から、マスクされた比を決定した。

【0333】

プロテアーゼ切断試験

親抗CTLA4抗体およびマスクされた抗CTLA4抗体を、150mMのNaCl、50mMのトリス、pH7.5、10mMのCaCl₂、0.02% NP-40）中で、37℃で一晩、6nMのMMP2（R&D Systems）とともにインキュベートした。抗体希釈物を、上述のELISAにより、および還元SDS-PAGE分析により、「Any Kd Stain-Freeプレキャストポリアクリルアミドゲル」（Bio-Rad）を使用して、マウスCTLA4-Fcへの結合について試験した。

【0334】

結果

活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体は、マウスCTLA4への90倍低い結合を呈した（図2A）。マスクされた抗CTLA4抗体のプロテアーゼ活性化は、親CTLA4抗体と同等のレベルで、マウスCTLA4への抗体の結合を完全に回復させた（図2A）。

【0335】

実施例3B：マウスCTLA4に対する活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体および非切断性のマスクされた抗CTLA4抗体結合のインビトロ特徴付け

方法

低密度抗原結合ELISA

すべてのELISAを、以下の記載と実質的に類似した様式で、または当該技術分野で既知の方法と概して一致した様式で行った。ポリステレン96ウェルマイクロプレート（Thermo Fisher Scientific）を、ウェルあたり3ngのm μ CTLA4 h s Ig Gタンパク質（Abcam）でコーティングし、4℃で一晩保存した。プレートを、TBS（TBS-T）中0.1% Tweenで洗浄し、4℃で2時間、PBS

中1% BSA (Fisher) でブロッキングし、TBS-Tで洗浄した。PBS (PBS-TB) 中0.05% Tween+1% BSA中の試験された抗体の連続希釈物をプレートに添加し、室温で1時間インキュベートした。TBS-Tで洗浄した後、PBS-TB中1:4000に希釈したHRP複合体化ヤギ抗マウスカッパ軽鎖抗体 (Abcam) を、ウェルに塗布し、室温で1時間インキュベートした。プレートをTBS-Tで洗浄し、化学発光HRP基質をプレートに塗布し、発光を分光光度計 (Synergy HT、BioTek) を使用して記録した。GraphPad Prism、バージョン7.02を用いてデータを分析した。

【0336】

マスクされた抗体の酵素活性化

親抗CTLA4抗体、マスクされた抗CTLA4抗体、および非切断性のマスクされた抗CTLA4抗体をそれぞれ、切断緩衝液 (150mMのNaCl、50mMのトリス、pH7.5; 10mMのCaCl₂; 0.02%のNP-40) 中の1μMの溶液に希釈した。1mMのp-アミノフェニル水銀アセテート (AMPA) で1時間、37℃で活性化された組換えMMP2 (R&D Systems) を、各抗体溶液に4nMの最終濃度まで添加し、37℃で一晩インキュベートした。抗体希釈物を、マウスCTLA4 (muCTLA4 h s I g Gタンパク質; Abcam) への結合について、上述の低密度抗原結合ELISAプロトコルにより試験した。

【0337】

結果

活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体および非切断性のマスクされた抗CTLA4抗体は、親抗CTLA4抗体と比較して、それぞれ、マウスCTLA4への約156倍および218倍低い結合を示した (図2B)。3つの実験にわたって測定したとき、親抗CTLA4抗体の平均EC50は、 0.31 ± 0.08 nMであり、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体は、 48.4 ± 7.2 nMであり、非切断性のマスクされた抗CTLA4抗体は、 67.7 ± 16.3 nMであった (図2C)。組換えMMP2で処置した場合、親抗CTLA4抗体と同等の結合は、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体 (平均EC50 = 0.29 ± 0.03 nM、図2C) に回復され、一方で非切断性のマスクされた抗CTLA4抗体による結合は変化しなかった (平均EC50 = 64.3 ± 18.5 nM、図2C)。

【0338】

実施例4A：活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体のインビボ特徴付け方法

インビボでの研究のための活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体の生成

マスクされた抗CTLA4抗体を、発現プラスミドpD2610-v5 (ATUM、Newark CA) を用いたHEK293-過性発現を使用して生成した。トランスフェクションの7日後、トランスフェクト細胞からの上清を採取し、マスクされた抗CTLA4抗体をKanCapA樹脂 (Kaneka) で精製し、続いてSource Sカラム (GE Healthcare) を使用してカチオン交換により精製し、pH5で、0~1MのNaCl勾配で溶出した。次いで、抗体をPBS中に緩衝液交換した。抗体濃度を、分光光度計によってOD280の光学密度で決定し、エンドトキシンレベルを、Charles Riverエンドトキシンキットを使用して決定した。

【0339】

活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体による腫瘍根絶

50~100mm³のMC38腫瘍を有するC57BL/6マウスに、200μgのIgG2a対照 (BioXcel)、マウスCTLA4に反応性の親抗CTLA4抗体 (9D9、IgG2a、配列番号237を含む軽鎖、配列番号319を含む重鎖)、マウスCTLA4に反応性の活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体 (配列番号238を含む軽鎖、配列番号319を含む重鎖)、マウスCTLA4に反応性のマスクされたCTLA4抗体1005 (配列番号240を含む軽鎖、配列番号319を含む重鎖)、またはヒト

10

20

30

40

50

CTLA4およびマウスCTLA4に交差反応性の抗CTLA4抗体1（配列番号327を含む軽鎖、配列番号366を含む重鎖）の単回用量を腹腔内投与した。体重および腫瘍サイズを、隔週で測定した。

【0340】

T細胞集団分析

50~100mm³のMC38腫瘍を有するC57BL/6マウスに、IgG2a対照（BioXcel）、親抗CTLA4抗体（9D9、IgG2a、配列番号237を含む軽鎖、配列番号319を含む重鎖）、マスクされた抗CTLA4抗体2（配列番号238を含む軽鎖、配列番号319を含む重鎖）、マスクされた抗CTLA4抗体1005（配列番号240を含む軽鎖、配列番号319を含む重鎖）、またはヒトCTLA4およびマウスCTLA4と交差反応性の抗CTLA4抗体1（配列番号327を含む軽鎖、配列番号366を含む重鎖）を、1、4、および8日目に3つの200μg用量で投与した。9日目に、マウスを殺し、腫瘍を、gentleMACS（商標）プロトコル「Tumor Dissociation Kit」（Miltenyi）を使用して解離させ、70ミクロンの細胞ストレーナーを通して濾過し、PBS/2.5%のFBS緩衝液中で2回すすぎ、酵素緩衝液を除去した。脾臓細胞は腫瘍浸潤であり、脾臓細胞を、組織をメッシュにわたって穏やかに粉砕することによって解離した。赤血球を、細胞の染色前にACK緩衝液（Thermo Fisher）で溶解した。細胞の染色は、蛍光標識された抗CD45（BioLegend）、抗CD3（BioLegend）、抗CD4（BioLegend）、抗CD8（BD Biosciences）、抗CD25（BioLegend）によるものであった。抗Foxp3（eBioscience）および抗Ki67（eBioscience）で染色する前に、細胞を透過処理した。染色細胞を、生（Life）から購入したLive/Dead Aqua）CD45陽性細胞のCD4+、CD8+、およびCD25 Foxp3+（Treg）細胞の割合、ならびに細胞増殖のマーカであるKi67陽性であったこれら3つの細胞集団の割合について、蛍光活性化細胞選別（FACS）により分析した。

【0341】

結果

IgG2a対照抗体で処置されたマウスの腫瘍体積と比較して、親抗CTLA4抗体（9D9、IgG2a）は、マウスの腫瘍体積を低減した（図3Aおよび3B）。活性化可能なマスク抗CTLA4抗体は、親抗CTLA4抗体（図3B）と比較して、腫瘍体積の低減において同等の有効性を示した（図3C）。TME中の制御性Tリンパ球（Treg）は、免疫抑制にとって重要である。親抗CTLA4抗体（9D9、IgG2a）および活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体2（マスク9D9）の両方が、エフェクター機能を介して腫瘍内の制御性Tリンパ球（Treg）集団を優先的に枯渇させた（図4）。インビボでのT細胞上のCTLA4の遮断は、CD4+およびCD8+T細胞の増殖をもたらす。親抗CTLA4抗体（9D9、IgG2a）または活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体2（マスク9D9）の複数回用量投与後の脾臓におけるT細胞の増殖を、Ki67+%により評価した。マスクされた抗CTLA4抗体は、親抗体（9D9、IgG2a）と比較して、末梢でCD4+細胞（図5A）およびCD8+T細胞（図5B）の低減された増殖を示した。

【0342】

ヒト化マスク抗CTLA4抗体1は、ヒトCTLA4に対するイピリムマブよりも高い親和性を有し（それぞれ、7倍および38倍）、カニクイザルCTLA4およびマウスCTLA4と交差反応性である。ヒト化マスク抗CTLA4抗体1は、親抗CTLA4抗体（図3B）と比較して、腫瘍体積の低減において同等の有効性を示した（図3D）。

【0343】

実施例4B：活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体のインビボ特徴付け

腫瘍成長ならびに腫瘍および末梢における免疫パラメータに対する活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体の影響を、9D9抗体による治療に应答することが以前に示され

た、MC38マウス結腸直腸癌モデルを使用して調査した。Peggs K. S. et al., J Exp Med., 206:1717-1725, (2009) および Selby M. J., et al., Cancer Immunol Res., 1:32-42, (2013) を参照されたい。

【0344】

方法

活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体による腫瘍根絶

8~12週齢の雌のC57BL/6に、 0.5×10^6 個のMC38腫瘍細胞を皮下注射した。平均腫瘍体積が50~100mm³に達したとき、マウスを、同等の平均腫瘍体積の治療群に無作為化した。抗腫瘍有効性を評価するために、PBS中に製剤化された抗体を、 $<250 \mu\text{L}$ の体積で、用量あたり200 μg で、無作為化後1日目に腹腔内(i.p.)投与した。腫瘍体積を週2回決定した。すべてのマウスを個々に監視し、無作為化後1500mm³または45日のいずれかに達したときに殺した。以下に記載されるように、FACS分析によって制御性T細胞(Treg)上の抗体の生物学的機能を評価するために、腫瘍担持マウスを、 $<250 \mu\text{L}$ の体積で、用量あたり200 μg で無作為化後、1、4、および8日目に抗体を腹腔内投与した。対照抗体は、muIgG2a(BioXcell)であった。すべてのマウスを9日目に殺し、FACS分析のために腫瘍および脾臓を採取した。

【0345】

T細胞集団分析

マウス腫瘍試料を、Tumor Dissociation Kit(gentleMACS)により標準プロトコルに従って解離し、70 μm の細胞ストレーナーを通過させた。脾臓試料を、70 μm の細胞ストレーナー中のシリンジの後部で解離した。赤血球をACK緩衝液(Lonza)で溶解した。最終的な細胞懸濁液を洗浄し、 2×10^7 個の細胞/mLで染色緩衝液(PBS pH7.4、2.5%FBS、0.09%NaN₃)に再懸濁した。細胞を、CD45(BioLegend)、CD3(BioLegend)、CD4(BioLegend)、CD8(BD Biosciences)、CD25(BioLegend)、およびLive/Dead Aqua(ThermoFisher)に対する抗体で染色される前に、MuTrustain fcyX(BioLegend)で処理し、Fc受容体をブロックした。細胞内染色については、細胞を固定し、透過処理し、FoxP3(eBioscience)およびKi-67(eBioscience)に対する抗体で染色した。単一色染色およびFMOをゲーティング目的のために実行した。

【0346】

結果

親抗CTLA4抗体(図6C)および活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体(図6D)の投与は、皮下移植されたMC38腫瘍の腫瘍退縮を誘発したが、一方で、腫瘍は、アイソタイプ対照抗体(図6A)または非切断性のマスクされた抗CTLA4抗体(図6B)のいずれかで処置されたマウスにおいて急速に成長した。これらの結果は、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体が、腫瘍微小環境中のマスキングペプチドの効果的な切断および解離と一貫する抗腫瘍活性を保持したことを示す。さらに、活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体の完全な活性は、非切断性のマスクされた抗CTLA4抗体が腫瘍成長を阻害することに失敗したため、プロテアーゼ切断に依存した。これらの結果は、抗CTLA4抗体の局所投与が、マウスにおける腫瘍退縮を効果的に誘発することを示す、以前の観察と一致している。Marabelle, A., et al., JCI, 123:2447-2463, (2013) を参照されたい。

【0347】

活性化可能なマスクされた抗CTLA4抗体投与による腫瘍内および全身免疫活性化を分析した。これまでの研究で、muIgG2a抗CTLA4抗体が、処置されたマウスの脾臓におけるTregの活性化および拡大をもたらす一方で、Fc γ R依存性の様式でT

10

20

30

40

50

r e g細胞を腫瘍内で枯渇させることが確立された。S e l b y M. J. , e t a l. , C a n c e r I m m u n o l R e s. , 1 : 3 2 - 4 2 , (2 0 1 3) を参照された。したがって、マスクされた抗C T L A 4抗体の局所活性および全身活性を評価するために、腫瘍内（図7 A）および脾臓内（図7 B）のT r e gの存在量および増殖状態をそれぞれ評価した。腫瘍および脾臓試料を、抗体の最後の3回の用量の24時間後に収集した。フローサイトメトリー分析により、T r e gが、親抗C T L A 4抗体で処置されたマウスの腫瘍において著しく低減されたことが明らかになった（図7 A）。活性化可能なマスクされた抗C T L A 4抗体は、親抗C T L A 4抗体と同等にT r e gを低減することにおいて効果的であった（図7 A）。対照的に、非切断性のマスクされた抗C T L A 4抗体は、腫瘍内T r e g存在量に対して著しい効果はなかった（図7 A）。これらの結果は、活性化可能なマスクされた抗C T L A 4抗体が、腫瘍関連プロテアーゼの活性に依存する様式で、親抗C T L A 4抗体として腫瘍環境で同等の活性を有することを示す。

10

【0348】

腫瘍組織におけるT r e g細胞に対する効果とは対照的に、親抗C T L A 4抗体は、処置されたマウスの脾臓において増殖する（K i 6 7 + F O X P 3 +）T r e gの顕著な増加を引き起こした（図7 B）。親抗C T L A 4抗体と比較した場合、活性化可能なマスクされた抗C T L A 4抗体は、増殖する脾臓T r e gのわずかな増加をもたらしたが、非切断性のマスクされた抗C T L A 4抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較した場合、T r e g増殖に対する効果はなかった（図7 B）。まとめると、これらの結果は、活性化可能なマスクされた抗C T L A 4抗体の腫瘍活性化が、正常組織における活性の低減を伴う腫瘍環境に主に限定されているという結論を支持する。

20

【0349】

実施例5：ヒトC T L A 4に対する活性化可能なマスクされた抗C T L A 4抗体のインビトロ特徴付け

方法

マスクされた抗原結合部位の評価

E L I S Aプレートを、ヒトC T L A 4 - F c（R & D S y s t e m s）でT B S中で一晚コーティングし、次いで、0.05% Tween 20を含むT B Sで洗浄し、P B S中1% B S Aでブロッキングし、続いて、Tween 20を含むT B Sで洗浄した。P B S中の親抗C T L A 4抗体およびマスクされた抗C T L A 4抗体の希釈物を、T B S Tween 20で洗浄する前に、60分間C T L A 4に結合させた。結合を、抗h u K a p p a - H R P（A b c a m）およびS u p e r S i g n a l P i c o C h e m i l u m i n e s c e n t S u b s t r a t eで検出した。親抗C T L A 4抗体のE C 5 0に対する切断前マスク抗C T L A 4抗体のE C 5 0から、マスクされた比を決定した。

30

【0350】

プロテアーゼ切断試験

親抗C T L A 4抗体およびマスクされた抗C T L A 4抗体を、37℃で一晩、50mMのトリス、pH9、50mMのN a C l、0.01% Tween - 20中6nMの1）マトリプターゼとともにインキュベートした。抗体希釈物を、上述のE L I S Aにより、および還元S D S - P A G E分析により、「A n y K d S t a i n - F r e eプレキャストポリアクリルアミドゲル」（B i o - R a d）を使用して、ヒトC T L A 4への結合について試験した。

40

【0351】

結果

ヒト化マスク抗C T L A 4抗体1は、ヒトC T L A 4への50倍低い結合を呈した（図8）。ヒト化マスク抗C T L A 4抗体1のプロテアーゼ活性化は、親抗C T L A 4抗体と同等のレベルで、ヒトC T L A 4への抗体の結合を完全に回復させた（図8）。

【0352】

実施例6：マスクされた抗体の酵素活性化

マスクされた抗体を、以下に記載されるプロトコルを用いて組換えプロテアーゼを使用

50

して活性化した。

【0353】

マスクされた抗体を、プロテアーゼとともにインキュベーションする前にMMP切断緩衝液に緩衝液交換した。活性化のために、プロテアーゼ（Anaspec、Proseco Bio、およびR&D Systems）を、MMP切断緩衝液（50mMのトリスpH 8.0、150mMのNaCl、10mMのCaCl₂）中で100ng/μLに希釈した。APMA（DMSO中10mM）を、1mMの最終濃度まで添加した。酵素を、37℃で1時間インキュベートした。活性化プロテアーゼを、1：1000の抗体：プロテアーゼの比率（例えば、1μgのMMP対1mgの抗体）でマスクされた抗体に添加したか、または同等の量の緩衝液を陰性対照試料に添加した。試料を、37℃で一晩インキュベ

10

【0354】

インキュベーション後、処理した抗体を、プロテインA樹脂を使用して精製した。簡潔には、150μLのMabSure ProAスラリー（GE Healthcare）を1.7mLのチューブに添加した。スラリーを、mySpin 6遠心分離機で2分間スピンのことにより、1mLのPBSで2回洗浄した。活性化抗体（500μL）をスラリーに添加し、室温で30分間、または4℃で3時間、ロッキングしながらインキュベートした。抗体スラリー混合物を、mySpin 6遠心分離機で2分間スピンし、フロースルーを収集した。樹脂を1mLの1倍PBSで2回洗浄し、洗浄物を回収した。抗体を、少なくとも6回100μLの25mM酢酸ナトリウムpH 3.5を使用して溶出した（6μLの1MトリスpH 8.0を含む新しい1.7mLチューブに）。溶出液の濃度を測定した。

20

【0355】

すべての溶出液および緩衝液交換試料を、PBS中にプールした。プールした試料に500μLのPBSを添加した。試料をフィルターに添加し、3回スピンした。プールした試料を、フィルターの上部に100μLのPBSを添加し、混合して、交換されたタンパク質を除去することによって収集した。精製抗体の濃度を測定した。試料をPBS中で1mg/mLに希釈した。

【0356】

SDS-PAGEを使用して、試料を活性化について分析した。簡潔には、10μLの試料（1mg/mLで）を、10μLのローディング緩衝液と混合し、90℃で10分間沸騰させた。10μLの試料を、15ウェルAny-kDa染色フリーゲル（BioRad）に装填し、200Vで30分間試験した。タンパク質を、BioRad撮像装置を使用して撮像し、移動サイズの変化による完全な活性化を確認した。

30

【0357】

マスクされた抗体の完全な活性化は、切断された抗体の移動サイズの変化によって示された。

【0358】

実施例7：ヒトCTLA4への抗CTLA4抗体結合のインビトロ特徴付け：低密度抗原結合ELISA

40

方法

ポリスチレン96ウェルマイクロプレート（フィッシャー、#07-200-591）を、ウェルあたり1μg/mLのヒトCTLA4-Fc（R&D #7268-CT）でコーティングし、4℃で一晩保存した。プレートを、TBS（TBS-T）中0.05% Tweenで洗浄し、1% BSA（Sigma Aldrich #B4287-25G）でブロッキングし、TBS-Tで洗浄した。抗CTLA4抗体を含む試料の連続希釈を、アッセイ緩衝液（PBS+0.05% Tween+1% BSA）中で作製し、プレートに添加し、室温で1時間、100RPMで軌道振盪した。TBS-Tで洗浄した後、アッセイ緩衝液中で1：8000に希釈された抗ヒトカップ軽鎖 [クローン：SB81a] -HRP（Abcam #ab79115）を、ウェルに塗布し、室温で1時間振盪した。プ

50

レートでTBS-Tで洗浄し、HRP基質（Super Signal Pico Chemiluminescent Substrate、Thermo #37069）をプレートに塗布し、発光を分光光度計（BioTek）を使用して記録した。GraphPad Prismを用いてデータを分析した。

【0359】

試験された抗体は、抗体1および抗体2と称されるヒト化抗CTLA4抗体、ならびにそのバリエーション／形態／バージョンを含む。特定の番号付けスキームに従って、抗体1は、配列番号402のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号403のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号404のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含み、配列番号405のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号406のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号407のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域を含む。抗体1は、配列番号321のアミノ酸配列を含むVLドメイン、および配列番号323のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む。Kabattの番号付けスキームに従って、抗体1は、配列番号432のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号433のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号434のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含み、配列番号435のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号436のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号437のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域を含む。特定の番号付けスキームに従って、抗体2は、配列番号408のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号409のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号410のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含み、配列番号411のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号412のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号413のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域を含む。Kabattの番号付けスキームに従って、抗体2は、配列番号438のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号439のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号440のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含み、配列番号441のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号442のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号443のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域を含む。各々が「抗体1-#」の命名法を有する、抗体1の様々な形態を生成し、各々が「抗体2-#」の命名法を有する、抗体2の様々な形態を生成した。

【0360】

結果

図9Aおよび図9Bは、抗体1および抗体2と称されるヒト化抗CTLA4抗体またはそのバリエーションとの結合研究を示す。図9Aは、野生型Fc領域を有する抗体1のバージョン（抗体1-1）と、ヒトCTLA4-Fcに対するFc領域におけるS239D変異およびI332E変異を有する抗体1のバージョン（抗体1-2）との結合の間の検出可能な差異がないことを示す。抗体1-2は、配列番号327のアミノ酸配列を含むVLドメイン、および配列番号478のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む。図9Bは、野生型Fc領域を有する抗体2のバージョン（抗体2-1）と、Fc領域におけるS239D変異およびI332E変異を有する抗体2のバージョン（抗体2-2）と、Fc領域におけるS239D変異、I332E変異、および2つのヒンジ領域変異を有する抗体2のバージョン（抗体2-3）、Fc領域におけるS239D、I332E、およびA330L変異を有する抗体2のバージョン（抗体2-4）と、Fc領域におけるS239D、I332E、A330L変異、および2つのヒンジ領域変異を有する抗体2のバージョン（抗体2-5）とを含む、抗体2の様々な形態のCTLA4結合を比較する。図9Bに示されるように、全形態の抗体は、ヒトCTLA4-Fcに同様に結合した。試験された抗体の平均EC₅₀値を、以下の表5に提供する。

【0361】

（表5）

10

20

30

40

50

ヒトCTLA4-Fcへの抗体結合		
抗体	EC ₅₀ (nM)	R ²
抗体 1-1	0.32 ± 0.01	0.9984
抗体 1-2	0.32 ± 0.01	0.998
抗体 2-1	0.44 ± 0.02	0.9978
抗体 2-2	0.39 ± 0.01	0.9979
抗体 2-3	0.40 ± 0.02	0.9967
抗体 2-4	0.40 ± 0.02	0.9962
抗体 2-5	0.41 ± 0.02	0.9968

10

【0362】

実施例8：ヒトCTLA4結合に対するプロテアーゼ活性化の影響

20

方法

ヒト化抗CTLA4抗体を、実施例7に記載される低密度抗原結合ELISAで使用した。マスクされた活性化可能な形態のヒト化抗CTLA4抗体の活性化を評価するために、実施例6に概説されるように組換えプロテアーゼを使用した。

【0363】

Fc領域中にS239D変異およびI332E変異を有する抗体2のマスクされていないバージョン（抗体2-6）を、同じ2つの変異を有するが、配列番号19または5のアミノ酸配列を含むマスキングペプチド、ならびにスペーサーリンカーおよび切断可能なペプチドも含む抗体のバージョンと比較するためのマスクされていない対照として使用した。親非マスク抗体2-6は、配列番号324のアミノ酸配列を有する可変重鎖、配列番号322のアミノ酸配列を有する可変軽鎖、配列番号421のアミノ酸配列を有する重鎖、および配列番号334のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む。抗体2-7～抗体2-21のマスクされた抗体は、表6および表9に記載されるように、親非マスク抗体2-6の可変重鎖、可変軽鎖、重鎖、および軽鎖配列を含み、マスキングペプチド、スペーサーリンカー1、切断可能な（または非切断性の）ペプチド、およびスペーサーリンカー2をさらに含む。したがって、抗体2-6、抗体2-7、抗体2-8、抗体2-9、抗体2-10、抗体2-11、抗体2-12、抗体2-13、抗体2-14、抗体2-15、抗体2-16、抗体2-17、抗体2-18、抗体2-19、抗体2-20、および抗体2-21の各々は、配列番号324のアミノ酸配列を含むVHドメイン、配列番号322のアミノ酸配列を含むVLドメイン、配列番号421のアミノ酸配列を含む重鎖、および配列番号334のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。別段の指示がない限り、抗体2-7～抗体2-21と称されるマスクされた抗体は、N末端からC末端方向に、以下の構成要素：1）マスキングペプチド、2）スペーサーリンカー1、3）切断可能なペプチド、4）スペーサーリンカー2、軽鎖のN末端を親非マスク抗体2-6の軽鎖に連結することによってマスクされる。抗体2-10は、陰性対照として使用するための非切断性である切断可能ペプチド配列を含む。抗体2-7～抗体2-13におけるスペーサーリンカーおよび切断可能なペプチドの配列を含む、試験された例示的な抗体の例を、表6に提供する。

30

40

【0364】

（表6）

50

抗体	マスキング ペプチド	スパーサー リンカー1	切断可能な ペプチド	スパーサー リンカー2	重鎖	軽鎖+ マスキング 構成要素
抗体 2-7	CPFPALELC (配列番号 19)	GGSGGS (配列番号 415)	VPLSLY (配列番号 86)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 424
抗体 2-8	CPFPALELC (配列番号 19)	GGPGSSP (配列番号 416)	MPYDLYHP (配列番号 47)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 425
抗体 2-9	CPFPALELC (配列番号 19)	GGSSPP (配列番号 417)	HEQLTV (配列番号 57)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 426
抗体 2-10	CPFPALELC (配列番号 19)	GGSSGGSG (配列番号 96)	GSGGSG (配列番号 414)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 427
抗体 2-11	CPFPALELC (配列番号 19)	SSPSPSGG (配列番号 418)	GGIGQLTA (配列番号 48)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 428
抗体 2-12	CPFPALELC (配列番号 19)	GSPGSP (配列番号 419)	KPILFFRL (配列番号 54)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 431
抗体 2-13	CPFPALELC (配列番号 19)	GGSSPP (配列番号 417)	RAAAVKSP (配列番号 72)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 429

10

20

【0365】

抗体の連続希釈をアッセイ緩衝液中で行い、ヒトCTLA4-Fcでコーティングされた96ウェルマイクロプレートに添加し、室温で1時間振盪した。プレートをTBSTで洗浄し、BSAでブロッキングし、TBSTで再度洗浄した。抗体をプレートに添加し、振盪した。洗浄後、アッセイ緩衝液中の抗ヒトカップ軽鎖（HRPに複合体化された）をウェルに塗布し、室温で振盪した。プレートを、HRP基質を添加する前に再度洗浄した。発光を、分光光度計を使用して記録し、GraphPad Prismを用いてデータを分析した。

30

【0366】

結果

図10Aおよび図10Bは、プロテアーゼの不在下（図10A）または存在下（図10B）での抗体2のマスキングされたバージョンおよびマスキングされていないバージョンを用いた結合研究を示す。図10Aは、プロテアーゼの不在下での、抗体2の様々なバージョンおよびIgG1アイソタイプの結合を示す。マスキングされていない抗体2-6およびIgG1アイソタイプの右側への移動により証明されるように、抗体のより高い濃度が結合を示すために必要である（図10A）。マスキングされた抗体は、マスキングペプチドによって閉塞されるとみなされる。各マスキングされた抗体の閉塞を以下の表7に示し、マスキングされた抗体のEC50を、マスキングされていない親抗体である抗体2-6のEC50で割ることによって計算する。閉塞の量のばらつきは、スパーサーリンカーおよび／または切断可能なペプチドの配列が、マスキングペプチドの抗原結合をブロックする能力に影響することを示す。抗体のEC50および計算された閉塞を、以下の表7に示す。

40

【0367】

(表7)

50

表2. CTLA4への、マスクされた抗体の結合			
抗体	EC ₅₀ ± SE (nM)	R ²	閉塞
抗体 2-6	0.69 ± 0.03	0.9967	
抗体 2-7	33.9 ± 0.7	0.9997	49
抗体 2-8	54.8 ± 1.0	0.9999	79
抗体 2-9	48.9 ± 1.0	0.9998	62
抗体 2-10	29.4 ± 1.5	0.9985	43
抗体 2-11	34.9 ± 0.5	0.9999	51
抗体 2-12	3.3 ± 0.2	0.9962	5
抗体 2-13	14.2 ± 0.2	0.9998	21

【0368】

図10Bは、プロテアーゼの存在下（すなわち、活性化）での、非切断性のリンカーを有する抗体2-10を除く、抗体2の様々なバージョンの結合を示す。マスクされていない親抗体2-6を対照として含み、プロテアーゼに曝露しなかった。プロテアーゼ消化を、実施例6に提供されるプロトコルに従って行った。図10Bに示されるデータは、切断可能なペプチドのタンパク質分解切断が、マスクされていない親抗体である抗体2-6と同等のレベルに抗体の結合を回復させることによって、ヒトCTLA4への抗体の結合を完全にレスキューすることを示す。プロテアーゼの存在によって「活性化された」試験された抗体の結合データおよび活性化データを、以下の表8に提供する。活性化を、以下の式によって計算する：活性化 = 1 - (活性化マスク抗体のEC₅₀ - マスクされていない親抗体である抗体2-6のEC₅₀) / (非活性化マスク抗体のEC₅₀ - 親抗体である抗体2-6のEC₅₀)。

【0369】

(表8)

CTLA4への活性化抗体の結合			
抗体	EC ₅₀ ± SE (nM)	R ²	活性化
抗体 2-6	0.69 ± 0.03	0.9967	
抗体 2-7 (活性化)	0.58 ± 0.02	0.9971	1.00
抗体 2-8 (活性化)	0.67 ± 0.04	0.9951	1.00
抗体 2-9 (活性化)	0.67 ± 0.02	0.9984	1.00
抗体 2-11 (活性化)	0.62 ± 0.03	0.9973	1.00
抗体 2-12 (活性化)	0.62 ± 0.02	0.9962	1.03
抗体 2-13 (活性化)	0.57 ± 0.02	0.9985	1.01

【0370】

実施例9：マスクされた抗CTLA4抗体のプロテアーゼ切断のインビトロ特徴付け：酵素動態、タンパク質切断、およびレーダープロット

例示的なプロテアーゼの存在下で、各々が配列番号5または19のアミノ酸配列、ならびに第1および第2のスペーサーリンカーと切断可能なペプチドを含むマスキングペプチドを含む、抗体2のマスクされた形態を使用して結合研究を行った。抗体2-15は、陰性対照として使用するための非切断性である切断可能ペプチド配列を含む。いくつかの研究では、マスクされていない親抗体である抗体2-6も比較のために試験した。マスキングペプチド、スペーサーリンカー、および切断可能ペプチドの配列を含む、試験された抗体の例を表9に提供する。

【0371】

(表9)

10

20

30

40

50

抗体	マスキング ペプチド	スパーサー リンカー1	切断可能な ペプチド	スパーサー リンカー2	重鎖	軽鎖+ マスキング 構成要素
抗体 2-14	CPGKGLPSC (配列番号 5)	GGGSSGGSG (配列番号 96)	VPLSLY (配列番号 86)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 358
抗体 2-15	CPGKGLPSC (配列番号 5)	GGGSSGGSG (配列番号 96)	GS GGSG (配列番号 414)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 423
抗体 2-16	CPFPALCLC (配列番号 19)	SSGGSGP (配列番号 420)	DSGGFMLT (配列番号 50)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 422
抗体 2-17	CPFPALCLC (配列番号 19)	SSPSPSGG (配列番号 418)	GGIGQLTA (配列番号 48)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 428
抗体 2-18	CPFPALCLC (配列番号 19)	GGPGSSP (配列番号 416)	MPYDLYHP (配列番号 47)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 425
抗体 2-19	CPFPALCLC (配列番号 19)	GGSSPP (配列番号 417)	HEQLTV (配列番号 57)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 426
抗体 2-20	CPFPALCLC (配列番号 19)	GGSSPP (配列番号 417)	RAAAVKSP (配列番号 72)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 429
抗体 2-21	CPFPALCLC (配列番号 19)	GGSSPP (配列番号 417)	TSVLMAAP (配列番号 51)	SGG (配列番号 102)	配列番号 421	配列番号 430

【0372】

切断可能なペプチド配列のプロテアーゼ選択に対するインビトロ感受性の比較を、図1 1A～Hにレーダープロットとして示す。レーダープロット上の各プロテアーゼによる各抗体の活性化を、活性化が0（活性化なし）～1.0（完全活性化）の範囲で示されるレーダープロットを使用して示す。活性化を、以下の式によって計算する：活性化＝1－（活性化マスク抗体のEC50－マスクされていない親抗体である抗体2－6のEC50）／（非活性化マスク抗体のEC50－親抗体である抗体2－6のEC50）。各マスクされた抗体の閉塞を以下の表12に示し、マスクされた抗体のEC50を、マスクされていない親抗体である抗体2－6のEC50で割ることによって計算する。結合を、実施例7および実施例8に提供されるプロトコルに従って実施し、抗体のタンパク質分解処理を、実施例6および実施例8に提供されるプロトコルに従って行った。マスクされた抗CTLA4抗体（1000nM）の溶液を、適切な切断緩衝液中で作製した。2つの抗体試料を、2本の0.5mLのエッペンドルフチューブに等分した。切断緩衝液の作業溶液（表11を参照されたい）を対応する抗体試料に添加し、切断緩衝液を対照（プロテアーゼなし）試料に添加した。

【0373】

（表10）

10

20

30

40

50

プロテアーゼ					
プロテアーゼ	供給源	切断緩衝液 ¹	反応ごとの プロテアーゼ (ng)	作業溶液 (ng/uL)	反応時間 (分)
Adam17	R&D Systems	A	50	5	60
MMP1	Anaspec	B	234	23.4	15
MMP2	R&D Systems	B	8	0.8	15
MMP7	ProspecBio	B	15	1.5	15
MMP9	ProspecBio	B	50	5	15
MMP10	R&D Systems	B	382	38.2	15
MMP14	R&D Systems	C	201	20.1	15
ナプシンA	R&D Systems	B	400	40	300

¹ 切断緩衝液については、表 1 1 を参照されたい。

【 0 3 7 4 】

(表 1 1)

切断緩衝液	
切断緩衝液	緩衝液の化学的性質
A	100 mM NaOAc, 200 mM NaCl, pH 3.5
B	50 mM トリス, 50 mM NaCl, 0.01% Tween-20, pH 9
C	50 mM トリス, 3 mM CaCl ₂ , 1 uM ZnCl ₂ , pH 8.5

【 0 3 7 5 】

様々な切断可能なペプチドの配列を有する抗体のレーダープロットを図 1 1 A ～ G に示す。図 1 1 H は、陰性対照として使用するための非切断性の、切断可能なペプチドを含む抗体 2 - 1 5 が、様々な例示的なプロテアーゼの添加によるその結合において影響を受けなかったことを示す。図 1 1 A は、抗体 2 - 1 4 のレーダープロットを示す。

【 0 3 7 6 】

2 日目 (d 2) 、 4 日目 (d 4) 、 または 7 日目 (d 7) のプロテアーゼ切断の S D S - P A G E 分析を、前述のように、健康なマウスおよび M C 3 8 腫瘍担持マウスで評価し、図 1 1 I ～ 1 1 M に示す。図 1 1 I に示されるように、抗体 2 - 1 4 における切断可能なペプチドの切断を、健康なマウスの血漿で評価した。150 μg の抗体 2 - 1 4 を投与したマウス 1 * (上のパネル) を除いて、各群の健康なマウス 5 匹の群に 200 μg の抗体 2 - 1 4 を投与した。標準をプロテアーゼあり (右のレーン) またはプロテアーゼなし (左のレーン) で処理した。図 1 1 J に示されるように、抗体 2 - 1 6 における切断可能なペプチドの切断を、健康なマウスの血漿で評価した。図 1 1 J で使用された標準は、抗体 2 - 1 8 であった。150 μg の抗体 2 - 1 4 を投与したマウス 4 * を除いて、健康なマウスに 200 μg の抗体 2 - 1 6 を投与した。

【 0 3 7 7 】

図 1 1 K ～ 1 1 M に示されるように、抗体 2 - 1 4 の切断可能なペプチドの切断、抗体 2 - 1 5 の非切断性のペプチド、および抗体 2 - 1 6 の切断可能なペプチドを、M C 3 8 腫瘍担持マウスの血漿で評価した。M C 3 8 腫瘍担持マウスに 200 μg の各抗体を投与した。図 1 1 M において、マウス 2 の 2 日目 (d 2) の試料はエラーであるようであり、

無視すべきである。

【0378】

プロテアーゼの存在下または不在下での、抗体2-6、抗体2-14、および抗体2-15のCTLA4への結合を、図12Aに示し、EC50、閉塞、および活性化を表12に提供する。マスクされていない抗体2-6は、プロテアーゼの存在によって影響を受けない結合を示す(図12A)。マスクされているが非切断性である切断可能なペプチド配列を含む抗体2-15は、プロテアーゼの添加によってレスキューされないプロテアーゼの不在下で、マスクされていない親抗体2-6と比較して、低減された結合親和性を示す(図12A)。マスクされ、かつ切断可能なペプチドを含む抗体2-14は、プロテアーゼの不在下で、101の閉塞値を有する低減された結合親和性を示すが、この低減された結合親和性は、1.0の活性化値で(表12)、プロテアーゼの添加により活性化されたときにレスキューされる(図12A)。プロテアーゼの存在下または不在下での抗体2-6、抗体2-14、および抗体2-15のEC50を、以下の表12に提供する。

【0379】

(表12)

CTLA4への、マスクされた活性化された抗体の結合					
抗体	プロテアーゼ	EC ₅₀ (nM)	R ²	閉塞	活性化
抗体2-6	-	0.39 ± 0.01	0.9979		
抗体2-6	+	0.39 ± 0.01	0.9981	1.0	
抗体2-14	-	39.4 ± 1.8	0.9989	101	
抗体2-14	+	0.41 ± 0.01	0.9982	1.1	1.00
抗体2-15	-	24.3 ± 0.5	0.9997	62	
抗体2-15	+	17.3 ± 0.7	0.9982	44	0.29

【0380】

プロテアーゼの存在下または不在下での、抗体2-6、抗体2-7、および抗体2-10のCTLA4への結合を、図12Bに示し、EC50、閉塞、および活性化を表13に提供する。抗体2-10は、陰性対照として使用するための非切断性である切断可能ペプチド配列を含む。マスクされ、かつ切断可能なペプチドを含む抗体2-7は、プロテアーゼの不在下での閉塞値49、およびプロテアーゼを使用した活性化時に1.0の活性化値を示す(図12B、表13)。プロテアーゼの不在下で、マスクされた抗体2-7は、マスクされた抗体2-10と類似の結合を示し、プロテアーゼの添加による活性化時に、抗体2-7は、マスクされていない親抗体2-6と類似の結合を示す。抗体2-6、抗体2-7、および抗体2-10のEC50を、以下の表13に提供する。

【0381】

(表13)

CTLA4への、マスクされた活性化された抗体の結合					
抗体	プロテアーゼ	EC ₅₀ (nM)	R ²	閉塞	活性化
抗体2-6	-	0.69	0.9967		
抗体2-7	-	33.9	0.9997	49	
抗体2-7	+	0.58	0.9971	0.8	1.00
抗体2-10	-	29.4	0.9985	43	

【0382】

図12A、図12B、表12、および表13に示されるデータは、抗体2-7(配列番号19)および抗体2-14(配列番号5)に含まれる例示的なマスキングペプチドが各々、可逆的な様式で結合活性をマスキングすることができることを示す。

【0383】

実施例 10：エンテロトキシン分析**方法****S E B アッセイ**

ブドウ球菌エンテロトキシン B (S E B) アッセイを使用して、末梢血単核細胞 (P B M C) からの I L - 2 生成を促進する様々な抗体の能力を調べた。S E B アッセイについては、選択された抗体の希釈物を、予め加温された培地 (R P M I + 10% 熱不活化 F B S + 1% H E P E S + 1% M E M N E A A + 1% N a - ピルビン酸塩) 中で調製した。抗体溶液を三重に播種し、培地のみを「P B M C + S E B」ウェル、「P B M C のみ」のウェル、および外縁壁に添加した。S E B 溶液を予め加温した培地中で調製し、「P B M C のみ」を除くすべての実験ウェルに添加した。P B M C (B i o I V T) を、37℃の水浴中で解凍した。細胞をコニカルチューブに滴加で移し、20 倍の予め加温した培地を添加して細胞を洗浄した。細胞を遠心分離し、培地を吸引した。細胞を、20 mL の予め加温した培地中に再懸濁し、アリコートで計数のために採取した。残りの細胞を遠心分離し、大量に再懸濁して、細胞を 1×10^6 個の細胞/mL にした。細胞をウェルあたり 100 μ L で播種し、プレートを 37℃、5% C O ₂ インキュベーターで 5 日間インキュベートした。5 日目に、プレートを 1000 RPM で 5 分間スピンした。各ウェルから、250 μ L の細胞を新しい 96 ウェルプレートに移した。プレートを再びスピンし、225 μ L の細胞を P C R ストリップに移した。試料を、E L I S A により分析されるまで -80℃で保存した。

【0384】

I L - 2 E L I S A

上述のプロトコルを使用して生成された細胞上清の I L - 2 レベルを、ヒト I L - 2 E L I S A M A X D e l u x e セット (B i o L e g e n d、カタログ番号 # 431806) を用いた分析によって決定した。細胞上清試料をアッセイ緩衝液で希釈して、標準曲線内に収まった。G r a p h P a d P r i s m を使用して、およびテューキーの多重比較検定 (一元配置分散分析) を用いて試料を分析して、治療群間の統計的有意性を決定した。

【0385】

結果

抗体 1 および抗体 2 の様々な形態を、S E B アッセイで試験した。実施例 7 に記載される、抗体 1 - 1 もしくは抗体 1 - 2 の存在下で生成された、または抗体なしの I L - 2 のレベルを示すデータを、図 13 A に示す。実施例 7 に記載される、抗体 2 - 1、抗体 2 - 2、抗体 2 - 3、抗体 2 - 4、および抗体 2 - 5 の存在下で生成された、または抗体なしの I L - 2 のレベルを示すデータを、図 13 C に示す。すべての試験された抗体は、非抗体対照と比較して I L - 2 レベルを増加させる能力を示した。各抗体に対する抗体なし対照を上回る I L - 2 レベルの増倍を、アイソタイプ対照との比較とともに、図 13 B および図 13 に示す。

【0386】

実施例 11：マスクされたおよび活性化された抗 C T L A 4 抗体の免疫機能

実施例 10 のプロトコルに従った S E B アッセイを実施して、抗体 2 の様々な形態を用いた処理に応答して I L - 2 生成を試験した。アッセイを、対照として抗体の不在下 (すなわち、抗体なし)、またはアイソタイプ対照抗体の不在下で実行した。マスクされていない親抗体である抗体 2 - 6 も比較のために試験した。

【0387】

図 14 A および 14 B に示されるように、強力な I L - 2 生成を促進するマスクされていない抗体 2 - 6 とは対照的に、抗体 2 のマスクされた形態は、I L - 2 生成を促進するのに概して効果的ではなかった。図 14 B に示されるように、抗体 2 - 12 は、アイソタイプ対照と比較して I L - 2 生成の有意な増加をもたらした唯一のマスクされた抗体であったが、この増加は、マスクされていない抗体 2 - 6 の親抗体を使用した場合に観察された増加よりもはるかに少ないものであった。対照的に、抗体 2 - 7、抗体 2 - 8、抗体 2

ー 9、抗体 2-10、抗体 2-11、および抗体 2-13 は各々、アイソタイプ対照と比較して、IL-2 生成の有意な増加を促進しなかった（図 14B）。一元配置分散分析比較を使用して統計分析を行った。

【0388】

図 14C および 14D は、IL-2 生成を促進する抗体 2-7、抗体 2-8、抗体 2-9、および抗体 2-10 の能力に対する、実施例 6 のプロトコルに従って実施されたプロテアーゼ処理の影響を示す。抗体 2-10 は、陰性対照として使用するための非切断性である切断可能ペプチド配列を含む。マスクされていない親抗体 2-6 を陽性対照として試験し、アイソタイプ対照抗体および抗体なし対照を陰性対照として試験した。抗体 2-6 に対する一元配置分散分析比較を使用して、図 14D に示される統計分析を行った。

【0389】

図 14C に示される結果は、プロテアーゼによる処理が、マスクされていない親抗体 2-6 と類似のレベルで IL-2 の生成を促進する抗体 2-7、抗体 2-8、および抗体 2-9 の能力をレスキューすることを示す。図 14B に示されるグラフは、抗体なし対照を上回る IL-2 生成の倍増を比較する。マスクされているがプロテアーゼにより活性化可能ではない抗体 2-10 による処置は、アイソタイプ対照と、類似のレベルの IL-2 生成、および抗体なし対照を上回る類似の変化倍率をもたらした（図 14C および図 14D）。

【0390】

実施例 12：マスクされた抗 CTLA4 抗体のインビボ切断

方法

健康なマウスの血漿中のマスクされた抗 CTLA4 抗体のインビボ切断

健康な 7～8 週齢の雌の非腫瘍担持 C57BL/6J マウスに、200 μg のマスクされた形態の抗体 2 を 0 日目に腹腔内注射した。2 日目および 4 日目に、RO 洞を介して血液を採取し、血漿単離のために LiHep で処理した。7 日目に、心臓穿刺を介して血液を採取し、血漿単離のために LiHep で処理した。血漿を等分し、ウェスタンブロット分析まで -80℃ で保存した。インビトロでプロテアーゼの存在下または不在下でマスクされた抗体を処置した標準試料を、陽性対照として含めた。ウェスタンブロット分析については、血漿試料を PBS 中で希釈し、次いで、Laemmli Sample Buffer および βME 中で希釈した。試料を 95℃ で加熱し、次いで、Criterion TGX Stain-Free Precast ゲルに装填した。SDS-PAGE を、200V で 42 分間行った。タンパク質をニトロセルロース膜に移し、1% Casein Blocker を用いて 1 倍 TBS 中で、室温で 1 時間振盪しながらブロッキングした。膜を、ヒトカップ軽鎖 [クローン EPR5367-8] に対して HRP 複合体化 Rb mAb でプローブし、4℃ で一晩振盪しながら Casein Blocker 中に 1:10,000 で希釈した。膜を PBS-Tween で 3 回洗浄し、SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate で現像した。生データを ImageLab ソフトウェアで分析した。活性化割合を以下のように計算した：活性化バンドの強度 / (活性化バンドの強度 + マスクされた非活性化バンドの強度) × 100%。

【0391】

インビボ実験を 2 週間にわたって 2 つのコホートで行い、抗体 2-14 を両コホートに含めた。試験された抗体には、抗体 2-14、抗体 2-15、抗体 2-16、抗体 2-17、抗体 2-18、抗体 2-19、抗体 2-20、および抗体 2-21 が含まれる。抗体 2-15 は、陰性対照として使用するための非切断性である切断可能ペプチド配列を含む。

【0392】

結果

抗体 2-14（図 15A）および抗体 2-20（図 15C）の両方をインビボで活性化した。抗体 2-19 の活性化は、インビボで検出されなかった（図 15B）。インビボでの活性化は、抗体 2-16、抗体 2-17、抗体 2-18、および抗体 2-21（データ

には示さず)についても検出されず、陰性対照抗体2-15についても検出されなかった。2日目から7日目までの活性化の割合の増加を、抗体2-14および抗体2-20について図15Dに示す。

【0393】

実施例13：腫瘍担持マウスの血漿中のマスクされた抗CTLA4抗体のインビボ切断

MC38細胞(1×10^6 個)を、7~8週齢の雌のC57BL/6Jマウスに皮下注射した。0日目に、腫瘍体積測定値に基づいてマウスを無作為化し、200 μ gの抗体2構築物を腹腔内注射した。2日目および4日目に、RO洞を介して血液を採取し、血漿単離のためにLiHepで処理した。7日目に、心臓穿刺を介して血液を採取し、血漿単離のためにLiHepで処理した。血漿を等分し、ウェスタンブロット分析まで-80℃で保存した。インビトロでプロテアーゼの存在下または不在下でマスクされた抗体を処置した標準試料を、陽性対照として含めた。ウェスタンブロット分析については、血漿試料をPBS中で希釈し、次いで、Laemmli Sample Bufferおよび β ME中で希釈した。試料を95℃で加熱し、次いで、Criterion TGX Stain-Free Precastゲルに装填した。SDS-PAGEを、200Vで42分間行った。タンパク質をニトロセルロース膜に移し、1% Casein Blockerを用いて1倍TBS中で、室温で1時間振盪しながらブロッキングした。膜を、ヒトカップ軽鎖[クローン EPR5367-8]に対してHRP複合体化Rb mAbでプローブし、4℃で一晩振盪しながらCasein Blocker中に1:10,000で希釈した。膜をPBS-Tweenで3回洗浄し、SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrateで現像した。生データをImage Labソフトウェアで分析した。

【0394】

インビボ実験を2週間にわたって2つのコホートで行い、抗体2-14を両コホートに含めた。試験された抗体には、抗体2-14、抗体2-15、抗体2-16、抗体2-17、抗体2-18、抗体2-19、抗体2-20、および抗体2-21が含まれる。抗体2-15は、陰性対照として使用するための非切断性である切断可能ペプチド配列を含む。

【0395】

別のセットの実験では、MC38細胞(1×10^6 個)をマウスモデルに皮下注射し、ヒトCTLA4でノックインした。MC38腫瘍担持マウスに、200 μ gの試験抗体(例えば、IgG対照、抗体2-1、抗体2-10、イピリムマブ、または非フコシル化形態のイピリムマブ(イピリムマブ-aFuc))の単回注射を投与し、免疫表現型検査を、注射の5日後にCD45+脾臓細胞およびCD45+腫瘍内細胞上で行った。いくつかの研究では、20 μ g、7 μ g、または2 μ gの試験抗体の単回注射後に、経時的な腫瘍体積を測定した。特定されたマーカーを有するCD45+細胞の相対割合でCD3+/ICOS+、CD3+T細胞、CD4+/Ki67+、CD3+/Ki67+、CD4+/ICOS+、CD4+T細胞、CD8+/ICOS+、CD8+T細胞、Treg+/ICOS+、CD8+/Ki67+、Treg、Treg+/Ki67+に対して選択性のものを含む、CD45+細胞をマーカーについて評価した。

【0396】

結果

抗体2-14および抗体2-20は、MC38担持マウスにおいてインビボで活性化された(図16Aおよび16C)。抗体2-19の活性化は、インビボで検出されなかった(図16B)。活性化は、抗体2-16、抗体2-17、抗体2-18、および抗体2-21(データには示さず)についても検出されず、陰性対照抗体2-15についても検出されなかった。抗体2-14の活性化率は、二元配置分散分析(調整されたP値=0.0113)によって決定された場合に、健康な非腫瘍担持マウスと比較して、MC38担持マウスで有意に大きかった(図16D)。

【0397】

MC38腫瘍担持マウスを使用した研究の結果を、図19A~19Dに示し、CD45

+脾臓（図19Aおよび19B）またはCD45+腫瘍内（図19Cおよび19D）の相対割合を、CD3+／ICOS+、CD3+T細胞、CD4+／Ki67+、CD3+／Ki67+、CD4+／ICOS+、CD4+T細胞、CD8+／ICOS+、CD8+T細胞、Treg+／ICOS+、CD8+／Ki67+、Treg、Treg+／Ki67+に対して選択性のマーカーのために提供する。統計を図19E（脾臓細胞）および19F（腫瘍内細胞）に提供する。群1：IgG、群2：抗体2-1、群3：抗体2-10、群4：イピリムマブ、群5：イピリムマブ-aFuc。

【0398】

20μg、7μg、または2μgの試験抗体の単回注射を受けたMC38腫瘍担持マウスを使用した研究の結果を、図20Aおよび20Bに示す。図20Aは、抗体2-6、抗体2-10、ならびにFcドメインにおけるS239DおよびI332E変異を有するRSV抗体（RSV-m）の経時的な腫瘍体積（mm³）を示す。図20Aに示されるように、腫瘍成長は、マスクされているが非切断性の抗体2-10と比較して、マスクされていない親抗体2-6によって抑制される。図20Bは、経時的な腫瘍体積に対する腫瘍平均を示し、これは、抗体2-10またはRSV-m対照と比較して、抗体2-6の投与後の腫瘍成長がより遅いことを示す。

【0399】

実施例14：抗CTLA4抗体によるADCC活性およびCTLA4遮断方法

レポーターバイオアッセイ

FcRIIIaレポーターバイオアッセイを、様々な抗CTLA4抗体を使用して行った。γ抗体を、予め加温した完全培地（RPMI1640を有するFBS）中で希釈した。CTLA4エフェクター細胞（標的細胞：Promega J158A）を解凍し、完全培地を含むコニカルチューブに移した。細胞を混合および計数し、細胞の密度を1×10⁶個の細胞/mLに調整した。標的細胞を、96ウェルプレート（Corning、カタログ番号#3917）の各ウェルに添加した。希釈された抗体を適切なウェルに添加し、二重で試験した。各ウェルの内容物を穏やかに混合し、プレートを37℃で15分間インキュベートした。エフェクター細胞（Jurkat細胞を発現するFcγRIIIa）を解凍し、完全培地を含むコニカルチューブに移した。細胞を混合および計数し、細胞の密度を3×10⁶個の細胞/mLに調整した。直ちに、エフェクター細胞を各ウェルに分注し、穏やかに混合した。プレートを蓋で覆い、37℃で6時間維持した。測定の前1時間前に、Bio-Glo基質およびBio-Glo緩衝液を4℃から除去した。Bio-Glo緩衝液をBio-Glo基質のボトルに移して、Bio-Glo試薬を作製し、反転により穏やかに混合した。ボトルを室温で維持した。インキュベーション後、アッセイプレートをインキュベーターから取り出し、室温で10分間維持した。Bio-Glo試薬を各ウェルに添加し、プレートを室温で5～15分間インキュベートした。次いで、プレートをルミノメーターで読み取った。

【0400】

試験された抗体は、抗体2-6、抗体2-14、および抗体2-15、ならびにアイソタイプ対照を含む。抗体2-6は、抗体2-14および抗体2-15に対するマスクされていない親抗体である。抗体2-15は、陰性対照として使用するための非切断性である切断可能ペプチド配列を含む。抗体2-6、抗体2-14、および抗体2-15を各々、以前のプロテアーゼへの曝露なしで試験し、また切断可能なペプチドの切断による活性化を可能にするプロテアーゼへの曝露後に試験した。各抗体の閉塞を、抗体のEC50を、マスクされていない親抗体である抗体2-6のEC50で割ることによって計算する。

【0401】

結果

マスクされていない親抗体2-6は、プロテアーゼの存在下および不在下で、レポーター活性化の同様の曲線を示した（図17）。以前のプロテアーゼへの曝露を有することなく試験した場合、マスクされた抗体である抗体2-14および抗体2-15は、マスクさ

れていない親抗体 2-6 と比較して、低減されたレポーター活性化を示した（図 17）。プロテアーゼによって非活性化可能な抗体 2-15 のレポーター活性化は、以前のプロテアーゼの添加によってレスキューされなかった（すなわち、マスクされていない親抗体 2-6 に関連するものに似ている活性化レベルに戻らなかった）（図 17）。プロテアーゼによって活性化可能な抗体 2-14 のレポーター活性化は、マスクされていない親抗体 2-6 に関連するものに似ているレベルにレスキューされた（図 17）。試験された抗体の EC50 値および閉塞値を、表 14 に提供する。

【0402】

（表 14）

抗体	プロテアーゼ	EC ₅₀ (ng/mL) ± SE	R ²	閉塞
抗体 2-6	-	$8.0 \times 10^{-3} \pm 1.8 \times 10^{-3}$	0.927	
抗体 2-6	+	$4.9 \times 10^{-3} \pm 1.3 \times 10^{-3}$	0.8759	0.6
抗体 2-14	-	33 ± 6	0.9906	4,125
抗体 2-14	+	$2.8 \times 10^{-3} \pm 0.5 \times 10^{-3}$	0.8953	0.4
抗体 2-15	-	19 ± 2	0.9942	2,375
抗体 2-15	+	10 ± 2	0.9722	1,250

【0403】

CTLA4 遮断バイオアッセイ

マスクされた抗 CTLA4 抗体を含む抗 CTLA4 抗体の、CTLA4 とそのリガンドである CD80 および CD86 との相互作用をブロックする能力を、CTLA4 遮断バイオアッセイを使用して試験した。抗体を、予め加温した完全培地中で希釈した。CTLA4 発現 Jurkat 細胞（エフェクター細胞）を解凍し、完全培地を含むコニカルチューブに移した。細胞を混合および計数した。細胞を、96 ウェルプレート（Corning、#3917）の各ウェルに添加した。希釈された抗体を適切なウェルに添加し、二重で試験した。プレートを穏やかに混合し、37℃で15分間インキュベートした。APC細胞（Raji 細胞を発現する CD80 / CD86）を解凍し、完全培地を含むコニカルチューブに移した。細胞を穏やかに混合および計数し、直ちに各ウェルに分注し、穏やかに混合した。プレートを覆い、37℃で6時間維持した。Bio-Glo 試薬を反転により穏やかに混合し、ボトルを室温で維持した。6時間のインキュベーション後、アッセイプレートをインキュベーターから取り出し、室温で10分間維持した。Bio-Glo 試薬をウェルに添加し、プレートを室温で5～15分間インキュベートした。次いで、プレートをルミノメーターで読み取り、GraphPad Prismを用いて分析した。結合をブロックする能力の変化倍率の統計分析を、一元配置分散分析比較を使用して行った。

【0404】

試験された抗体には、抗体 2-2 および抗体 2-14、ならびにアイソタイプ対照が含まれる。抗体 2-2 は、抗体 2 のマスクされていない形態である。抗体 2-14 を、以前のプロテアーゼへの曝露なし（すなわち、マスクされた非活性化形態で）試験し、またプロテアーゼへの曝露後に（すなわち、活性化形態で）試験した。アッセイをまた、抗体を使わずに（すなわち、抗体なし対照）実行した。

【0405】

結果

図 18A に示されるように、抗体 2-14 は、プロテアーゼの不在により非活性化形態にある場合、CTLA4 のそのリガンドへの結合を効果的にブロックする能力を示さなかった。抗体なし対照を上回る変化倍率の分析は、非活性化形態にある場合の抗体 2-14 の能力と、CTLA4 のそのリガンドへの結合をブロックするアイソタイプ対照の能力との間に有意差がないことを明らかにした（図 18B）。しかしながら、抗体 2-14 が以前のプロテアーゼへの曝露のために活性化形態にある場合、それは、ある範囲の濃度にわたって CTLA4 のそのリガンドへの結合を効果的に遮断する能力を示した（図 18A）

。そのリガンドへのCTLA4結合を遮断する活性化された抗体2-14の能力は、マスクされていない抗体2-2のものと類似していた（図18Aおよび18B）。実際、抗体対照なしを上回る変化倍率の分析は、そのリガンドへのCTLA4結合を遮断する活性化された抗体2-14とマスクされていない抗体2-2の能力の間に有意差を示さなかった（図18B）。

【0406】

実施例15：MB49マウス膀胱腫瘍モデルにおける抗CTLA4抗体の有効性および薬力学

方法

抗CTLA4抗体の有効性および薬力学（PD）を、MB49マウス膀胱腫瘍モデルを使用して評価した。各試験抗体（RSV-m対照抗体、イピリムマブ、抗体2-6、抗体2-14、および抗体2-15）を投与し、次いで、腫瘍体積および体重を評価することによって有効性を評価した。抗RSV対照抗体は、S239DおよびI332E変異（RSV-m対照抗体）を含む。末梢免疫表現型検査も5日目に実施し、投与後5日目の末梢血液中のCD4+Ki67+細胞の割合およびCD4+ICOS+細胞の割合を評価した。有効性試験について、表15に示されるように、mg/kg単位での用量を用いて、マウスの14コホートを評価した。本明細書で使用される場合、mg/kg単位での用量はまた、「mpk」とも称される。MB49細胞を、C57/BL6-huCTLA4マウスに皮下接種した。治療は、腫瘍が約350mm³に達したときに開始した。ダネットの事後検定を用いた一元配置分散分析を行い、処置対対照（RSV-m対照）の統計的有意性を決定した。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、****P<0.0001。

【0407】

（表15）

コホート	抗体	用量 (mg/kg)
1	RSV-m 対照	10
2	イピリムマブ	0.3
3	イピリムマブ	1
4	イピリムマブ	3
5	抗体 2-6	0.3
6	抗体 2-6	1
7	抗体 2-6	3
8	抗体 2-6	10
9	抗体 2-14	1
10	抗体 2-14	3
11	抗体 2-14	10
12	抗体 2-15	1
13	抗体 2-15	3
14	抗体 2-15	10

【0408】

薬力学は、表16に示される用量（mg/kg）を用いて、マウスの5つのコホートの各々に抗体を投与することによって評価した。腫瘍、肝臓、脾臓、および血液において、他のリードアウトの中でも特に免疫表現型検査を行う。Foxp3+CD25+細胞を、CD4+細胞のうちの割合として測定することによってT細胞を評価し、CD8+細胞を、CD45+細胞のうちの割合として測定する。腫瘍、肝臓、腎臓、脾臓、および血漿における切断および薬物レベルも評価される。

【0409】

（表16）

10

20

30

40

50

コホート	抗体	用量 (mg/kg)
1	RSV-m 対照	10
2	イピリムマブ	3
3	抗体 2-6	3
4	抗体 2-14	3
5	抗体 2-15	3

【0410】

結果

図23Aは、投与後5日目の末梢血液中のCD4+Ki67+細胞（左）およびCD4+ICOS+細胞（右）の割合に関する有効性研究の結果を示し、これはT細胞活性化のレベルを表す。結果は、マスクされた抗CTLA4抗体である抗体2-14が、3mg/kgの3.3倍低い用量で呈された抗CTLA4抗体イピリムマブよりも10mg/kgの用量でより低いT細胞活性化を呈したことを示す。これは、マスクされた抗体2-14が、MB49マウスモデルにおいてイピリムマブよりも安全であることを示す。

10

【0411】

図23Bに示されるように、腫瘍重量およびCD8/Treg比を、10mg/kg（RSV-m対照）または3mg/kg（イピリムマブ、抗体2-6、抗体2-14、抗体2-15）で処置されたマウスにおいて、7日目に評価した。抗体2-6または抗体2-14で処置されたマウスは、7日目に3mg/kgの腫瘍において、最も低い腫瘍重量および最も高いCD8/Treg比を呈した。いずれの療法においても、体重、脾臓重量、腎臓重量、または肝臓重量の変化は観察されなかった（データには示さず）。

20

【0412】

図23Cに示されるように、制御性T細胞枯渇およびCD8+T細胞活性化は、抗体2-14では観察されるが、イピリムマブでは観察されない。

【0413】

図23Dに示されるように、抗CTLA4抗体を用いた処置後に強力な抗腫瘍活性が観察された。0.3mg/kg用量で、抗体2-6は、イピリムマブと比較して優れた抗腫瘍活性を示した。

【0414】

実施例16：腫瘍、肝臓、腎臓、脾臓、および血漿における抗CTLA4抗体のインビボ切断検出

30

方法

B-hCTLA-4トランスジェニック雌マウスを、Biocytogenから購入し、研究開始時に8～10週齢であった。MC38結腸直腸腫瘍細胞（マウスあたり 5×10^5 個の細胞）、MB49膀胱癌細胞（マウスあたり 1×10^6 個の細胞）、またはMC205線維肉腫細胞（マウスあたり 1×10^6 個の細胞）を、各マウスの右脇腹に皮下投与した。約250～500mm³のサイズの腫瘍に到達した後（0日目）、マウスは、10mg/kgの単回腹腔内用量の示された抗体を受けた。ウェスタンブロットによる切断の分析のために、4日目に腫瘍、肝臓、腎臓、脾臓、および血漿を採取した。

40

【0415】

血漿試料については、勾配基準プレキャストゲル（BioRad）上で同等の体積の変性血漿（1～2μLのインプット）を分離することによって、直接的なウェスタンブロットアプローチを利用する。次いで、分離されたタンパク質を、Turbo Transblotシステム（BioRad）を使用してニトロセルロース膜に移した。次いで、HRP複合体化抗体（ab202549）との抗ヒトカップ軽鎖反応性に対する標準的な方法を使用して、膜を現像した。切断された軽鎖が、2kDの質量差を有する切断されていない軽鎖よりも低い位置に移動するため、切断を視覚的に評価する。

【0416】

プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤（Thermo Fisher、78442

50

）を補充したRIPA緩衝液（Pierce、87788）中のTissue Lyser II（Qiagen）ビーズホモジナイザーを使用して、腫瘍、肝臓、脾臓、および腎臓からのタンパク質溶解物を生成した。タンパク質濃度をBCAアッセイにより決定し、3mgの組織溶解物を、ビオチン複合体化抗ヒトカップ軽鎖抗体（LSBio、LS-C351451-500）およびストレプトアビジン磁気ビーズ（Pierce、88816）を用いて免疫沈降を行った。タンパク質を、50μmLの10mMグリシン（pH2）で溶出し、1Mトリス（pH8）で中和した後、上述のようにヒトカップ軽鎖のウェスタンブロット検出を行った。

【0417】

別の研究では、健康なサル（カニクイザル）組織（N=2）および血漿（N=3）のエクスピボ切断を、CTLA4 ELISAアッセイを使用して評価した。試験された組織には、腎臓、脾臓、肝臓、膀胱、皮膚、結腸、および肺が含まれた。

10

【0418】

別の研究では、投与の1時間後、1日後、および7日後に、健康なカニクイザルの血漿中でインビボ切断を評価した。切断を、キャピラリー電気泳動（CE）によって、および質量分析（MS）によって特定した。抗体2-14内の予期される切断部位（VPLS* *LY）における切断生成物の存在量を計算した。別の部位（VPLSLY* *SGG）での切断も比較のために計算した。抗体2-16の切断の存在量も計算した。

【0419】

別の研究では、マウスの腫瘍、組織、および血漿におけるエクスピボ切断を、CTLA4 ELISAアッセイを使用して評価した。これには、以下のマウスモデルが含まれた：C57/B16（N=9）、野生型マウスのMC38（N=9）、hCTLA4マウスのMC38（N=5）、野生型マウスのMB49（N=6）、野生型マウスのMCA205（N=4）、および野生型マウスのB16（N=4）。腫瘍、脾臓、肝臓、腎臓、および血漿における切断を評価した。血漿試料をプールした。切断頻度および切断された分子の割合（中央値）を計算した。

20

【0420】

別の研究では、ヒトの腫瘍（結腸腫瘍、肺腫瘍）由来のヒト調整培地を使用してエクスピボ切断を行った。プロテインA/Gビーズを2ラウンドの免疫沈降で使用して、分析前にヒト試料からヒトIgGを除去した。抗hKL C抗体を使用してSDS-PAGE分析を行い、試験された抗体の切断および非切断形態を検出した。ELISA分析を行い、切断の割合（%）を計算した。

30

【0421】

結果

図24Aに示されるように、MCA205線維肉腫細胞を使用した研究について、抗体2-14で腫瘍および肝臓組織において切断生成物が強く検出されたが、抗体2-16では検出されなかった。陽性対照（Ctrl*）は、抗体2-14からの50%非切断生成物および50%の切断生成物を有する試料を含んだ。

【0422】

図24Bに示されるように、MB49膀胱癌細胞を使用した研究について、抗体2-14で肝臓組織において切断生成物が強く検出されたが、抗体2-16では検出されなかった。陽性対照（Ctrl*）は、抗体2-14からの50%非切断生成物および50%の切断生成物を有する試料を含んだ。

40

【0423】

図24Cに示されるように、MC38結腸直腸癌細胞を使用した研究について、抗体2-14で肝臓組織において切断生成物が強く検出されたが、抗体2-16では検出されなかった。陽性対照（Ctrl*）は、抗体2-14からの50%非切断生成物および50%の切断生成物を有する試料を含んだ。

【0424】

MB49担持マウスに投与された各抗体のIgGレベルをELISAアッセイによって

50

定量化し、次いで、各試料を、C T L A 4 コーティング M S D プレート上で、脾臓に対して $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、または腎臓および肝臓組織に対して $0.04 \mu\text{g}/\text{mL}$ で開始する 3 倍希釈系列でアッセイして、C T L A 4 結合を評価した研究もまた実施した。これらの研究には、マスクされていない親抗体（抗体 2-6）、マスクされた切断可能な抗体（例えば、抗体 2-14 および抗体 2-16）、ならびにマスクされているが非切断性の抗体（抗体 2-10）が含まれた。図 24D は、抗体 2-14 の切断された生成物の割合（%）を示す S D S - P A G E 分析である。切断の割合を、デンストメトリー強度（切断% = 下側バンド / （下側バンド + 上側バンド））に基づいて計算した。第 1 のレーン（左）は、血漿における 28% の切断、腎臓における 60% の切断、肝臓における 59% の切断、および脾臓における 73% の切断を示す。第 2 のレーン（中央）は、血漿における 39% の切断、腎臓における 54% の切断、肝臓における 77% の切断、および脾臓における 72% の切断を示す。第 3 のレーン（右）は、血漿における 35% の切断、腎臓における 64% の切断、肝臓における 75% の切断、および脾臓における 69% の切断を示す。矢印は、どの試料を C T L A 4 への結合を評価するために利用したかを示し、図 24E に結果を示す。図 24E は、各抗体と C T L A 4 との間の結合を示し、各抗体は、M B 4 9 担持 B - h C T L A 4 トランスジェニックマウスへの投与後に血漿、腎臓、肝臓、または脾臓から単離された。図 24E に示されるように、非切断性のマスクされた抗体 2-10 は、マスクされていない親抗体 2-6 と比較して低減された結合を示したが、一方で切断可能なマスクされた抗体 2-14 は、肝臓および脾臓における抗体 2-6 と同等の結合、ならびに血漿、腎臓、肝臓、および脾臓における抗体 2-10 よりも大きな結合を示した。抗体 2-16 は、腎臓、肝臓、および脾臓における抗体 2-10 と比較してより強い結合を示した。図 24F は、例示的なプロテアーゼのパネルによる切断可能なペプチド基質のインビトロでの切断のヒートマップを示す。

【0425】

C T L A 4 E L I S A アッセイを使用して、カニクイザルの器官および血漿中の抗体 2-14、抗体 2-15、抗体 2-10、抗体 2-16、および抗体 1334 のエクスピボ切断を試験する研究を、以下の通りに要約する。抗体 2-14 は、肺（88%）、膀胱（37%）、および結腸（36%）において高い切断の割合を示した。抗体 2-16 は、肺（30%）および脾臓（15%）において中程度の切断の割合を示した。抗体 1334 は、肺（22%）における中程度の切断の割合を示した。抗体 2-14 は、血漿（4%）における低い切断の割合を示した。抗体 2-16 について、血漿における検出された切断はなかった。抗体 1334 は、血漿（5%）における低い切断の割合を示した。

【0426】

C T L A 4 E L I S A アッセイを使用して評価された、マウスの腫瘍、組織、および血漿におけるある特定の抗体（例えば、抗体 2-14、抗体 2-15、抗体 2-10、抗体 2-16、および抗体 1334）のエクスピボ切断を試験する研究の結果を、C 5 7 / B l 6 - w t、M C 3 8 - w t、M C 3 8 - h C T L A 4、M 4 9 - w t、M C A 2 0 5 - w t、および B 1 6 マウスについて図 25A ~ 25F に示す。E L I S A アッセイによって計算された切断分子の割合を表 17 に要約する。

【0427】

（表 17）切断分子の割合（%）

10

20

30

40

50

マウス モデル	組織	抗体 2-14	抗体 2-15	抗体 2-10	抗体 2-16	抗体 1334
C57/B16- wt	脾臓 (n=9)	3%	2%	2%	3%	4%
	肝臓 (n=9)	2%	2%	3%	2%	2%
	腎臓 (n=9)	7%	4%	3%	2%	40%
	血漿 (n=2)	6%	3%	5%	19%	0%
MC38-wt	腫瘍 (n=9)	1%		0%	4%	
	脾臓 (n=9)	4%		3%	0%	
	肝臓 (n=9)	2%		1%	5%	
	腎臓 (n=9)	8%		1%	3%	
	血漿 (n=1)	1%	0%	0%	0%	0%
MC38- hCTLA4	腫瘍 (n=5)	0%	0%	0%	7%	1%
	脾臓 (n=5)	7%	0%	0%	6%	0%
	肝臓 (n=5)	2%	0%	2%	2%	6%
	腎臓 (n=5)	25%	4%	3%	5%	72%
	血漿 (n=1)	1%	0%	0%	0%	30%
MB49-wt	腫瘍 (n=6)	1%	5%	15%	2%	0%
	脾臓 (n=6)	3%	0%	0%	1%	0%
	肝臓 (n=6)	0%	6%	7%	1%	4%
	腎臓 (n=6)	9%	2%	1%	5%	84%
	血漿 (n=1)			0%	4%	
MCA205- wt	腫瘍 (n=4)	2%	2%	0%	0%	
	脾臓 (n=4)	0%	12%	0%	2%	
	肝臓 (n=4)	0%	2%	0%	0%	
	腎臓 (n=4)	10%	4%	1%	0%	
	血漿 (n=1)	0%		0%	0%	
B16-wt	腫瘍 (n=4)	0%	0%	0%	0%	1%
	脾臓 (n=4)	2%	0%	2%	1%	3%
	肝臓 (n=4)	2%	0%	1%	1%	0%
	腎臓 (n=4)	16%	3%	3%	2%	38%
	血漿 (n=1)	0%	0%	0%	0%	1%

【 0 4 2 8 】

切断頻度を、図 2 5 A ~ 2 5 F に示されるように、レーダープロットに示す。腫瘍調整培地における切断頻度に関して、抗体 2 - 1 4 は、MC 3 8 - w t の腫瘍調整培地において 3 3 % の頻度、MB 4 9 - w t の腫瘍調整培地において 1 7 % の頻度、および M C A 2 0 5 - w t の腫瘍調整培地において 2 5 % の頻度を呈し、抗体 2 - 1 6 は、MC 3 8 - w t の腫瘍調整培地において 1 0 0 % の頻度、MC 3 8 - h C T L A 4 の腫瘍調整培地において 4 0 % の頻度、および MB 4 9 - w t の腫瘍調整培地において 1 7 % の頻度を呈した。腎臓調整培地における切断頻度に関して、抗体 2 - 1 4 は、MC 3 8 - w t、MC 3 8 - h C T L A 4、MB 4 9 - w t、M C A 2 0 5 - w t、および B 1 6 - w t の腎臓調整

培地において100%の頻度を呈し、抗体2-16は、MC38-wtの腎臓調整培地において67%の頻度、MC38-hCTLA4の腎臓調整培地において80%の頻度、MB49-wtの腎臓調整培地において17%の頻度、およびB16-wtの腎臓調整培地において100%の頻度を呈した。

【0429】

図26Aおよび26Bは、抗体2-14を使用した健康なカニクイザルの血漿におけるインビボでの切断研究の結果を示す。図26Aに示されるように、キャピラリー電気泳動(CE)を使用した抗体2-14の切断は、3名すべての対象について1時間で0%、対象#1について1日目で8%、対象#3において1日目で6%、および対象#5について1日目で4%、ならびに対象#1について7日目で35%、対象#3について7日目で32%、および対象#5について7日目で31%であると計算された。抗体2-14の切断もまた、対象#3の質量分析法(MS)を使用して計算し、これは1時間で0%、1日目に18%、および7日目に32.3%であると計算された。予期される切断部位(VPLS**LY)または別の部位(VPLSLY**SGG)でのインタクトな(すなわち、切断されていない)抗体2-14ならびに切断生成物の存在量を定量化した。インタクトな抗体2-14は、1時間で100%の存在量、24時間で82.1%、および72時間で67.7%であると計算され、切断生成物VPLS**LYは、1時間で0%の存在量、24時間で17%、および72時間で32.3%の存在量であると計算され、切断生成物VPLSLY**SGGは、1時間および72時間で0%の存在量、ならびに24時間で1%であると計算された。

【0430】

図26Cは、抗体2-16を使用した健康なカニクイザルの血漿におけるインビボでの切断研究の結果を示す。図26Cに示されるように、試験した条件下では、CEまたはMSを使用して、抗体2-16に対する切断は特定されなかった。インタクトな(すなわち、切断されていない)抗体2-16の存在量は、1時間、24時間、および72時間で100%の存在量であると計算された。

【0431】

図27Aおよび27Bは、ヒトの肺または結腸腫瘍試料で調整された培地を使用したエクスピボでの切断研究の結果を示す。図27Aは、ヒトIgGの除去を示すSDS-PAGE分析を示し、それによって2ラウンドの免疫沈降(IP)を行うことによって切断分析を可能にする。図27Bは、ヒト腫瘍試料を含む調整培地中でのインキュベーション後の、切断状態、切断されていない状態、または両方の状態の試験された抗体の存在を示す、SDS-PAGE分析の結果を示す。ELISAアッセイを使用した結果(図28Eを参照されたい)も、切断を示す選択試料に対して示された切断の割合(%)を用いて計算した。図27Bに示されるように、抗体2-14は、腫瘍試料において切断を呈することが示され、肺腫瘍試料では2.7%の切断、結腸2の8a ug結腸腫瘍試料では100%の切断、結腸28a ug結腸腫瘍試料では75%の切断、および結腸2の4se pt結腸腫瘍試料では100%の切断を呈すると計算された。図27Bに示されるように、抗体2-16は、腫瘍試料において切断を呈することが示され、肺腫瘍試料では21%の切断、結腸2の8a ug結腸腫瘍試料では98%の切断、結腸28a ug結腸腫瘍試料では45%の切断、および結腸2の4se pt結腸腫瘍試料では100%の切断を呈すると計算された。これは、抗体2-14および抗体2-16のSDS-PAGE分析に示されるように、切断と相関するELISA結合アッセイからの結果を示す。

【0432】

切断された分子の割合(%)もまた、結腸腫瘍上清(結腸2 4se pt結腸腫瘍試料)で質量分析を使用して分析し、ELISAアッセイ結果と比較した。切断可能なペプチド内の様々な部位での切断から生じる、インタクトな(すなわち、切断されていない)抗体ならびに切断生成物の存在量を計算した。結果を図28A~28Dに示す。図28Aに示されるように、対照としてRPMI中で培養した場合の99.6%の存在量と比較して、インタクトな抗体2-14の存在量は、結腸腫瘍調整培地中で培養した場合に4.8%

であった。抗体 2-14 を結腸腫瘍調整培地中で培養した場合、L*SLY 切断生成物の存在量は 69% であり、S*LY 切断生成物の存在量は 5.9% であり、L*YSGG 切断生成物の存在量は 2.7% であり、Y*SGG 切断生成物の存在量は 11.3% であり、S*GG 切断生成物の存在量は 6.3% であった。図 28B に示されるように、インタクトな抗体 2-15 の存在量は、結腸腫瘍調整培地中または対照として RPMI のいずれかで培養した場合に 98.8% であった。図 28C に示されるように、対照として RPMI 中で培養した場合の 99.8% と比較して、インタクトな抗体 2-16 の存在量は、結腸腫瘍調整培地中で培養した場合に 0.2% であった。抗体 2-16 を結腸腫瘍調整培地中で培養した場合、T*SGG 切断生成物の存在量は 96.8% であった。図 28D に示されるように、対照として RPMI 中で培養した場合の 97.5% と比較して、インタクトな抗体 2-10 の存在量は、結腸腫瘍調整培地中で培養した場合に 94.3% であった。

【0433】

ELISA アッセイを、抗体 2-6、抗体 2-14、抗体 2-15、抗体 2-10、抗体 2-16、ならびに Fc ドメインにおいて S239D および I332E 変異を含むイピリムマブのマスクされたバージョン（マスクされたイピリムマブ-m）を使用して行い、各試験された抗体は、結腸腫瘍調整培地（結腸 24sept 結腸腫瘍試料）または対照としての RPMI のいずれかで培養された。結果を図 28E に示す。抗体 2-14 は、100% の切断された分子を呈すると計算され、抗体 2-15 は、0% の切断された分子を呈すると計算され、抗体 2-10 は、4% の切断された分子を呈すると計算され、抗体 2-16 は、100% の切断された分子を呈すると計算された。

【0434】

図 28A ~ 28D に示される MS データは、切断された分子の割合 (%) の ELISA データと相関する。抗体 2-14 については、ELISA 分析は、MS データに基づく 95.2% と比較して、この結腸腫瘍試料で 100% の切断を示した。抗体 2-15 については、ELISA 分析は、MS データに基づく 1.2% と比較して、この結腸腫瘍試料で 0% の切断を示した。抗体 2-10 については、ELISA 分析は、MS データに基づく 5.7% と比較して、この結腸腫瘍試料で 4% の切断を示した。抗体 2-16 については、ELISA 分析は、MS データに基づく 99.8% と比較して、この結腸腫瘍試料で 100% の切断を示した。

【0435】

抗 CTLA4 ELISA 分析を、Cooperative Human Tissue Network (CHTN) から得られた腫瘍組織 (NAT) に隣接するヒト腫瘍組織および正常組織を使用して行った。試験された抗体は、抗体 2-14、抗体 2-16、および抗体 1334 を含む。表 18 に結果を要約する。表 18 に示されるように、ヒト腫瘍組織による切断の全体的な頻度は、抗体 2-14 (65%) について、抗体 2-16 (22%) よりも高い。腫瘍によって切断される分子の割合は、抗体 2-16 (26%) について、抗体 2-14 (22%) よりもわずかに高い。NAT によって切断される分子の全体的な割合は、抗体 2-14 (24%) について、抗体 2-16 (7%) よりも高い。

【0436】

(表 18)

10

20

30

40

50

抗体	組織	切断頻度		切断の割合(%)	
		NAT	腫瘍	NAT	腫瘍
抗体 2-14	黒色腫	1/1	3/3	100%	18%
	腎細胞	19/25	15/26	10%	25%
	卵巣	1/1	4/9	4%	5%
	膀胱	3/3	4/5	56%	7%
	リンパ節		1/1		2%
	結腸	8/8	7/7	34%	46%
	肺	5/6	4/7	3%	4%
	乳房	3/4	3/4	64%	37%
	肝臓	4/5	3/6	28%	2%
	合計	44/53 = 83%	44/68 = 65%	24%	22%
抗体 2-16	黒色腫	1/1	1/3	9%	1%
	腎細胞	9/25	4/26	2%	26%
	卵巣	0/1	2/9	0%	5%
	膀胱	0/3	0/5	0%	0%
	リンパ節		0/1		0%
	結腸	3/8	5/7	3%	50%
	肺	1/6	1/7	2%	21%
	乳房	1/4	1/4	5%	6%
	肝臓	1/5	1/6	71%	2%
	合計	16/53 = 30%	15/68 = 22%	7%	26%
抗体 1334	黒色腫	1/1	2/3	32%	4%
	腎細胞	16/24	17/25	8%	15%
	卵巣	1/1	3/9	5%	6%
	膀胱	2/3	4/5	57%	8%
	リンパ節		1/1		14%
	結腸	2/6	4/6	41%	39%
	肺	1/6	1/7	18%	6%
	乳房	2/4	2/3	20%	11%
	肝臓	4/5	2/6	28%	4%
	合計	26/50 = 52%	33/65 = 51%	18%	14%

【 0 4 3 7 】

実施例 17：患者の腫瘍および正常隣接組織（NAT）を用いたMC38およびH228細胞株の酵素およびプロテオミクスプロファイリング

試料中の総タンパク質濃度を、標準プロトコルに従ってビシンコニン酸（BCA）アッセイ（Thermo Scientific #23225）により評価した。腫瘍／NAT対試料の濃度は、約1mg/mLであったが、一方で細胞株試料の濃度は概して10倍低かった。したがって、複製細胞株試料（MC38-1およびH228-1）のうちの2つを、10kDaカットオフ膜を使用して10倍濃縮した。試料を、50μg/mLのタンパク質の最終反応濃度で、AMSP-MSライブラリとともにインキュベートした。

【 0 4 3 8 】

A. 細胞の細胞傷害性

乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）の活性を、製造業者のプロトコルに従って、LDHアッセイ（Thermo Scientific #88953）を使用して細胞傷害性を測定するために調整培地試料で測定した。バックグラウンドLDH活性もまた、MC38の対照として無血清DMEM培地中で、およびH228の対照として血清ありまたはなしのRPMIで、ならびにNAT／腫瘍試料で測定した。細胞の細胞傷害性は、対応するバックグラウンド培地対照の細胞傷害性と比較して表される。

【 0 4 3 9 】

図29に示されるように、調整培地試料中のLDHの活性を、壊死のプロキシとして使

用した。図29は、示される細胞株または腫瘍／NAT組織から調整された無血清またはウシ胎仔血清（FCS）補充培地において完了したLDH放出アッセイを使用して測定された細胞の細胞傷害性を示す。吸光度値は、各試料について対応する培地で測定されたベースライン活性の割合として表される。MC38細胞は、以前の細胞生存率データと同程度のLDH細胞傷害性を有していたが、H2228細胞は、予想よりも高い細胞傷害性を有していた（MC38よりも約2.6倍）。

【0440】

腫瘍およびNAT組織は、無血清培地中で培養された場合に、増加された細胞死を示した。腫瘍試料は、NAT試料よりも血清の欠乏に対してより感受性であり、腫瘍試料中の高い成長率を反映している可能性がある。図29に示されるように、完全培地中で培養された組織試料は、無血清培地中の組織または培養細胞株のいずれかと比較して、最も低い細胞傷害性レベルを有していた。

【0441】

B. プロテアーゼ特異性プロファイリング

プロテアーゼ特異性スクリーニングを、質量分析（AMSP-MS）法によるAlaunus Multiplex Substrate Profilingで行った。この方法は、物理化学的に多様なペプチドライブラリをプロテアーゼの基質として使用し、反応は、切断生成物の質量分析検出により経時的に監視される。得られた切断を、酵素なし対照インキュベーションの結果と比較して、酵素処理した試料における特定の切断について評価する。

【0442】

特異性プロファイルの差異分析については、各位置での各アミノ酸について、iceLogoソフトウェア（v. 1.2）を用いてZスコアのマトリックスを生成した。これらのZスコアは、特定のアミノ酸の頻度が平均から逸脱する回数（すなわち、陰性参照セット内の特定の位置でのその特定のアミノ酸の頻度）を計算する。次いで、試料対間の差分Zスコアを使用して、gplotおよびRColorBrewerパッケージを使用して、R環境でヒートマップを生成した。

【0443】

AMSP-MSライブラリからの時間依存性ペプチド切断生成物を、LC-MS/MSにより特定した。2つの細胞株試料であるMC38およびH228は各々、ライブラリに対して良好なレベルの活性を示した。時間経過中に観察された切断の総数は、MC38については40（15分）、107（60分）、および306（240分）であり、H2228については149（15分）、170（60分）、および371（240分）であった。基質特異性のプロファイルを、全時間経過にわたって観察された453（MC38について）および690（H2228について）の切断の累積リストから外挿し、図30のiceLogo表現を使用して報告する。IceLogoは、ペプチドライブラリ内の切断位置と切断されていない位置の両方を考慮し、（P1-P1'）で切断部位に隣接するアミノ酸のフォールド濃縮（fold enrichment）および非濃縮（de-enrichment）を可視化するために用いられる。図30は、MC38およびH2228細胞株の基質切断を、iceLogoグラフィックとして示す。文字の高さは、ライブラリ中のすべての可能なペプチド切断に対する切断ペプチド間のアミノ酸頻度の差異パーセントであり、各位置P4~P4'でプロットされる。中心線より上の残基は好ましく、線より下の残基は好ましくない。統計的に有意な残基（ $p \leq 0.05$ ）は、物理化学特性によって色付けされる（黒色：疎水性、赤色：酸性、青色：塩基性、紫色：アミド、緑色：小さい）。灰色の残基は、 $p > 0.05$ で観察された。

【0444】

ここでAMSP-MSによって特定される特異性プロファイルは、エンドペプチダーゼ活性を示し、両方の細胞株によって共有されるP1中の疎水性および塩基性アミノ酸が強く好ましい。MC38細胞は、P1'中のRおよびYに対する選好性、ならびにP3、P2、およびP4'で追加の疎水性特異性を示した。H2228細胞は、P1'でH、S、およ

10

20

30

40

50

びYに対する選好性、ならびにP 2 ' およびP 4 ' で追加の疎水性特異性を示した。

【0445】

C. NATおよび腫瘍の差異解析

MSP-MSライブラリからの時間依存性ペプチド切断生成物を、実施例17. Bに上述されるように同定した。2つの患者組織試料は、ライブラリに対して高レベルの活性を示した。時間経過中に観察された切断の総数は、NATについては134（15分）、270（60分）、および475（240分）であり、腫瘍組織については63（15分）、184（60分）、および447（240分）であった。基質特異性のプロファイルを、全時間経過にわたって観察された879（NATについて）および694（腫瘍について）の切断の累積リストから外挿し、図31Aに示されるiceLogo表現を使用して報告する。図2と同様に、図31Aおよび31Bは、NATおよび腫瘍（TUM）組織の基質切断を、iceLogoとして示す。

【0446】

さらに、2つの患者試料のライブラリに対する活性を、より長い24時間の時点で監視し、基質特異性のさらなる差異を明らかにした。この追加の時点で観察された切断は、719（NATについて）および636（腫瘍について）であった。全時間経過（24時間時点を含む）のプロファイルを図31Bに示す。ノルロイシン（n）は、ライブラリ内のMetのプロキシである。NAT試料は、P1における塩基性アミノ酸（主にRおよびK）、ならびにP1'におけるR、H、およびSに対する強い選好性を示した。腫瘍試料は、P1における塩基性（RおよびK）および疎水性アミノ酸の両方に対する選好性、ならびにP1'におけるHに対する強い選好性を示した。腫瘍試料はまた、P2'における疎水性アミノ酸に対する選好性を示したが、一方で両方の患者試料は、P4'における疎水性アミノ酸に対する選好性を共有した。

【0447】

NAT試料と腫瘍試料との間の全体的な基質特異性の差を定量化するために、図31Cに示されるように、各試料における切断からのZスコアもまた使用して、各垂部位での残基選好性に由来する差のマップを生成した。図31Cは、P4-P4'位置でのZスコアの差をヒートマップとして示し、NATまたは腫瘍特異的切断で好ましい残基を強調表示する。ノルロイシン（n）は、ライブラリ内のMetのプロキシである。これは、NAT試料におけるP1でのリジンおよびアルギニンに対する優性特異性を確認し、ならびに特に腫瘍試料における他の位置（P1におけるGおよびFなど）での追加のわずかな選好性を強調する。

【0448】

細胞株H2228の含有は、不死化細胞株を、特異性プロファイルに関して類似の起源の主要組織と比較する機会を提供し、ここでは非小細胞肺癌（NSCLC）を選択した。H2228細胞は、腫瘍試料よりも、NATとの特異性においてより顕著な差異を示した。さらに、この差異解析は、P1におけるG、H、およびFを含む、NATと比較して、同様に腫瘍組織のプロファイルと類似した、NAT（左パネル）と比較したH2228細胞におけるいくつかの選好性を示す。それにもかかわらず、特異性の差異（あまり顕著ではないが）は、図31Dに示されるH2228細胞と腫瘍組織の間でも検出され、腫瘍微小環境中のプロテアーゼ活性に関して、患者の不均一性に対する支持を提供する。図31Dは、P4-P4'位置でのZスコアの差をヒートマップとして示し、NATまたは腫瘍試料のいずれかと比較して、H2228特異的切断で好ましい残基を強調表示する。ノルロイシン（n）は、ライブラリ内のMetのプロキシである。

【0449】

D. ペプチド配列の動態分析

表19に示される10個の配列（AK10）を、AMSP-MSを介して分析した。これらの配列を、元の配列からわずかに修飾して、質量分析に適合したペプチド（いくつかの場合、塩基性残基を添加して正電荷を添加する）、および間隔残基（GG）を生成して、より長い約14merのペプチドを生成した。ペプチドを、AMSP-MS反応におい

10

20

30

40

50

て最終濃度 500 nM で調製した。また、ペプチド種の化学的検証のために、AK10 ライブラリを LC-MS/MS によって別々に分析した。

【0450】

(表19)

基質名	目的の配列	分析のための、 修飾された配列
AK-01	ISSGLLSGRSDNH (配列番号 464)	KISSGLLSGRSDNH (配列番号 470)
AK-02	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (配列番号 465)	RAVGLLAPPGGLSGRSDNH (配列番号 471)
AK-03	VPLSLYSG (配列番号 466)	RGGVPLSLYSGGK (配列番号 472)
AK-04	MPYDLYHP (配列番号 466)	RGGMPYDLYHPGK (配列番号 473)
AK-05	DSGGFMLT (配列番号 466)	RGGDSGGFMLTGGK (配列番号 474)
AK-06	HEQLTV (配列番号 466)	RSGHEQLTVGGK (配列番号 475)
AK-07	RAAAVKSP (配列番号 466)	GSGRAAAVKSPGK (配列番号 476)
AK-08	RQARVVG (配列番号 467)	GSGRQARVVGK (配列番号 477)
AK-09	LSGRSNAMPYDLYHP (配列番号 468)	N/A (修飾されていない)
AK-10	MPYDLYHPRQARVVG (配列番号 469)	N/A (修飾されていない)

【0451】

AMSP-MS 分析を、標準基質特異性プロファイリング条件の 0、15、60、240、および 1200 分の反応インキュベーション中のサンプリング時点で行った。ペプチドを、各ペプチド種の MS1 前駆体イオンピーク面積からの質量分析ラベルフリー定量法により定量化した。酵素進行曲線を GraphPad Prism ソフトウェア v8.0 でモデル化し、以下の一次動態方程式に非線形最小二乗法のフィッティングを使用してデータをフィッティングさせた。

$$Y = e^{(-[K_{obs}]t)}$$

式中、Y = 生成物形成パーセントであり、K_{obs} は、観察された速度であり、t = 時間である。ミカエリス・メンテン動力学では、観察された速度 K_{obs} は、酵素濃度および触媒効率 (k_{cat}/K_M) の関数である。酵素混合物のこの分析では、K_{obs} を使用して生成物の切断をランク付けした。

【0452】

AMSP-MS 反応における AK10 ペプチドの全体像を表すために、各基質ペプチドの正規化された相対的存在量を経時的にプロットした。AK10 ライブラリ中の基質ペプチドの相対的存在量は、MC38 無血清調整培地を用いた AMSP-MS を介して監視された。MC38 無血清調整培地反応については、Met 酸化などの酵素的処理および非酵素的処理の組み合わせにより、各基質の存在量が異なる速度で減少したことが観察された。酵素切断を評価するために、生成物形成分析も必要とした。

【0453】

酵素的処理によって基質が消費されているかどうかを評価するために、生成物形成の速度を、飽和に理想的に到達する一相減衰モデルへの適合の質について評価した。図 32A および 32B は、MC38 細胞株を用いて明らかな分解を有する選択されたペプチドの個々の進行曲線を示す。図 32A および 32B は、MC38 調整培地を用いた選択された基

質の生成物形成曲線を示す；AK10-01（図32A、左）、AK10-02（図32A、右）、AK10-04（図32B、左）、およびAK10-05（図32B、右）。AK10-02の場合、明確な生成物形成は、非常にわずかな曲線で明らかであるが、AK10-01、AK10-04、およびAK10-05から形成される「生成物」は、非特異的分解の例である。AK10-01は本質的に線形であり、AK10-04は時間のゼロ点に存在し、AK10-05の生成物は化学的処理により分解し続けた（いくつかはLC-MS/MSにより観察される）。

【0454】

MC38の最良の基質は、AK-09およびAK-10であり、これらのペプチドについて複数の切断生成物が観察された。図33に示されるように、それらの進行曲線は一次動態速度にフィッティングされ、次いで、切断をそれらの相対効率によってランク付けした。図33は、AK10ライブラリペプチドとのMC38 AMSP-MS反応からの主要な切断生成物の相対効率を示す。PRQA|R V V GでのペプチドAK-10において最も急速な切断が生じ、「|」は、シシル（scissile）結合を示す。ペプチドAK-09では、複数の切断が、最も効率的な上位の基質の狭い倍率範囲内で観察され、切断は、LS|GRSNAM、LSG|RSNAM、およびLSGR|SNAMでの切断である。AK-02の低効率切断も示されている。

【0455】

H2228細胞株は、ペプチドAK10-01、-02、-04、-09、および-10において切断を生成した。個々の基質の生成物形成を図34Aおよび34Bに示す。図34Aおよび34Bは、H2228調整培地を用いた選択された基質の生成物形成曲線を示す；AK10-01（図34A、左上）、AK10-02（図34A、右上）、AK10-04（図34A、下）、AK10-09（図34B、左）、およびAK10-10（図34B、右）。H2228調整培地によって切断された上位の基質を、計算された相対効率とともに図35に示す。

【0456】

AK10ライブラリにおける切断された上位の基質を、一次動態速度にフィッティングさせ、最も効率的に切断されたモチーフは、YDLY|HPおよびLSGR|Sであった。モチーフLSGR|Sは、3つのペプチドで以下のランク順に切断された：AK-01 > AK-09 > AK-02。YDLY|HPモチーフは、2つのペプチドの状況において、以下のランク順で切断された：AK-04 > AK-09。ペプチドAK-10では、シシル結合をHPRQ|ARに移したが、このペプチドは依然として上位の基質の5倍以内の効率で切断された。

【0457】

患者腫瘍試料は、AK10ライブラリペプチドのAMSP-MS分析における細胞株試料のいずれかよりも広範な切断セットを生成した。個々の生成物形成トレースを図36A～36Cに示す。これらの図は、腫瘍調整培地を用いた選択された基質の生成物形成曲線を示す；AK10-01（図36A、左上）、AK10-02（図36A、上中央）、AK10-03（図36A、下）、AK10-04（図36B、左上）、およびAK10-05（図36B、右上）、AK10-09（図36B、下）、AK10-09酸化ペプチド（図36C、左）、およびAK10-10（図36C、右）。以前と同様に、ペプチドAK-09について、非酸化ペプチド種および酸化ペプチド種の両方において、いくつかの分解生成物が観察された。しかしながら、ペプチドAK-10の唯一の有意な切断は、PRQA|R V Vであり、図36Cの右パネルの生成物進行曲線は、二次反応が生成物シグナルを低減させていることを支持した。

【0458】

腫瘍調整培地中のAK10ライブラリの上位の基質を図36Dに示す。上位の切断は、AK-03のLSLY|SGモチーフ、およびAK-04のYDLY|HPにあった。H2228からのNSCLC試料および腫瘍組織は、複数の部位（LSG|R|SNAMP YDLY|HP）でペプチドAK-04（YDLY|HP）およびAK-09の有意な切

10

20

30

40

50

断を共有した。

【0459】

NAT調整培地はまた、特定の切断も生成した。基質存在量の監視により、実験の状況での著しいAK10ライブラリ分解に対する全体的な傾向が明らかになった。個々の生成物は、図37A～37Dに示されるある範囲の挙動を示した。図37A～37Dは、NAT調整培地を用いた選択された基質の生成物形成曲線を示す；AK10-01（図37A、上）、AK10-02（図37A、下）、AK10-04（図37B、上）、およびAK10-05（図37B、下）、AK10-09（図37C、上）、AK10-09酸化ペプチド（図37C、下）、およびAK10-10（図37D）。より良好な性能の基質は、AK-01、-04、-09、および-10であり、より弱い基質は、AK-02およびAK-05であった。

10

【0460】

最も効率的なNAT触媒基質の動態分析を図37Eに示す。最も効率的なNAT基質は、AK-10（LSGR | SDNH）であり、H2228との共有切断であったが、腫瘍試料とは共有されなかった。他の効率的な基質は、複数の部位（LS | GR | SNAMP YDLY | HP）でAK-09（その一部はH2228および腫瘍と共有された）、およびAK-04（YDLY | HP）であった。

【0461】

この分析は、正常な隣接組織が、その適合した腫瘍組織と共有される部位特異的酵素活性を含むことを示した。特に、YDLY | HP切断は、図31Aの右パネルに示される腫瘍調整培地のiceLogモチーフで明らかである。LSGR | Sモチーフに対する特異性も、図31Aの右パネルにおいて、4時間の反応後に生成された腫瘍調整培地iceLogにおいて明らかであり、また図31Bの左パネルにおいて、24時間のインキュベーション時間の場合、NAT試料においてさらに明らかに検出された。

20

【0462】

MC38は、ペプチドAK-09およびAK-02に見られるLSGRSモチーフ内のNSCLC試料とのみ切断を共有した。HPRQ | ARモチーフでのMC38によるAK-10の切断は、H2228と共有されたが、腫瘍試料と共有されなかったか、またはHPRQA | R部位では、NATと共有された。GLSG | RSでのAK-02のMC38切断は、図30の左パネルに示されるそのiceLogモチーフに見られるように、Argに対するその強いP1'選好性と一貫していた。

30

【0463】

要約すると、表20は、AK10ライブラリペプチドが、酵素切断と一貫する一次動態挙動を有していたという結論を支持する。表20は、ペプチド基質が、調整培地試料によって切断されたかどうかを示す（はい／いいえ／N.D.）。N.D.は、それが、調整培地処理試料において、インタクトまたは切断された種として検出されなかったことを示す。

【0464】

（表20）

40

50

基質	調整培地試料によって切断されたか？			
	MC38	H2228	NAT	腫瘍
AK-01	いいえ	はい	はい	はい
AK-02	いいえ	はい	いいえ	はい
AK-03	いいえ	いいえ	いいえ	はい
AK-04	いいえ	はい	はい	はい
AK-05	いいえ	いいえ	いいえ	はい
AK-06	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ
AK-07	いいえ	いいえ	いいえ	いいえ
AK-08	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AK-09	はい	はい	はい	はい
AK-10	はい	はい	はい	はい

【0465】

E. プロテオミクス分析

試料中のタンパク質濃度を、BCAアッセイにより定量化し、消化反応ごとに5 µgの総タンパク質を使用した。試料を、4 Mの尿素で変性させ、56 °Cで30分間の反応によって、5 mMのジチオスレイトール (DTT) で還元した。試料を、室温で1時間、暗所での反応により10 mMでヨードアセトアミド (IAM) でアルキル化した。過剰なIAMを5 mMのDTTでクエンチし、次いで、反応物を1 Mの最終尿素に希釈した。試料を、37 °Cで一晩、トリプシン対試料の1 : 50の質量比で、シーケンシンググレードのブタトリプシン (Promega、V5111) で消化した。翌日、得られたペプチド消化試料を、C18ジップチップ (Millipore-Sigma) で脱塩し、次いで、凍結乾燥させた。試料を、LC-MS/MS分析のために、HPLCグレードの水中の0.1 %ギ酸中に再懸濁した。

【0466】

LC-MS/MSによるペプチドシーケンシングを、nanoACQUITY (Waters) 超高性能LC (UPLC) システムおよびEASY-Sprayイオン源 (Thermo) を備えた、QExact Plus質量分析計 (Thermo) で行った。EASY-Spray PepMap C18カラム (Thermo、ES800 ; 3 µmビーズサイズ、75 µm×150 mm) を用いて、逆相クロマトグラフィーを実施した。試料装填中の600-nl/分の流量で14分間、クロマトグラフィーを行い、次いで、0.1 %ギ酸中の2~35 % (体積/体積) のアセトニトリルの線形勾配を用いて、90分にわたってペプチド分離のために400-nl/分の流量で行った。ペプチド断片化を、6つの最も強度の高い前駆体イオン上の高エネルギー衝突解離 (HCD) によって行い、最小2,000カウント、単離幅2.0 m/z、最小正規化衝突エネルギー25であった。

【0467】

MSピークリストをMSConvert⁶を用いて生成し、Protein Prospectorソフトウェアv. 5.22.1 (UCSF) を使用してデータを分析した。データは、SwissProtのヒトまたはマウスライブラリ (2017年11月1日にダウンロード) に対して検索され、それぞれ、合計20,240または16,942件のエントリーがあった。マウス細胞株であるMC38を、ヒトNSCLC試料とは別個に分析した。SwissProtウシライブラリも検索され、FCSタンパク質を同定した。デコイデータベース検索アプローチを使用して、偽発見率 (FDR) を推定し、タンパク質同定を報告するためのスコア閾値を<1 %のFDRを得るために選択した。質量公差を、親イオンについては20 ppm、断片イオンについては30 ppmに設定し、トリプシン特異性を、1つの非特異的開裂および1つの未切断を許容して選択した。Cys上のカルバミドメチル化を、固定修飾として使用した。以下の標準変数修飾を使用した：タンパ

ク質N末端アセチル化、タンパク質N末端アセチル化+酸化、グルタミンからのN末端ピログルタミン酸塩形成、Met損失、およびMet酸化。さらに、1回のLC-MS/MS試験における少なくとも2つの固有のペプチドの最小要件は、複製試料にわたる所与の実験におけるタンパク質同定ごとに必要であった。

【0468】

相対タンパク質存在量の近似として、スペクトルカウント（ペプチドカウント）でデータを出力した。試験間のタンパク質負荷の潜在的な差異を補正するために、その試験からの総カウントの合計によってペプチドカウントを正規化した。検索はその後ペルセウスで処理され、データは $\log_2$ で正規化され、次いで、3つの複製のうち少なくとも2つにおいて >1 のペプチドカウントを有していなかった場合、タンパク質を除外した。次いで、欠損値を、正規分布から帰属される乱数により置き換えた。2つの複製セットの間でウェルチのt検定を行い、火山型プロットをRで生成した。

【0469】

タンパク質同定のいくつかは、マトリックスメタロプロテアーゼ（Mmp2、7、および12）、MMP阻害剤（Timp2）、プロテアソームサブユニット（Psm）、セルピンおよびシスタチン、カルボキシペプチダーゼ（CpeおよびCpd）、カテプシン（Ctsd、b、h、zおよびl）、アミノペプチダーゼ（Rnpep、Lap3）、カルパイン（Cpns）、プロリル指向性ペプチダーゼ（Dpp3、Xpnpep1、およびPepd）、セリンプロテアーゼ（Prss23）、トリペプチジルペプチダーゼ（Tpp1）、Adam10、ならびにCasp3を含む、47個のプロテアーゼまたはプロテアーゼ阻害剤であった。

【0470】

プロテアーゼおよび阻害剤の存在量は、必ずしも観察された活性に加算されるものではないが、タンパク質同定は、活性データで同定されたモチーフに対する洞察を提供する。カテプシンの存在は、例えば、P1 nLeu選好性（Ctsd）、またはP1 Arg、Gly（Ctsb、Ctsl）を説明することができる。また、P1の基質特異性プロファイルにおける塩基性残基の強い選好性は、ウシトロニンおよびプラスミンの両方がプロテオミクスデータで検出されたため、凝固カスケード由来のバックグラウンド血清タンパク質にも関連している可能性がある。

【0471】

ヒトNSCLC関連資料の分析を組み合わせ、試料間の比較を可能にし、これには、H2228細胞株、患者の腫瘍、および正常な隣接組織が含まれた。ここで、プロテオミクス分析により、3つの試料すべてにわたって2243個の固有のタンパク質の確信的な同定がもたらされた。

【0472】

同定のいくつかは、プロテアーゼおよびその阻害剤の類似のリストであった：プロテアソームサブユニット、アミノペプチダーゼBおよびN、カルパインサブユニット、カルボキシペプチダーゼEおよびA、カスパーゼ1、3、6、8、カテプシンB、D、E、L1、L2、S、およびZ、DPP1、2、および3、ADAM10、MMP14および9、MMP阻害剤1および2、セルピン、セリンプロテアーゼHTRA1、FAPを含むプロリルエンドペプチダーゼ、プロリルアミノペプチダーゼ、トリペプチジルペプチダーゼTpp1およびTpp2、ならびに凝固因子および相補タンパク質。

【0473】

NAT試料および腫瘍試料から調整培地で検出されたタンパク質のリストについて、Perseusソフトウェアを使用して差異解析の例を行い、2つのセット（ペプチドカウントに基づく）の複製試料間の差異発現の両側ウェルチのt検定を可能にした。結果は、図38に火山型プロットで視覚化され、腫瘍（右側上、セクション2）またはNAT（左側上、セクション1）で著しく濃縮されたタンパク質がこれらのセクションに存在する。このリストでは、3つの目的のタンパク質を特定した：セルピンH1、アルファー1-アンチキモトリプシン（SERPINA3）、およびマクロファージマンノース受容体1（

M R C 1)。

【0474】

結論として、AMSP-M Sを使用した偏りのない活性プロファイリングにより、塩基性残基に対する全体的な強い選好性を有する各試料の切断プロファイルが明らかになった。MC38およびH2228細胞株は、異なるプロテアーゼ特異性プロファイルを持っていたが、一方で同じ患者の腫瘍およびNAT組織は、類似のプロテアーゼ特異性を共有していたが、差異解析により、腫瘍におけるP1 Leu、Phe、またはGlyに対して、NAT試料におけるP1 Arg/Lysに対するより強い選好性が明らかになった。比較動態解析により、YDLY|HPおよびLSGR|Sを含む、複数の試料にわたって、かつ個々の基質内で、2つの特定のモチーフが確実に切断されたことが示された。マウスMC38細胞株は、他のヒトNSCLC関連試料とは異なる生物学的起源のものであるが、MC38調整培地で特定されたプロテアーゼおよび阻害剤の収集は、NSCLCセットと顕著に類似していた。プロテオミクス分析から特定されたプロテアーゼには、カテプシンを含む観察されたAMSP-M S切断と一貫する特異性を有する候補が含まれる。

10

【0475】

実施例18：カニクイザルにおけるマスクされた抗CTLA4抗体のインビボ評価

実験の第1のセットでは、カニクイザルに、イピリムマブ、抗体2-6、抗体2-10、またはアイソタイプ対照を投与し、薬力学的(PD)効果を、CD4+細胞中のKi67+細胞の割合(%)を測定することによって評価した。実験の第2のセットでは、カニクイザルに、抗体2-6、抗体2-10、抗体2-14、抗体2-16、またはアイソタイプ対照を投与し、薬力学的効果を、CD4+細胞中のKi67+細胞の割合(%)を測定することによって評価した。

20

【0476】

PD実験の第1および第2のセットからの結果を図21に示す。親非マスク抗体2-6は、イピリムマブと比較して、CD4+細胞におけるKi67+細胞の割合の上昇によって示されるように、イピリムマブよりも末梢PD効果の誘導においてより強力である。抗体2-6のマスクされているが非切断性のバージョンである抗体2-10は、抗体2-6に関連するPD効果をブロックする。実験の第2セット(実験2)に示されるように、マスクされた切断可能な抗体である抗体2-14および抗体2-16は、マスクされていない親抗体2-6と比較して、低減されたPD効果を呈する。

30

【0477】

また、試験抗体(RSV-m対照、イピリムマブ、抗体2-6、抗体2-10、抗体2-14、抗体2-16、またはFcドメインにおけるS239DおよびI332D変異を含むイピリムマブのマスクされたバージョン(イピリムマブ-m-マスク))の10mg/kgの静脈内投与後のカニクイザルを使用して薬物動態を評価した。血漿中の各抗体のレベルを測定し、半減期(日)、Cmax(μg/mL)、および曲線下面積(AUC)(日×μg/mL)を2つの研究で測定した。

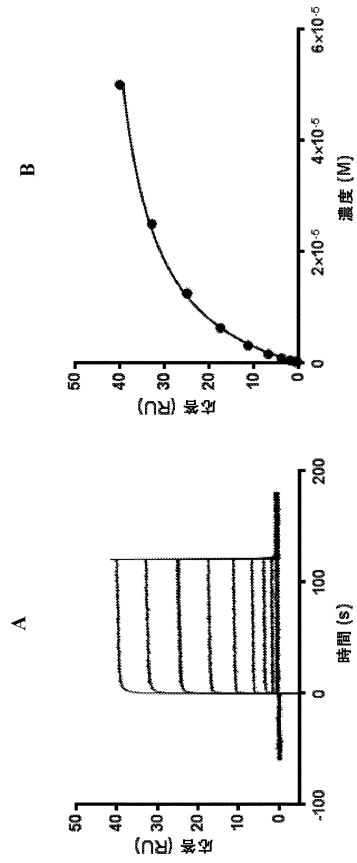
【0478】

薬物動態研究からの結果を、図22に示す。図22は、14日間の期間にわたる各投与された抗体のレベルを示す。このデータは、10mg/kgの静脈内用量後のカニクイザルにおいて、抗体2-14および抗体2-16が好ましい薬物動態を示すことを実証する。

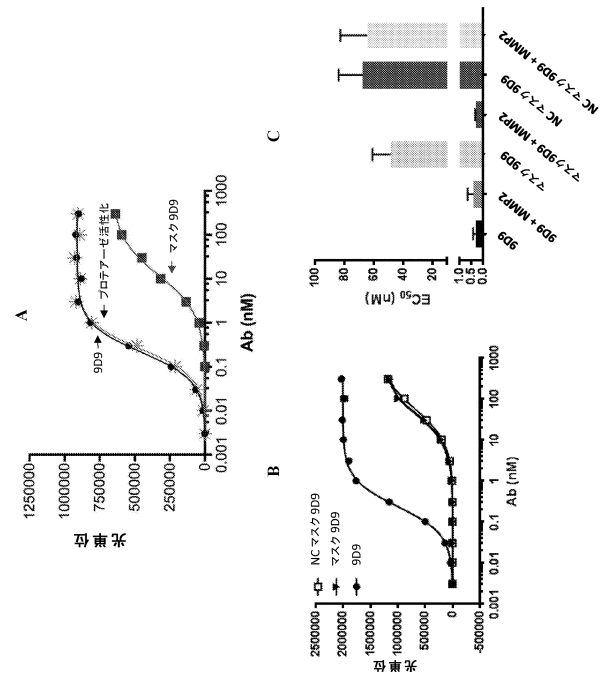
40

【図面】

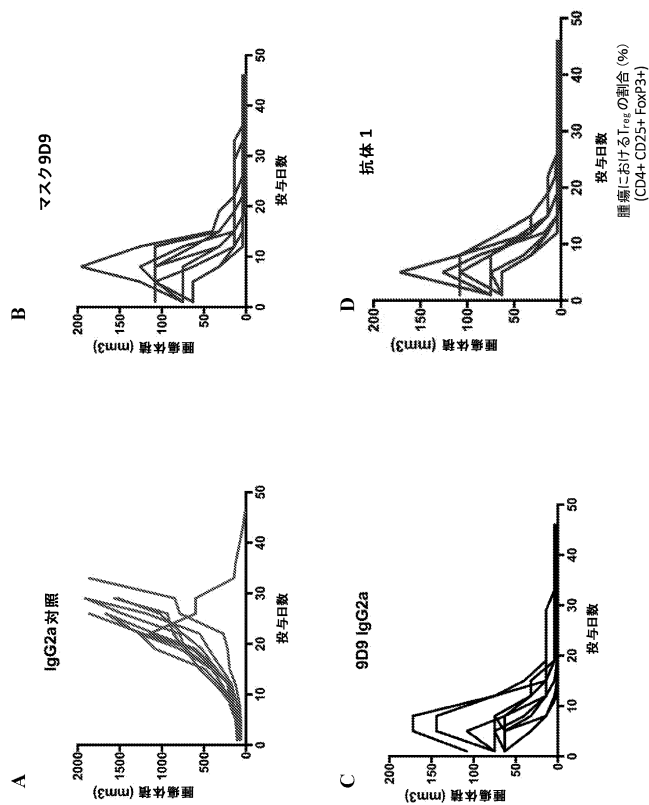
【図 1】



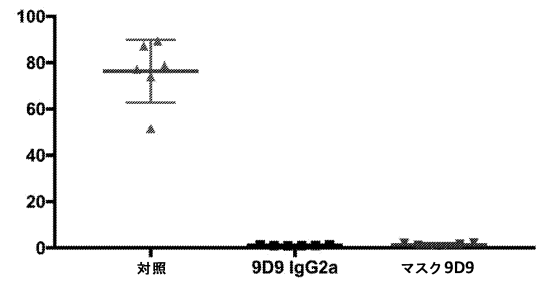
【図 2】



【図 3】



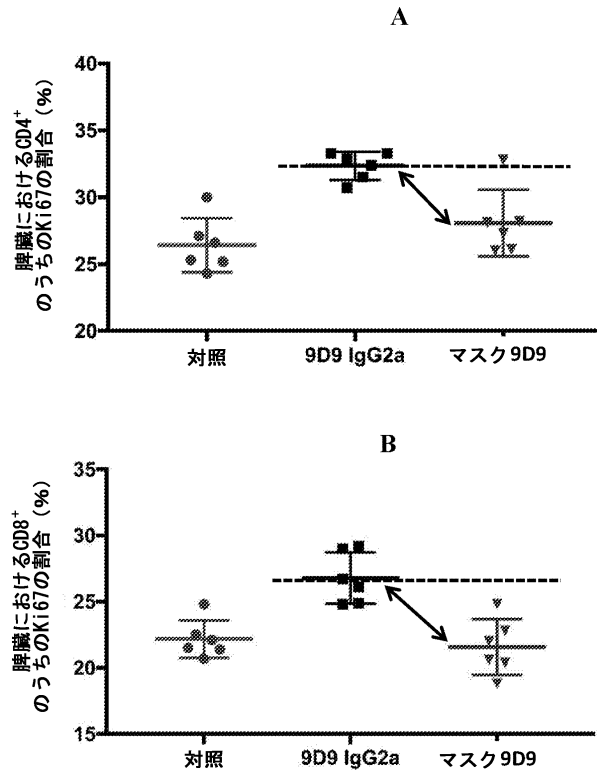
【図 4】



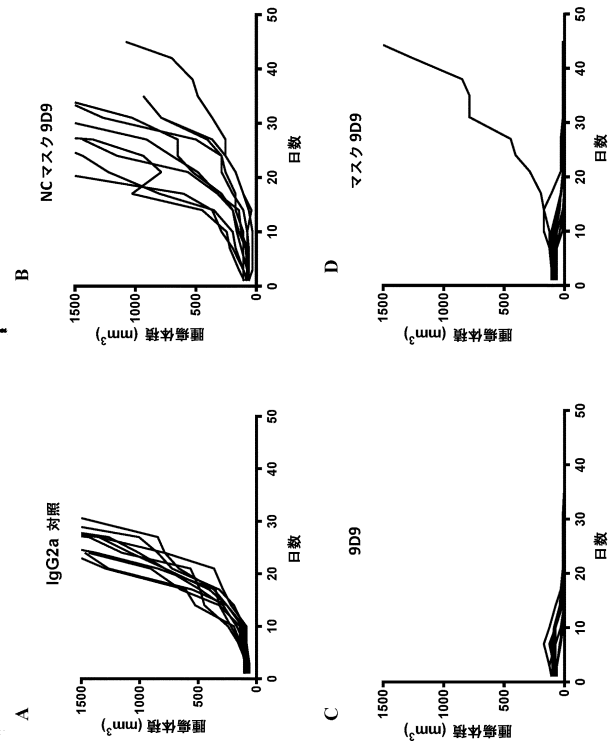
【図 5】



【図 5】



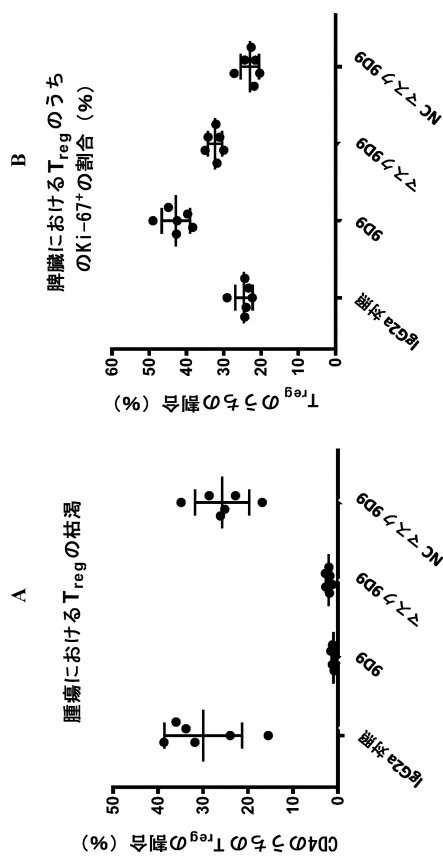
【図 6】



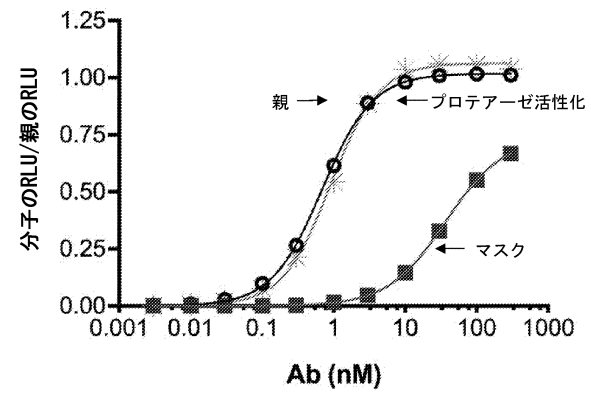
10

20

【図 7】



【図 8】

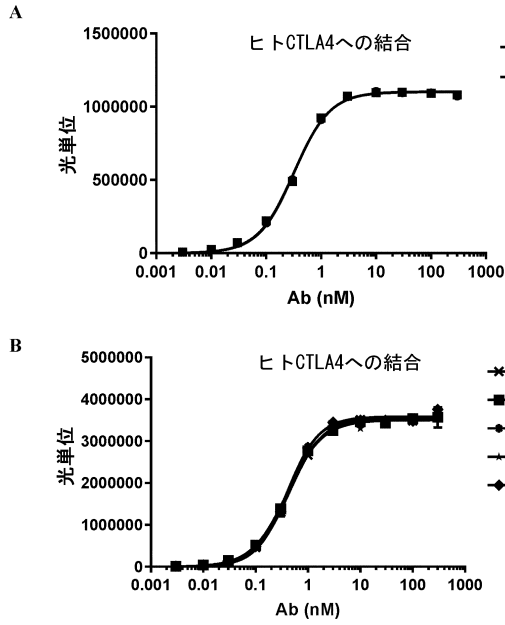


30

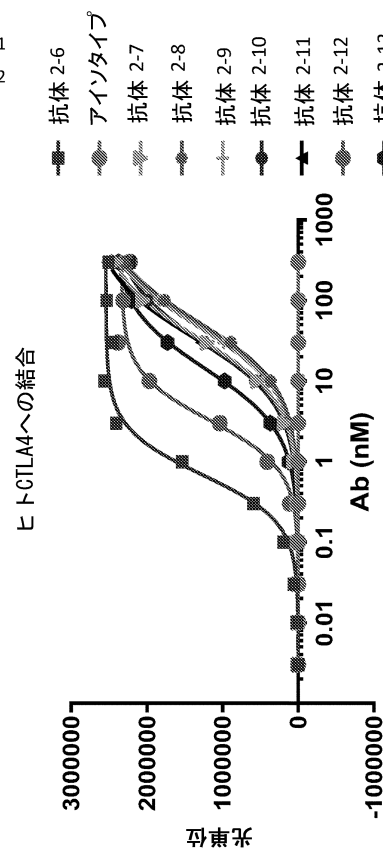
40

50

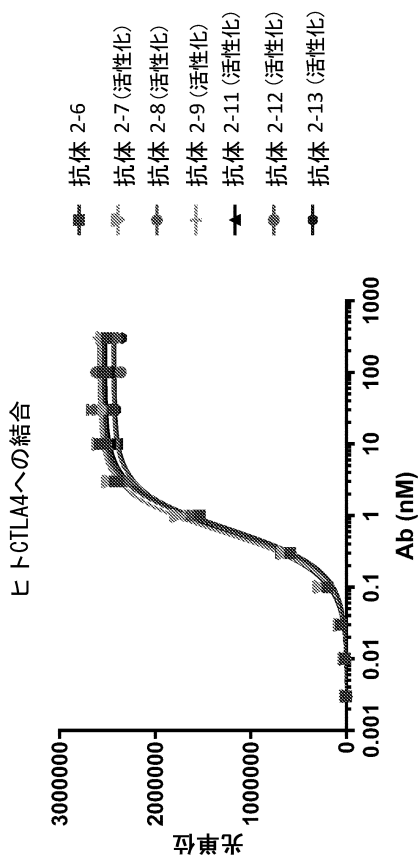
【図 9】



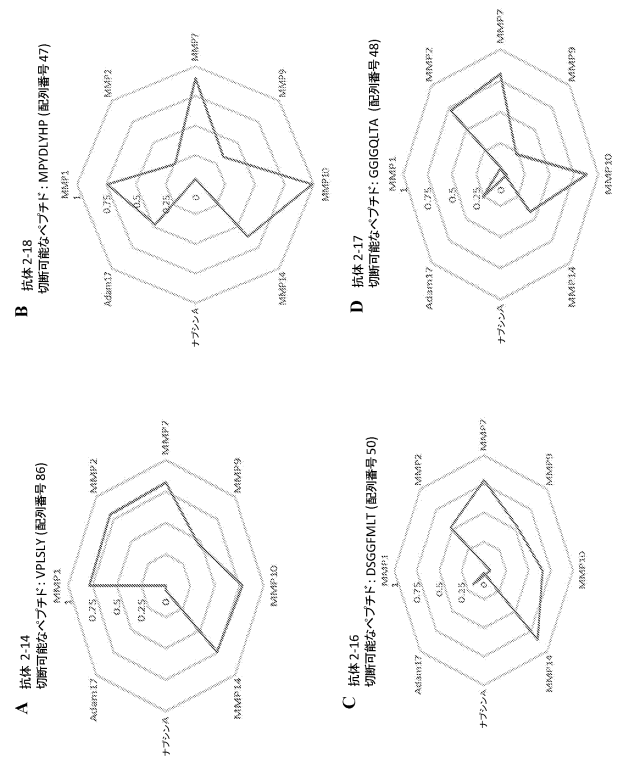
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 11 - 1】



10

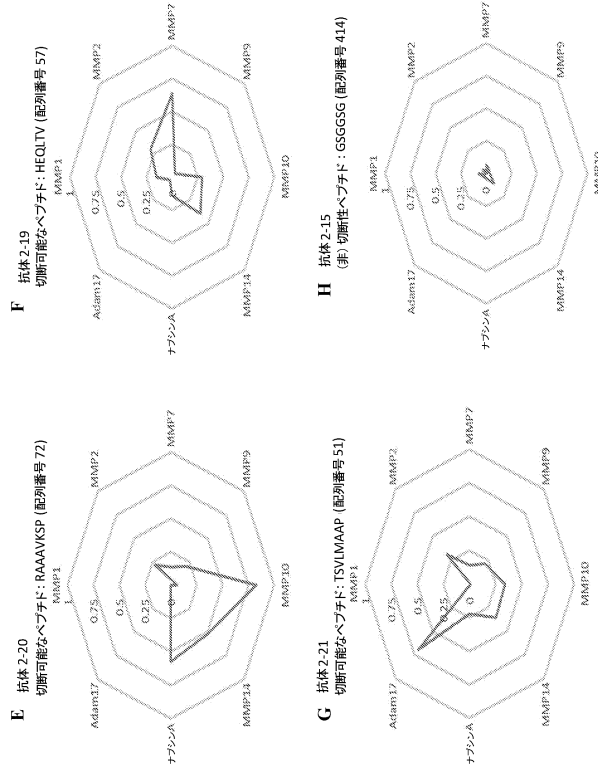
20

30

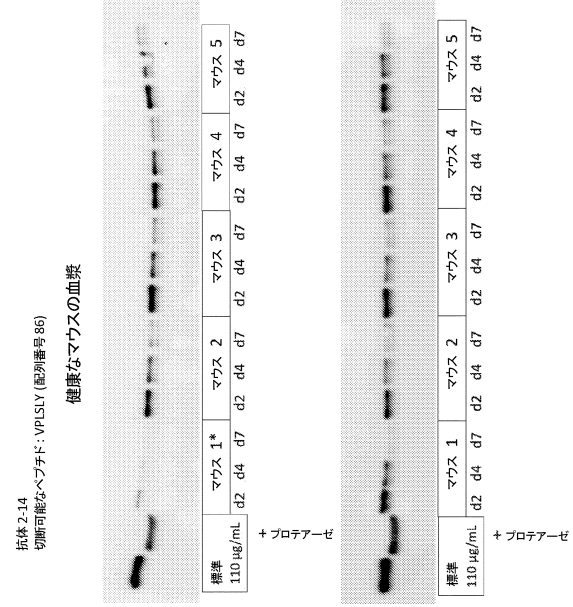
40

50

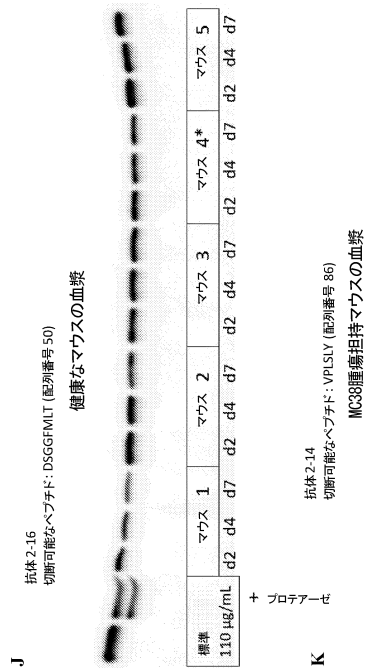
【図 1 1 - 2】



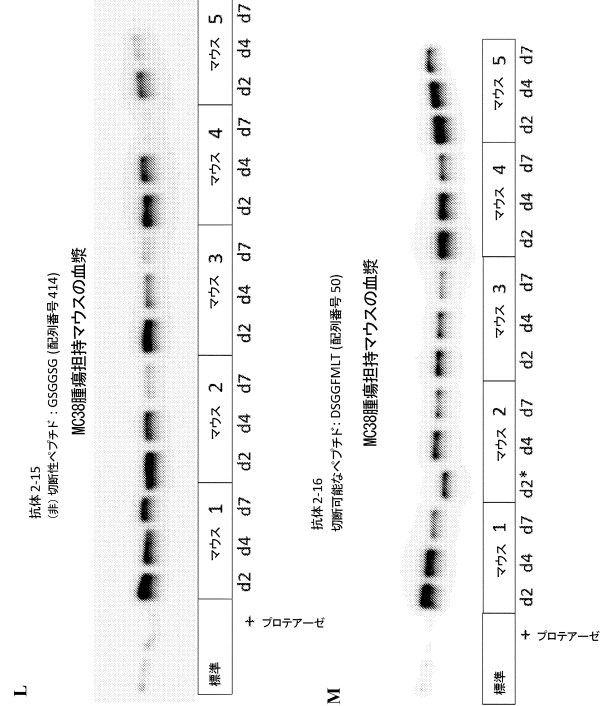
【図 1 1 - 3】



【図 1 1 - 4】



【図 1 1 - 5】



10

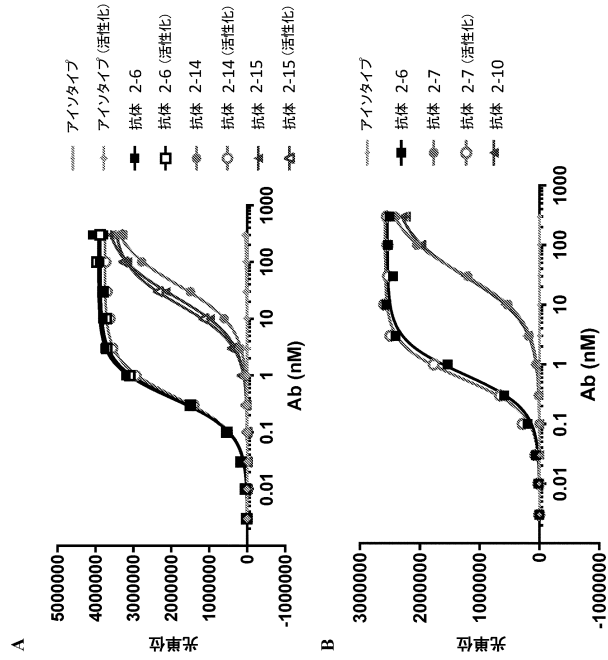
20

30

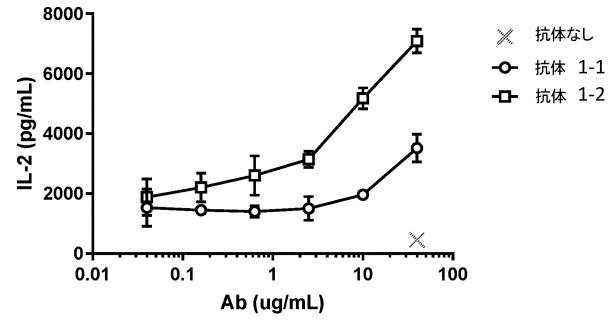
40

50

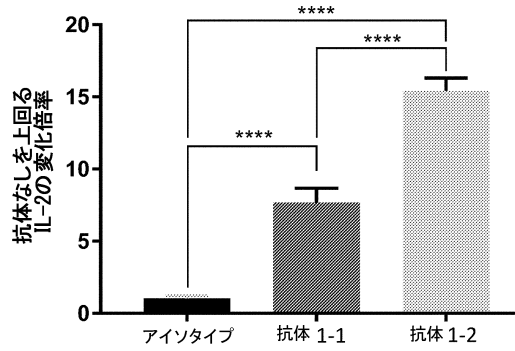
【図 1 2】



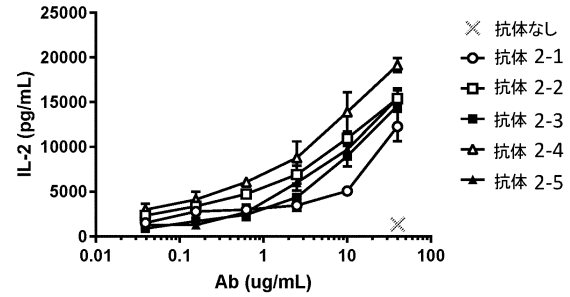
【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



10

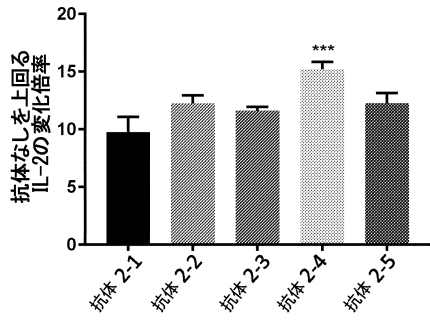
20

30

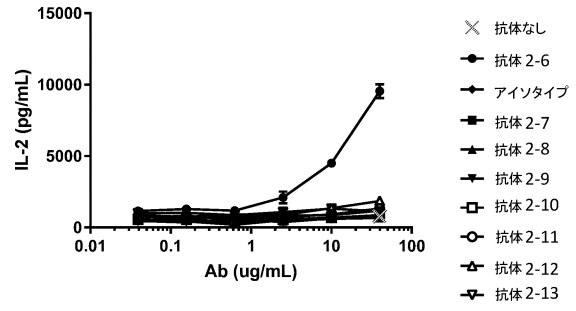
40

50

【図 1 3 D】

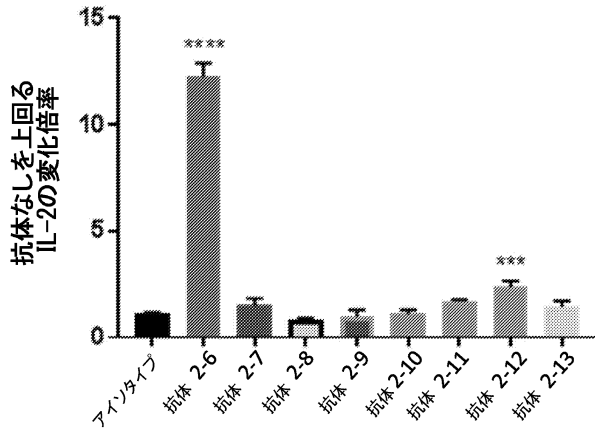


【図 1 4 A】

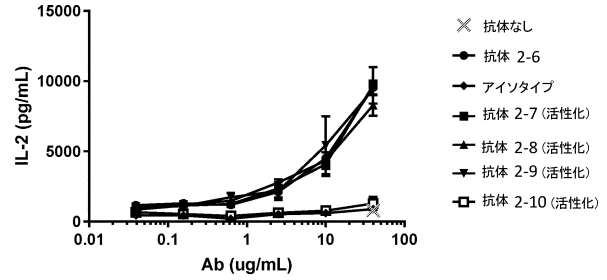


10

【図 1 4 B】

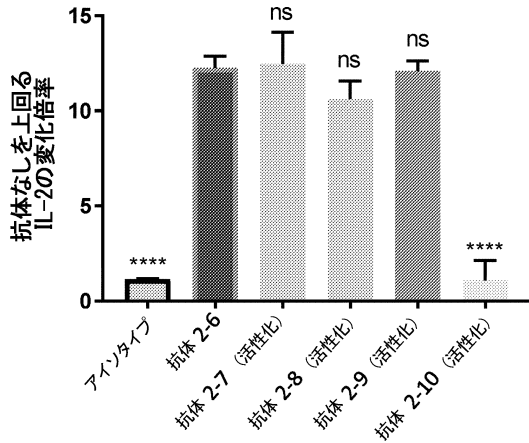


【図 1 4 C】

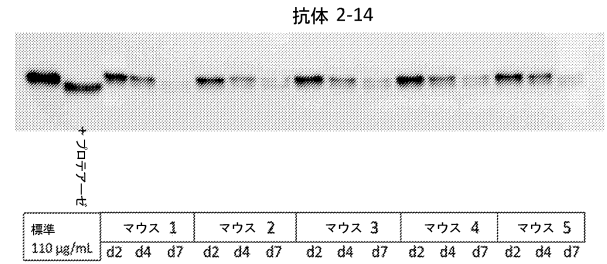


20

【図 1 4 D】



【図 1 5 A】

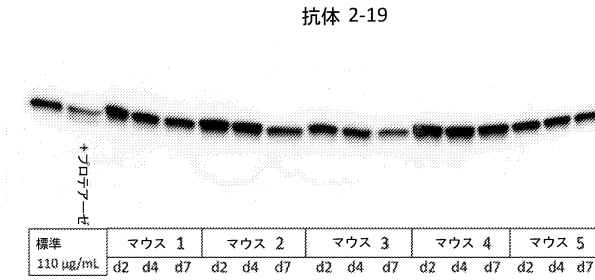


30

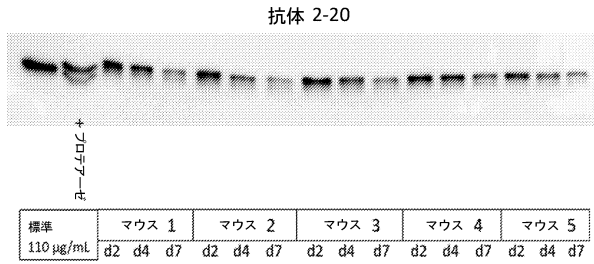
40

50

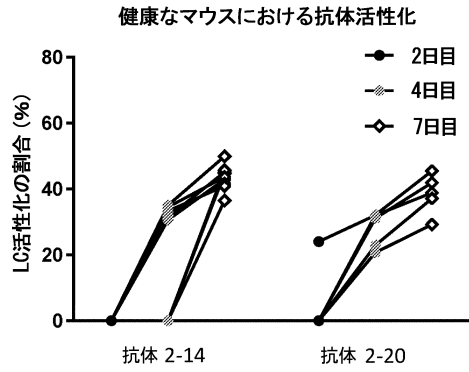
【図 1 5 B】



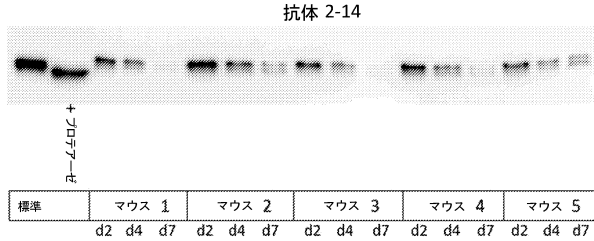
【図 1 5 C】



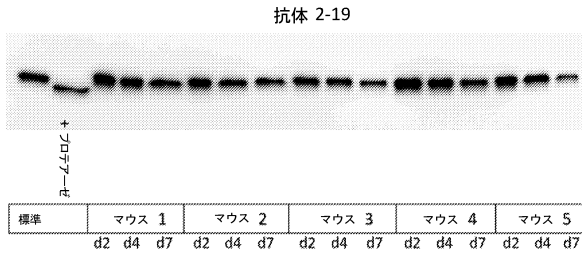
【図 1 5 D】



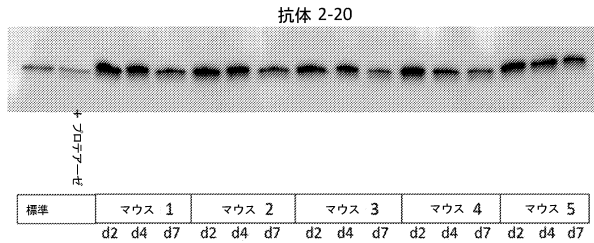
【図 1 6 A】



【図 1 6 B】



【図 1 6 C】



10

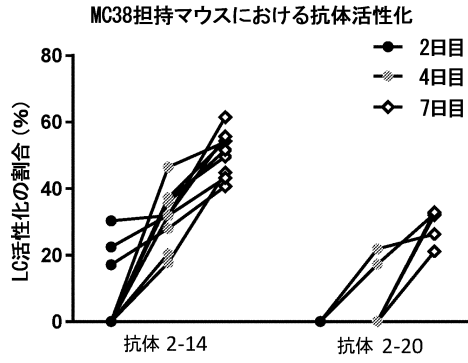
20

30

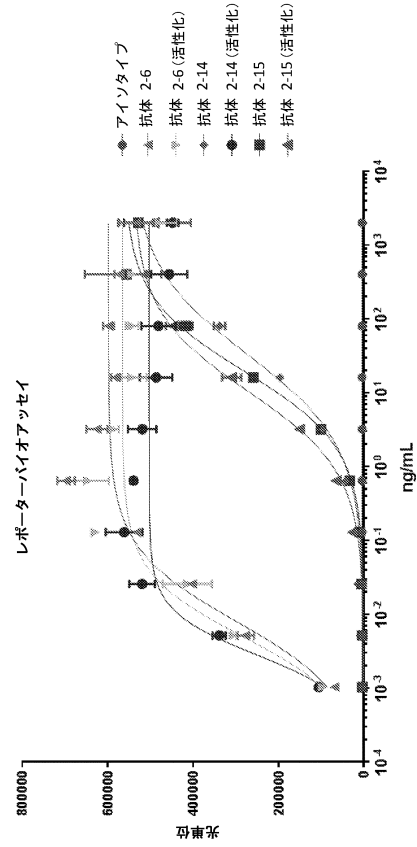
40

50

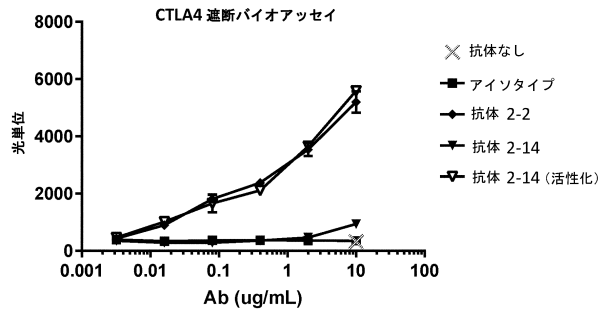
【図 1 6 D】



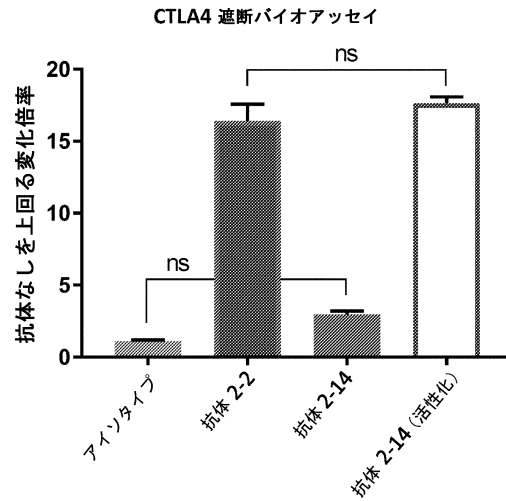
【図 1 7】



【図 1 8 A】



【図 1 8 B】



10

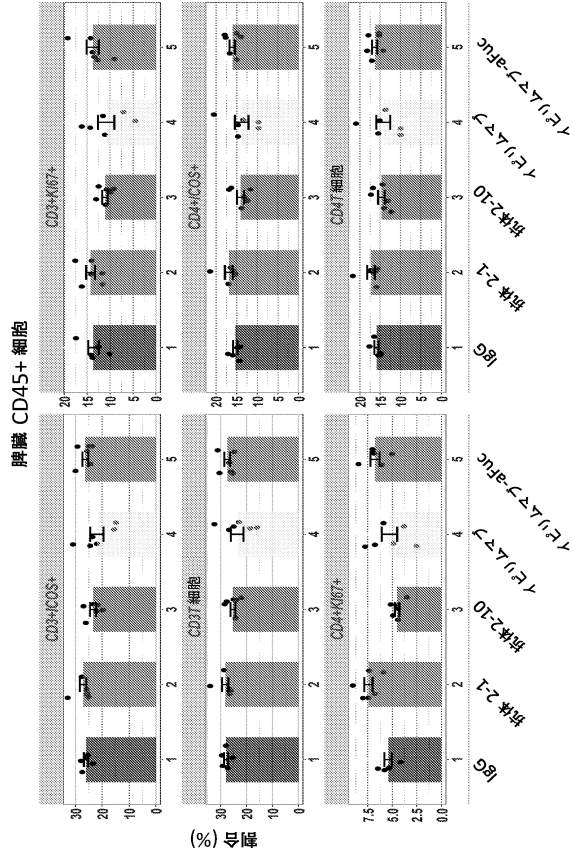
20

30

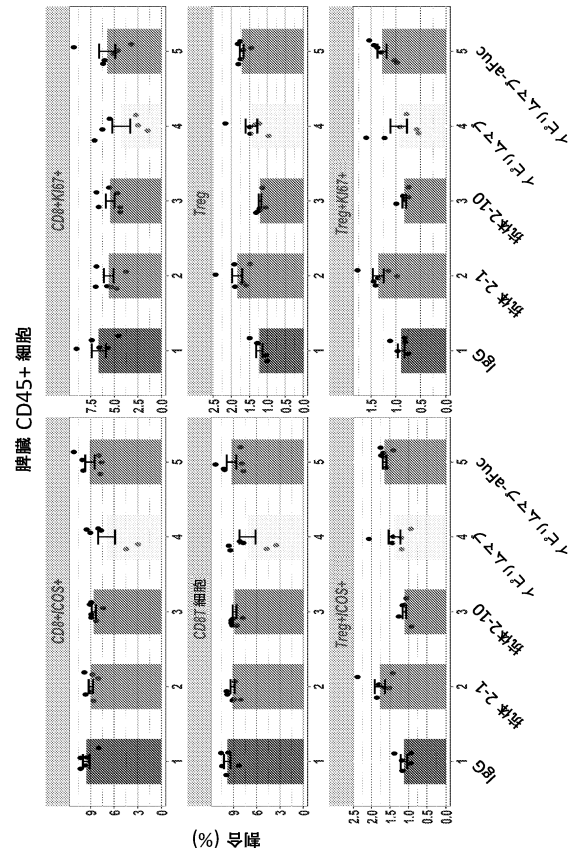
40

50

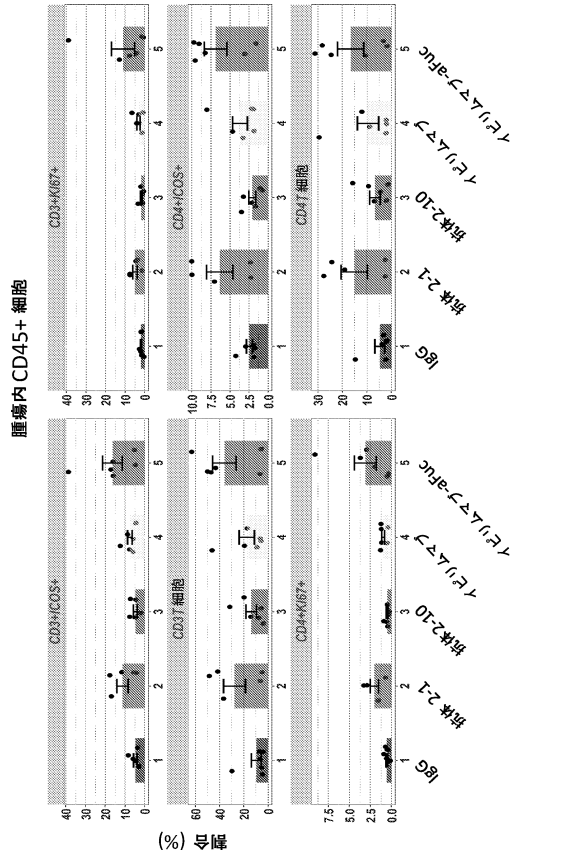
【図 19 A】



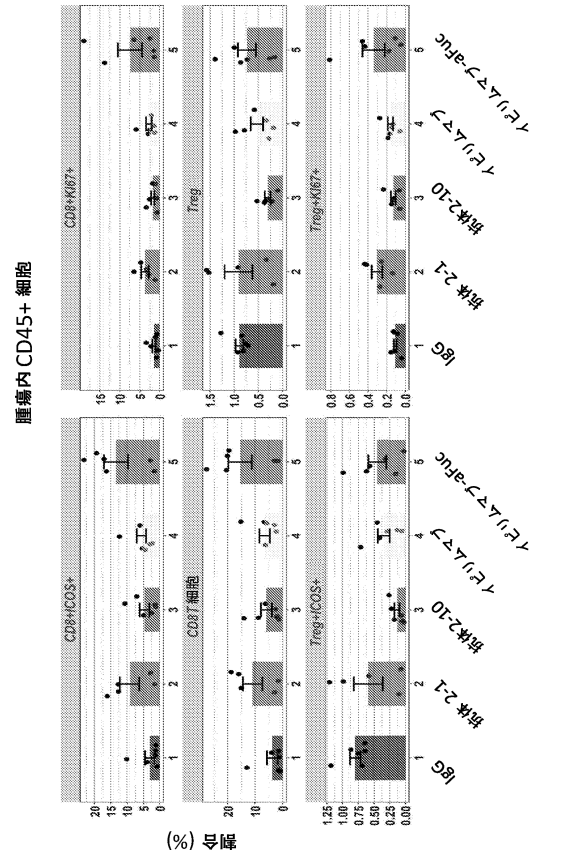
【図 19 B】



【図 19 C】



【図 19 D】



10

20

30

40

50

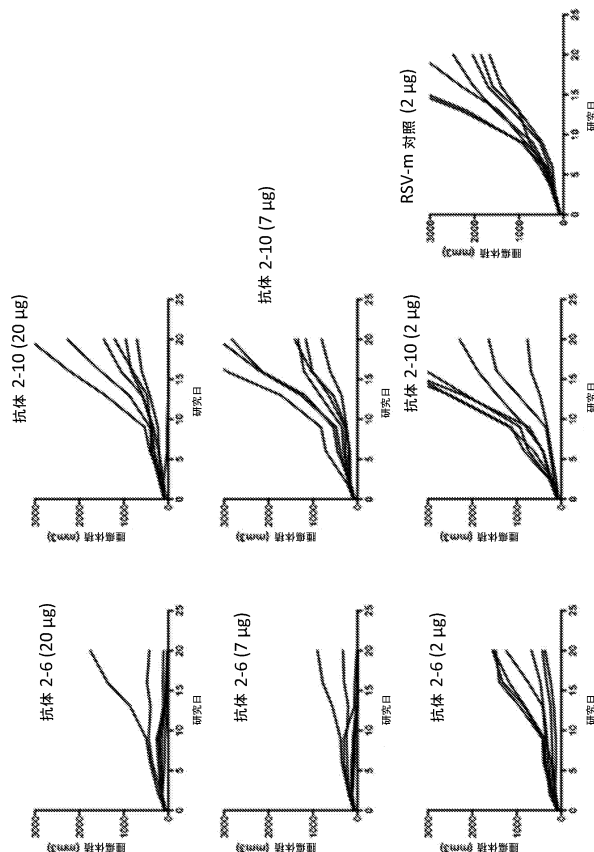
【図 19 E】

脾臓												
統計および棒グラフのキー:												
ハートレットOVA/Krusd												
CD3+ICOS+	1 対 2	1 対 3	1 対 4	1 対 5	2 対 3	2 対 4	2 対 5	3 対 4	3 対 5	4 対 5		
CD3+ICOS+	0.11	0.10	0.09	0.16	0.82	0.05	0.10	0.65	0.09	0.14		
CD3+Kl67+	0.25	0.18	0.10	0.23	0.94	0.02	0.13	0.78	0.90	0.11		
CD3T細胞	0.09	0.16	0.07	0.14	0.76	0.10	0.13	0.66	0.54	0.18		
CD4+ICOS+	0.14	0.19	0.18	0.41	0.41	0.05	0.14	0.48	0.90	0.10		
CD4+Kl67+	0.13	0.00	0.01	0.08	0.88	0.05	0.00	0.31	0.37	0.00		
CD4T細胞	0.10	0.25	0.25	0.38	0.62	0.07	0.16	0.45	0.81	0.15		
CD8+ICOS+	0.01	0.22	0.33	0.08	0.05	0.54	0.59	1.00	0.48	0.70		
CD8+Kl67+	0.50	0.29	0.27	0.21	0.08	0.44	0.84	0.26	0.87	0.30		
CD8T細胞	0.02	0.16	0.18	0.08	0.02	0.54	0.82	0.94	0.48	0.82		
Treg	0.01	0.00	0.01	0.93	0.54	0.01	0.00	0.06	0.59	0.13		
Treg+ICOS+	0.03	0.00	0.00	0.66	0.30	0.00	0.06	0.59	0.09	0.00		
Treg+Kl67+	0.04	0.01	0.01	0.66	0.02	0.00	0.09	0.82	0.94	0.00		

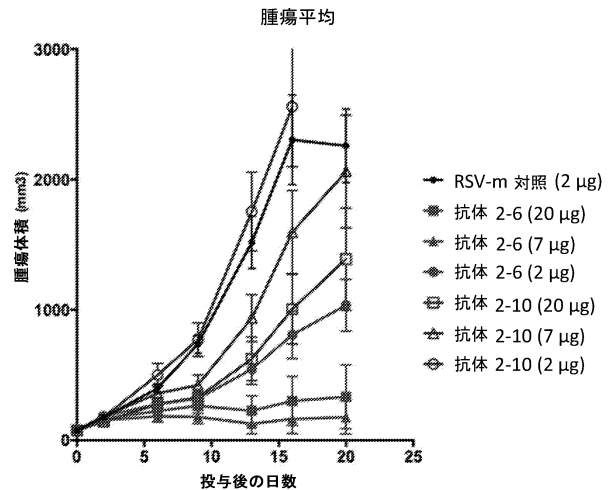
【図 19 F】

腫瘍内												
統計および棒グラフのキー:												
ハートレットOVA/Krusd												
CD3+ICOS+	1 対 2	1 対 3	1 対 4	1 対 5	2 対 3	2 対 4	2 対 5	3 対 4	3 対 5	4 対 5		
CD3+ICOS+	0.00	0.03	0.08	0.82	0.09	0.03	0.13	0.66	0.79	0.06		
CD3+Kl67+	0.00	0.10	0.08	0.59	0.31	0.24	0.03	0.18	0.66	0.24		
CD3T細胞	0.26	0.08	0.13	0.49	0.32	0.04	0.22	0.38	0.55	0.65		
CD4+ICOS+	0.02	0.05	0.05	0.59	0.18	0.09	0.05	0.18	0.93	0.18		
CD4+Kl67+	0.00	0.02	0.01	0.82	0.18	0.18	0.01	0.05	0.79	0.06		
CD4T細胞	0.17	0.19	0.12	0.52	0.35	0.08	0.20	0.43	0.86	0.58		
CD8+ICOS+	0.14	0.03	0.11	0.47	0.26	0.04	0.22	0.31	0.39	0.67		
CD8+Kl67+	0.00	0.09	0.05	0.70	0.13	0.04	0.13	0.43	0.79	0.39		
CD8T細胞	0.24	0.05	0.12	0.45	0.31	0.04	0.26	0.32	0.44	0.82		
Treg	0.03	0.11	0.93	0.00	0.09	0.82	0.25	0.43	0.54	0.31		
Treg+ICOS+	0.03	0.02	0.54	0.00	0.02	0.04	0.13	0.54	0.79	0.09		
Treg+Kl67+	0.00	0.06	0.01	0.59	0.09	0.18	0.02	0.13	1.00	0.39		

【図 20 A】



【図 20 B】



10

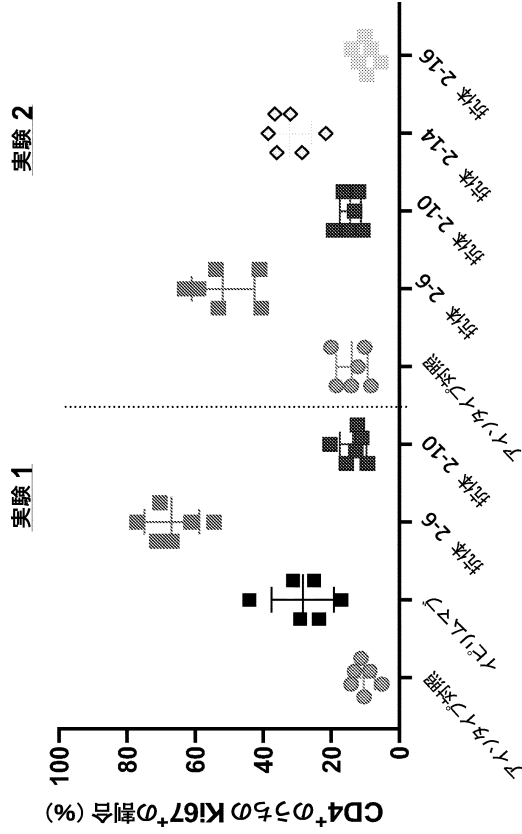
20

30

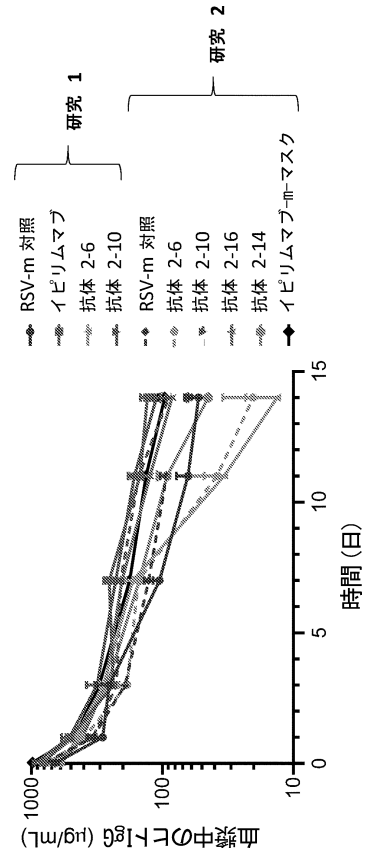
40

50

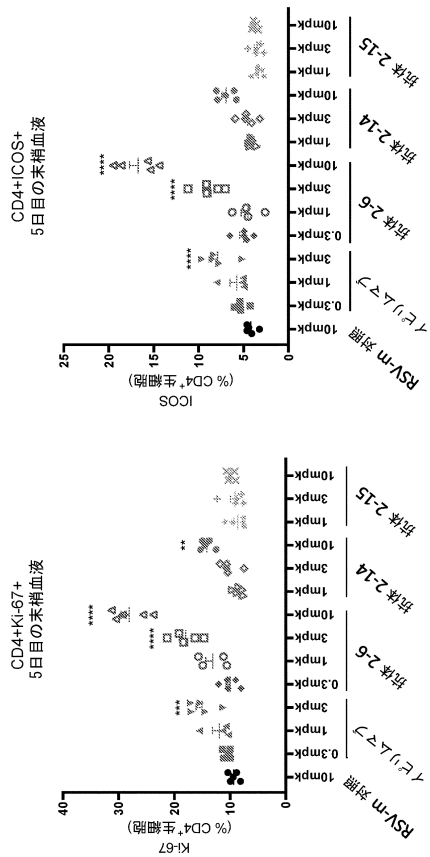
【図 2 1】



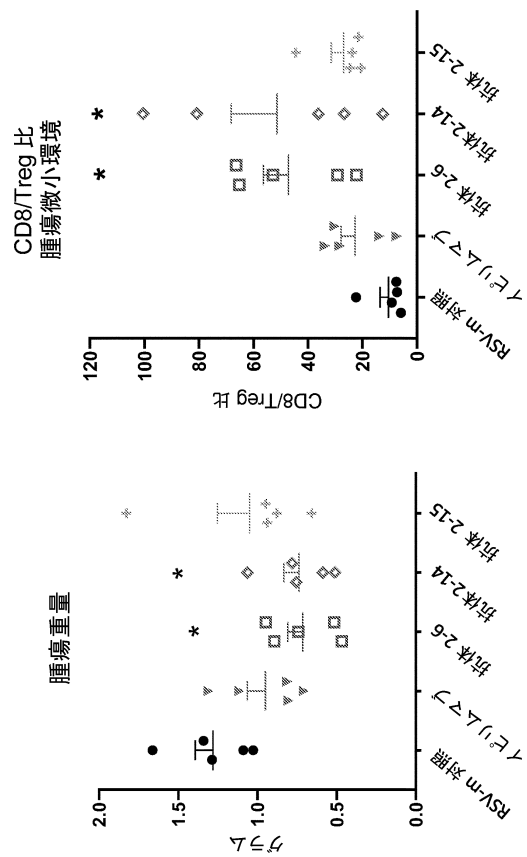
【図 2 2】



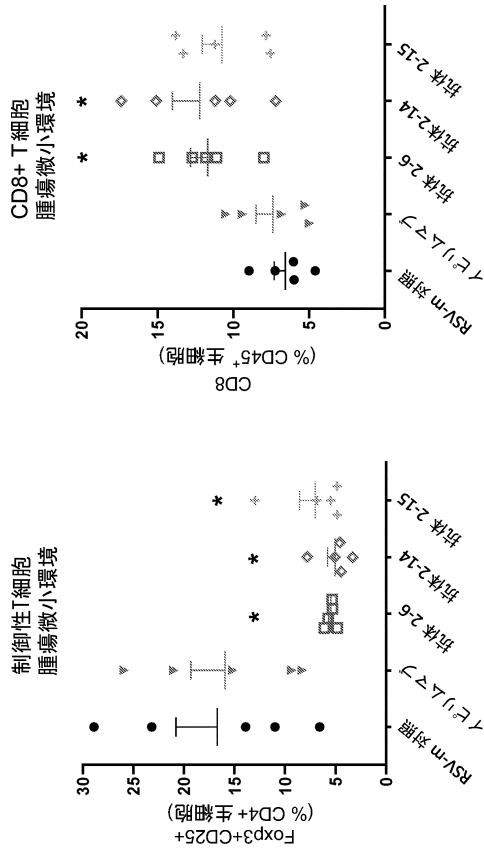
【図 2 3 A】



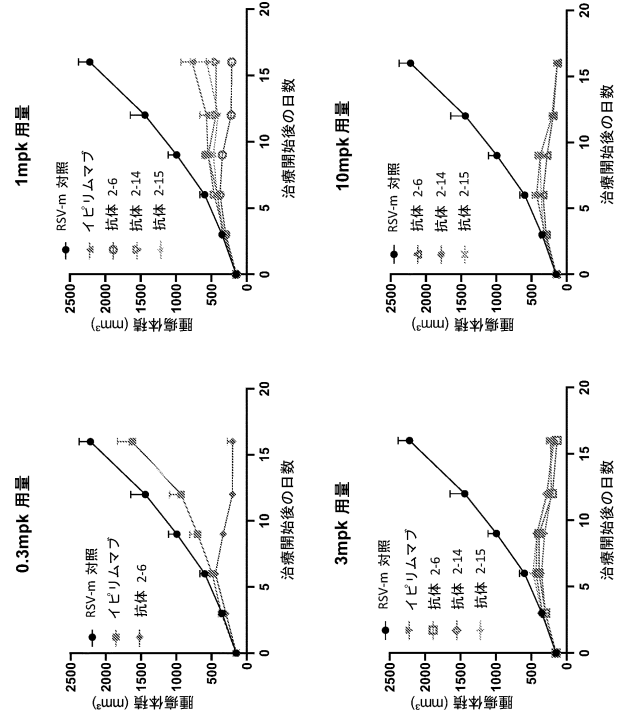
【図 2 3 B】



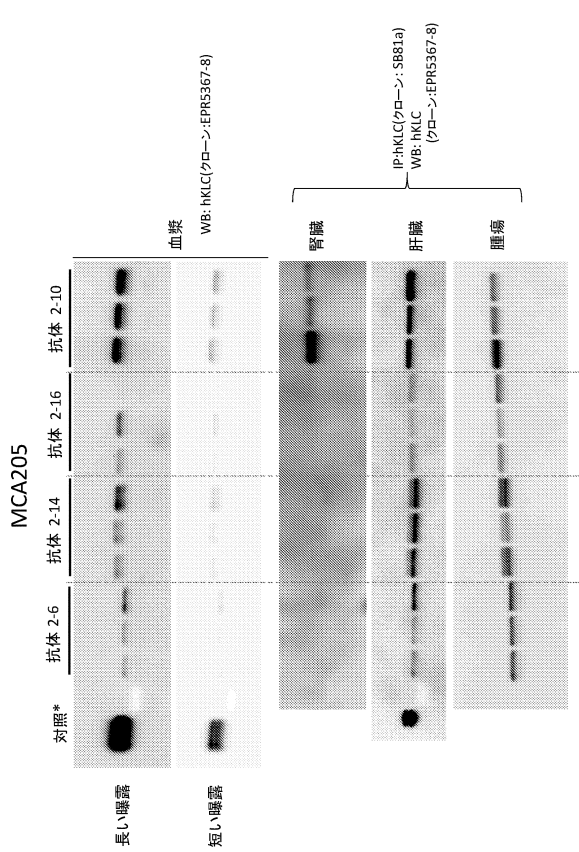
【図 2 3 C】



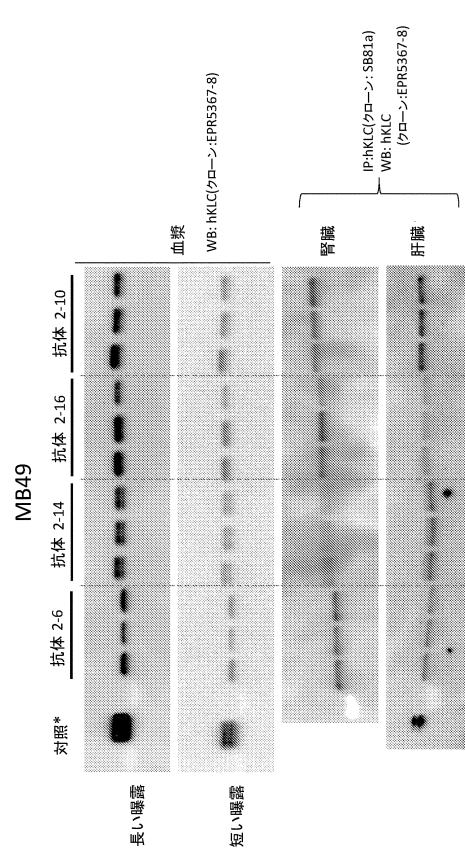
【図 2 3 D】



【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



10

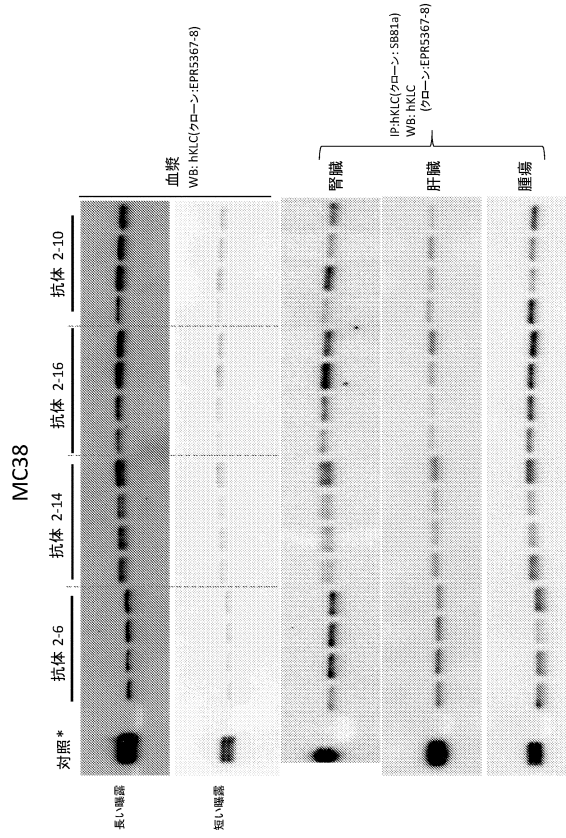
20

30

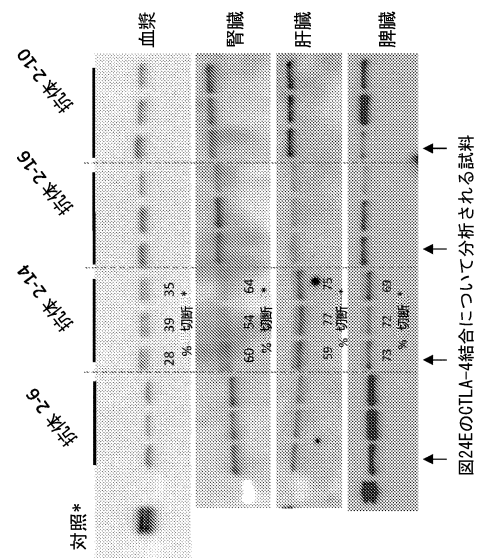
40

50

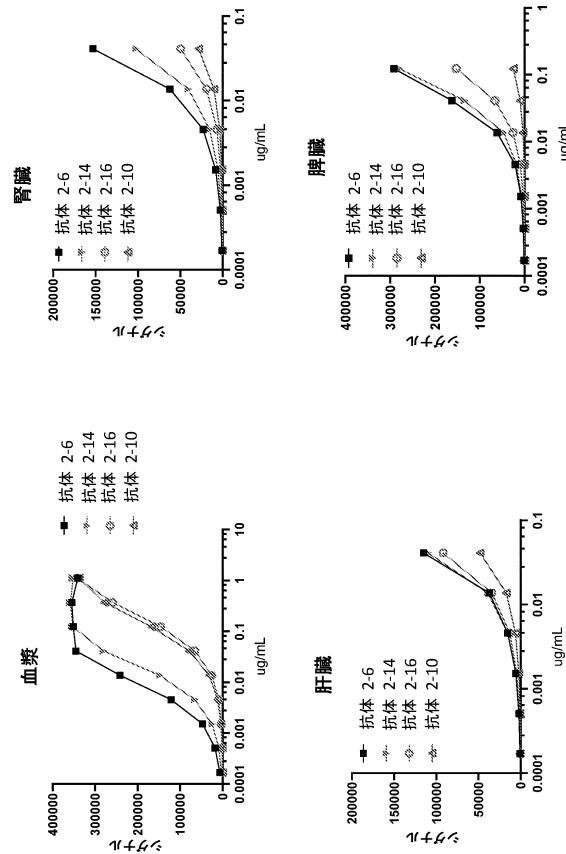
【図 2 4 C】



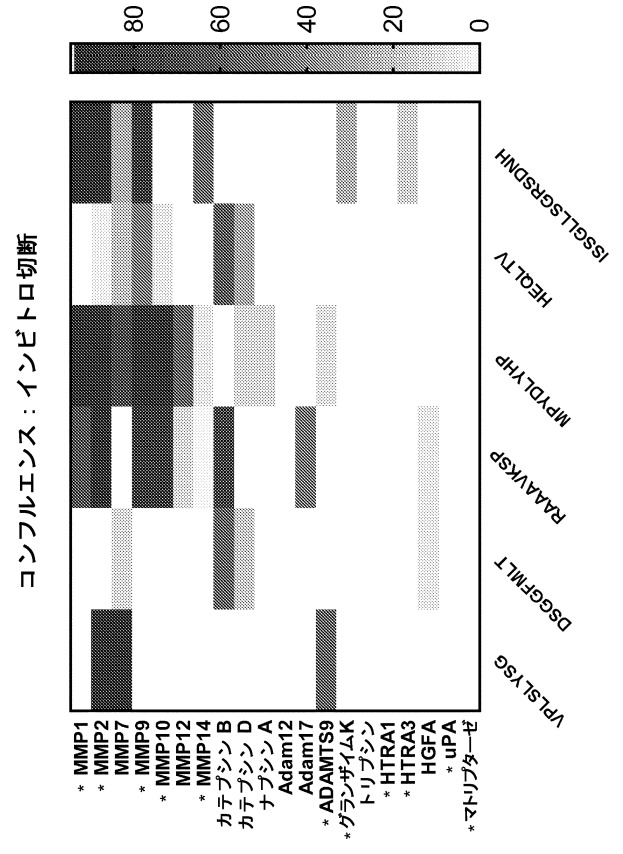
【図 2 4 D】



【図 2 4 E】



【図 2 4 F】



10

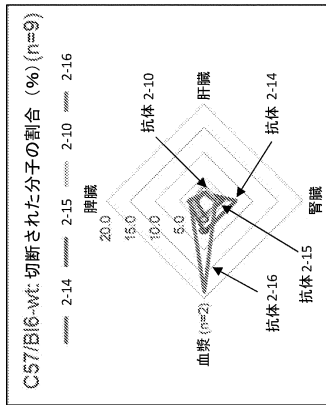
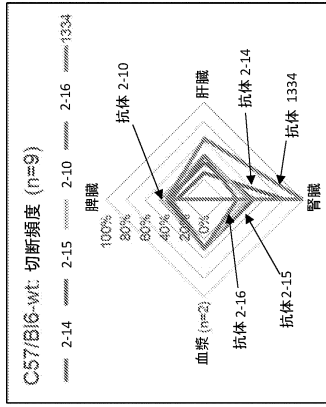
20

30

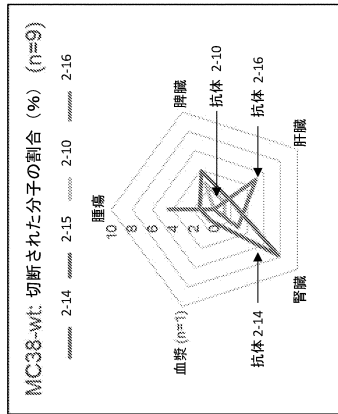
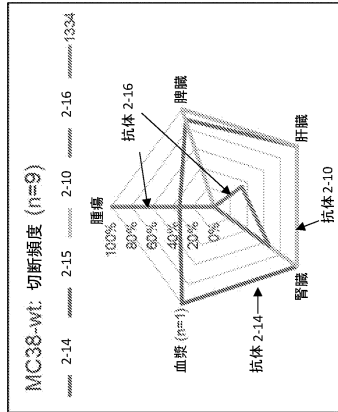
40

50

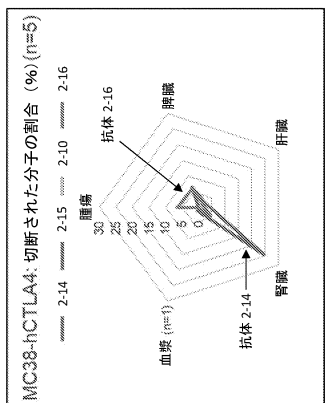
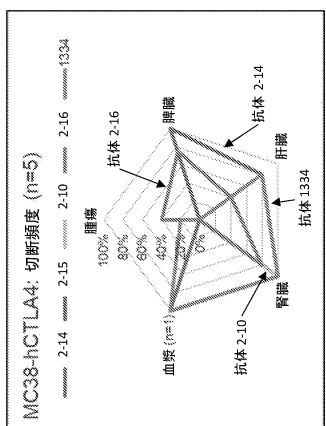
【図 2 5 A】



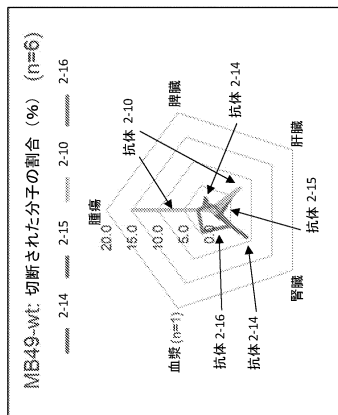
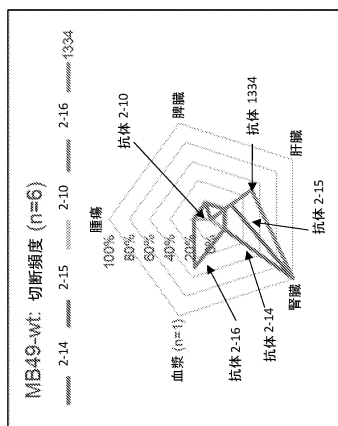
【図 2 5 B】



【図 2 5 C】



【図 2 5 D】



10

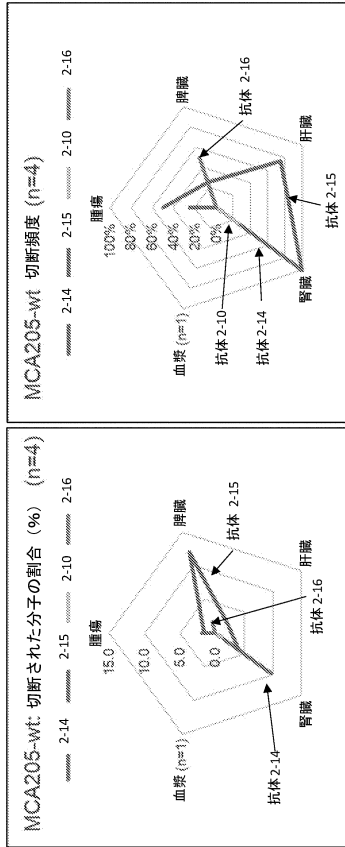
20

30

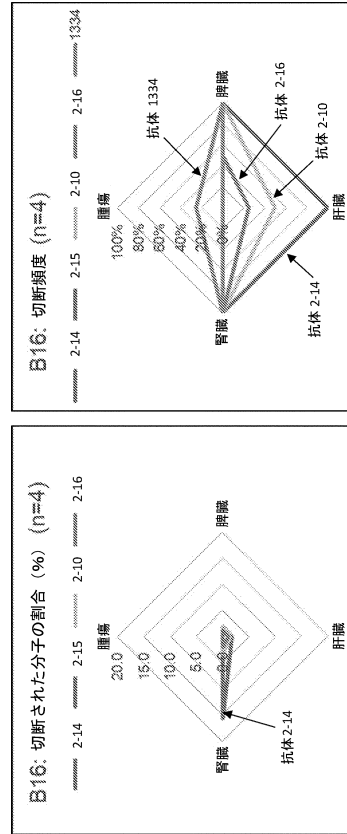
40

50

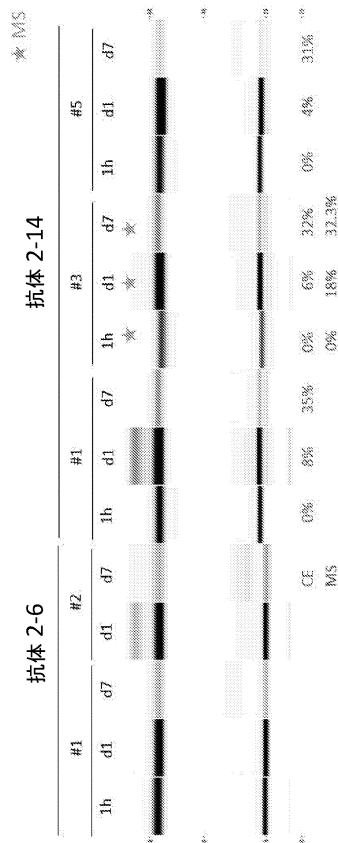
【図 2 5 E】



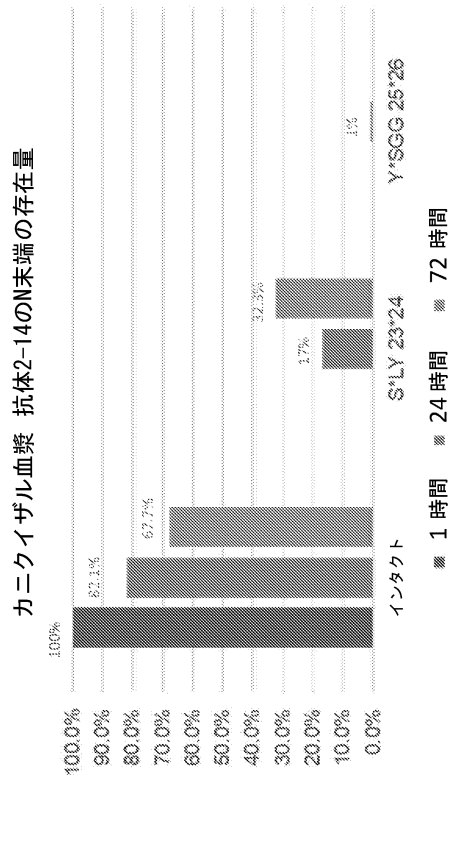
【図 2 5 F】



【図 2 6 A】



【図 2 6 B】



10

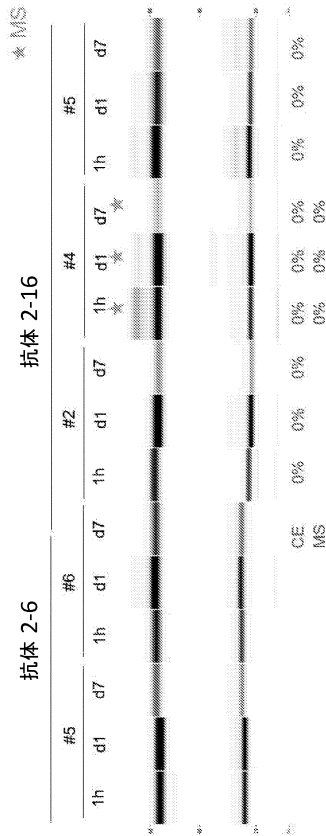
20

30

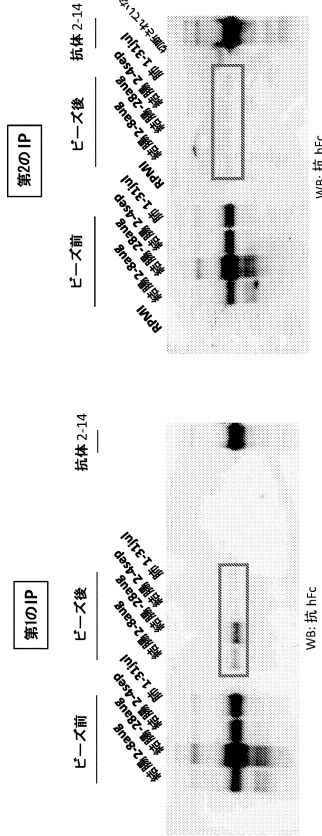
40

50

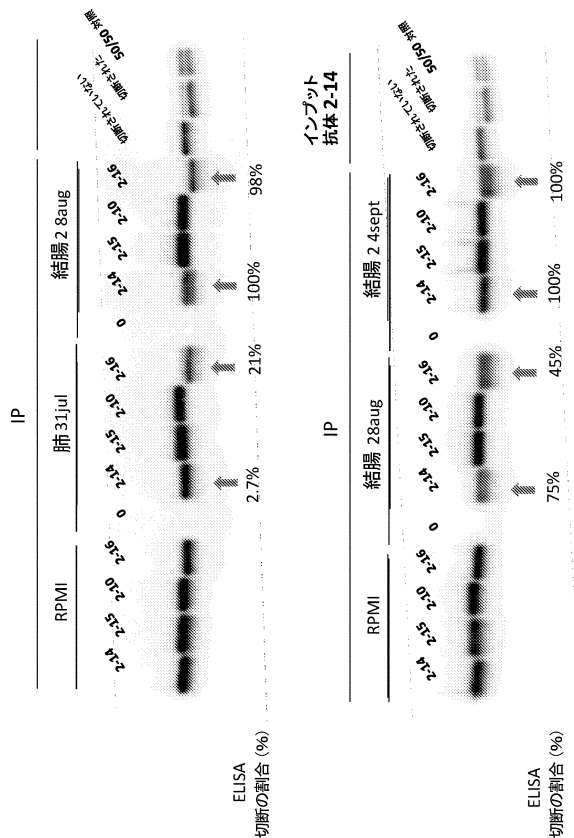
【図 2 6 C】



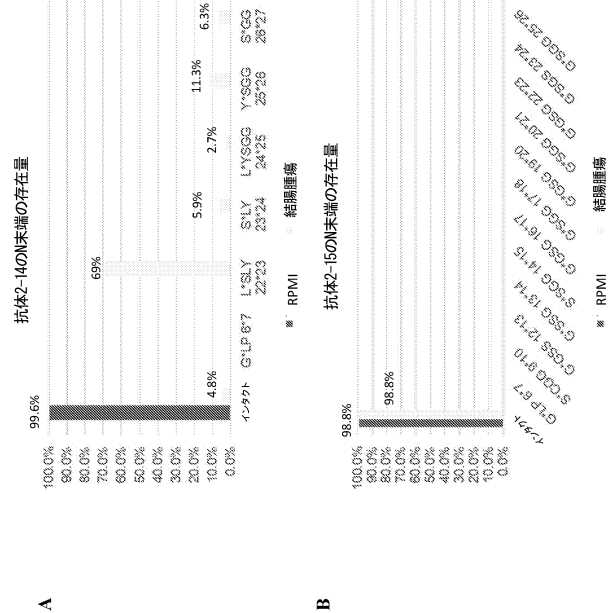
【図 2 7 A】



【図 2 7 B】



【図 2 8 - 1】



10

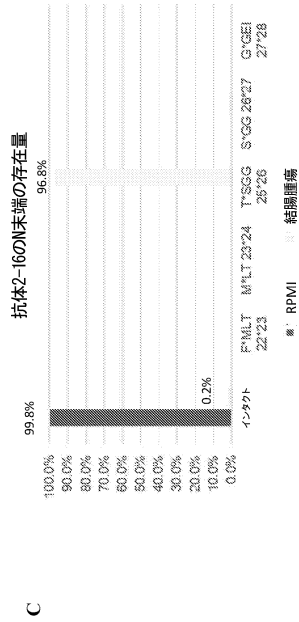
20

30

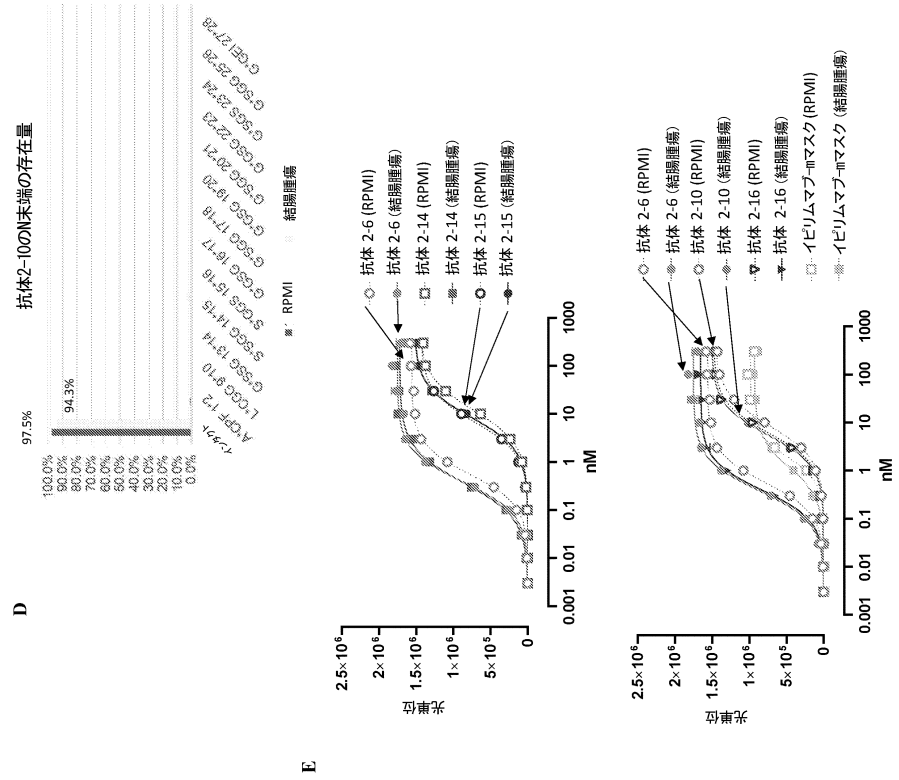
40

50

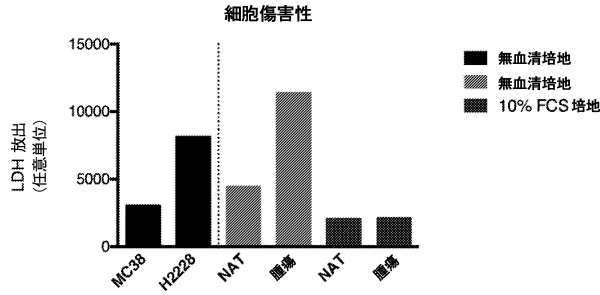
【図 28-2】



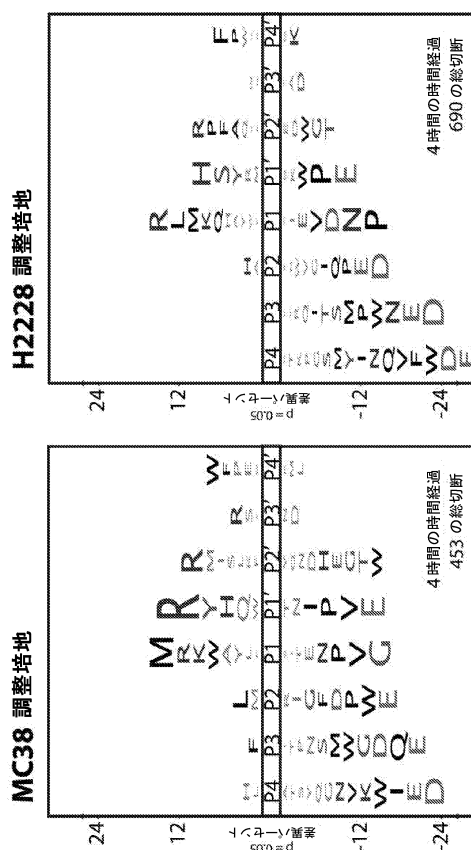
【図 28-3】



【図 29】



【図 30】



10

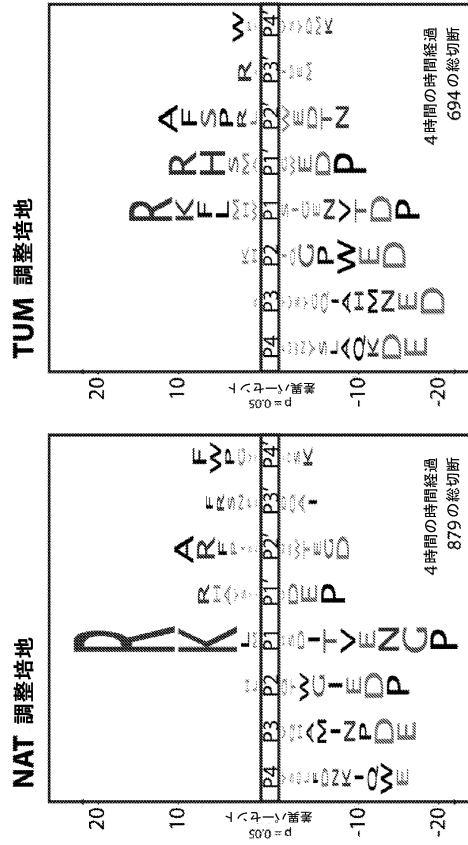
20

30

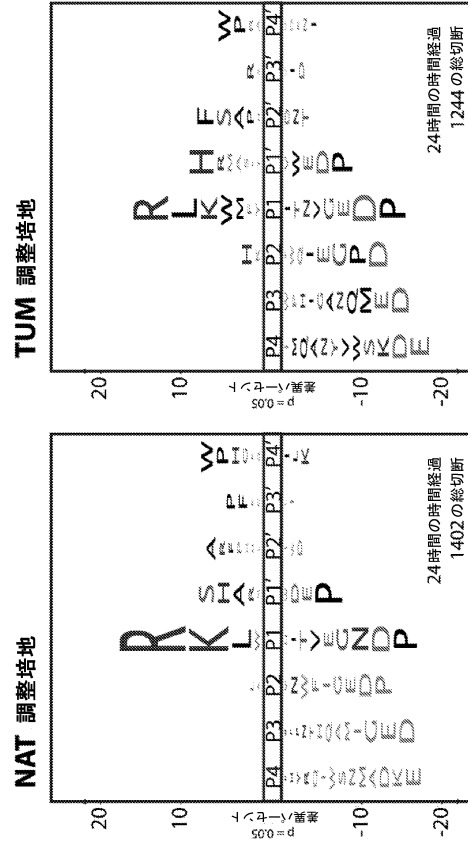
40

50

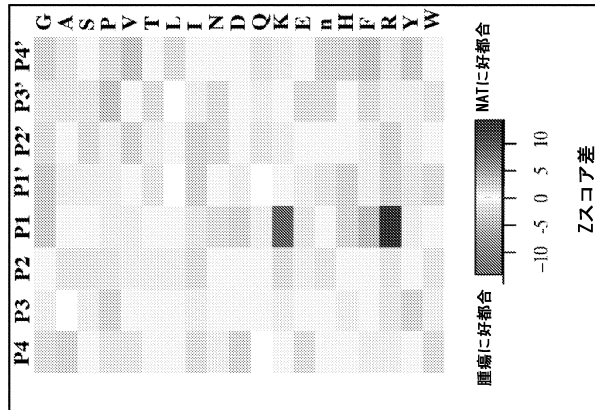
【図 3 1 A】



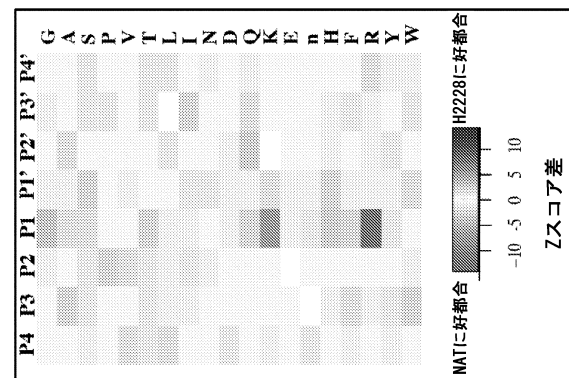
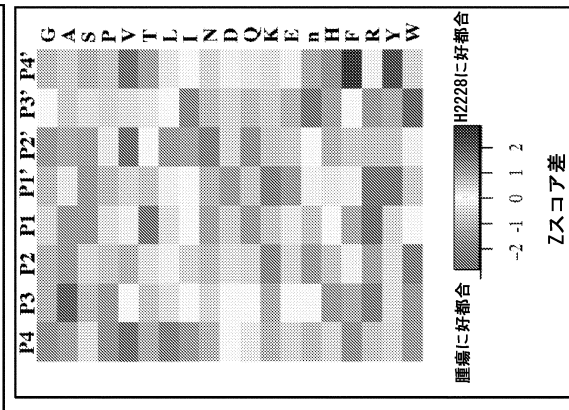
【図 3 1 B】

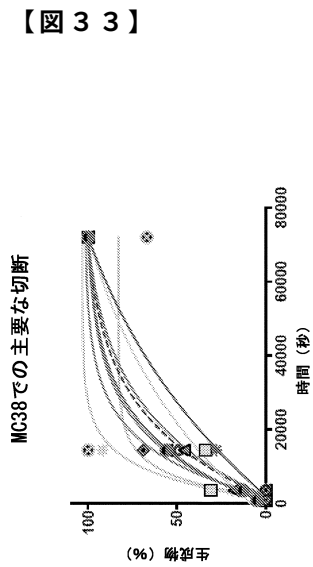
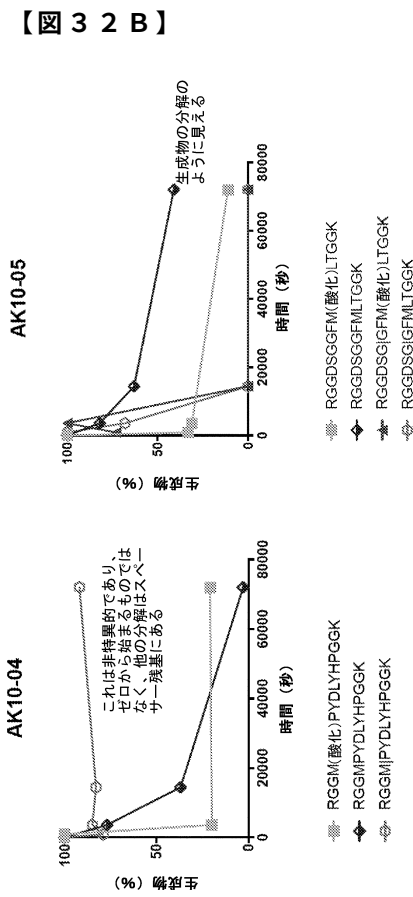
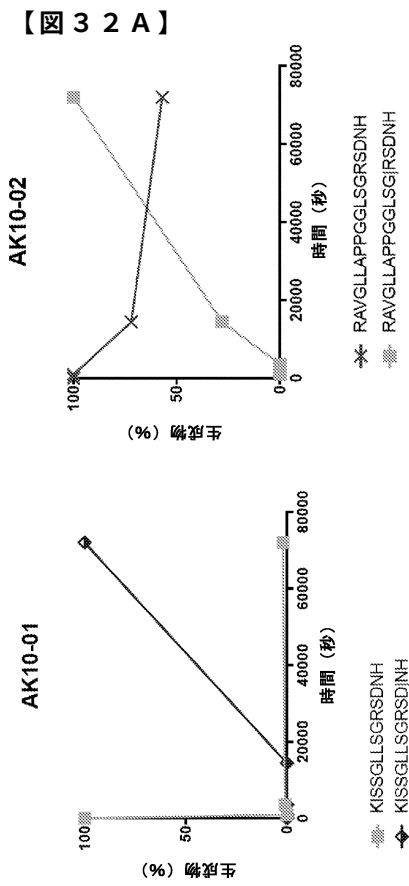


【図 3 1 C】

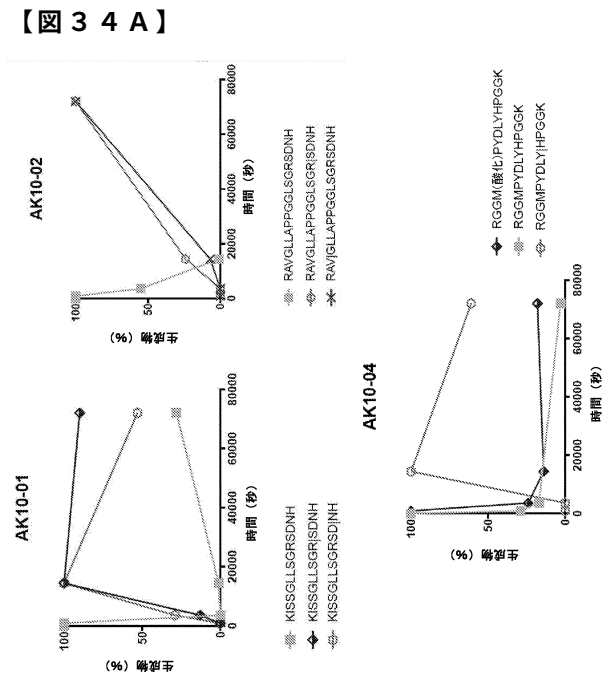


【図 3 1 D】





ペプチド	相対効率	r^2
MPYDLYHPRQA/RVVG	1.00	0.78
LS[GRSNAMPYDLYHP	0.79	0.97
LSG[RSNAMPYDLYHP	0.47	0.96
LSG[RSNAMPYDLYHP	0.36	0.99
MPYDLYHPRQA/RVVG	0.33	0.99
LSG[RSNAMPYDLYHP	0.29	0.98
LS[GRSNAMPYDLYHP	0.26	0.98
LSG[RSNAMPYDLYHP	0.12	0.93
RAVGLAPPGLSGRSDNH	0.10	0.99



10

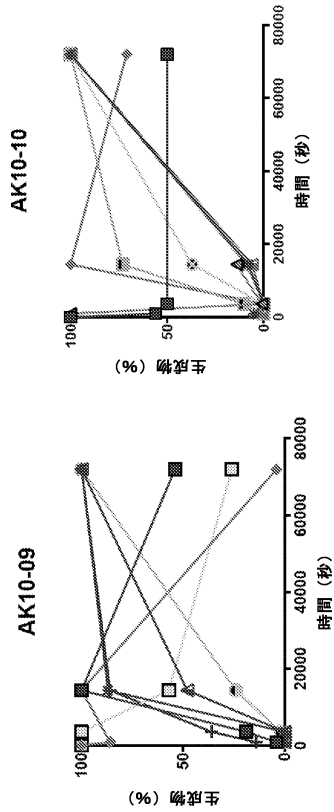
20

30

40

50

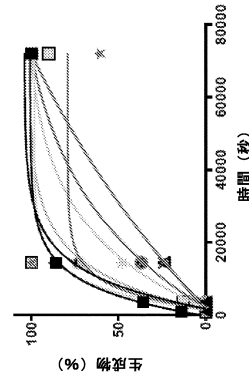
【図 3 4 B】



- M(酸化)PYDLYHPQARVWG
- ◆ M(酸化)PYDLYHPQARVWG
- M(酸化)PYDLYHPQARVWG
- ▲ MPYDLYHPQARVWG
- ▼ MPYDLYHPQARVWG
- MPYDLYHPQARVWG
- ◆ MPYDLYHPQARVWG
- LSGRSNAMPYDLYHP
- ◆ LSGRSNAMPYDLYHP
- LSGRSNAMPYDLYHP
- ◆ LSGRSNAMPYDLYHP
- ▲ LSGRSNAMPYDLYHP
- ▼ LSGRSNAMPYDLYHP
- LSGRSNAMPYDLYHP
- ◆ LSGRSNAMPYDLYHP

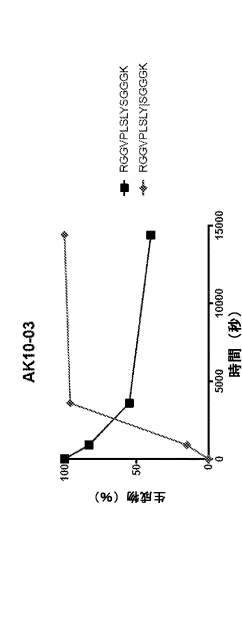
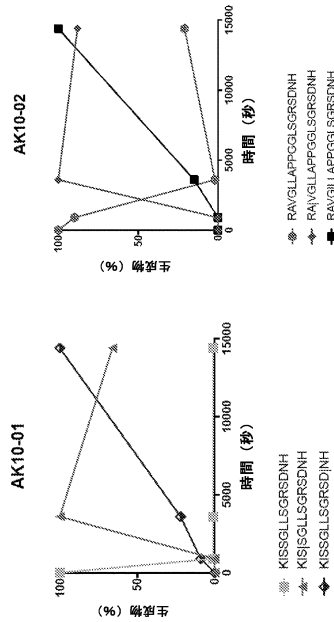
【図 3 5】

H2228での上位の切断

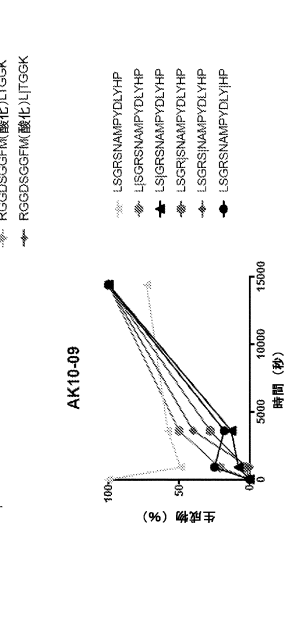
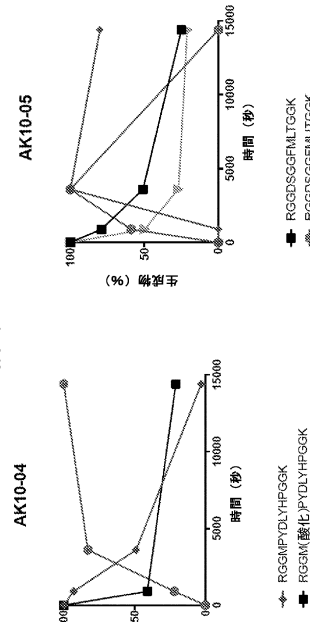


基質	相対効率	フィッティングなし	r^2
RGGMYPDYHPGGK	AK-04		
KISSGLLSGRISDNH	AK-01	1.00	0.92
LSGRSNAMPYDLYHP	AK-09	0.71	0.99
LSGRSNAMPYDLYHP	AK-09	0.85	0.93
MPYDLYHPQARVWG	AK-10	0.58	0.98
LSGRISNAM(酸化)PYDLYHP	AK-09	0.30	0.98
M(酸化)PYDLYHPQARVWG	AK-10	0.20	0.99
RAVGLLAPPGLSGRISDNH	AK-02	0.07	0.99
LSGRISNAMPYDLYHP	AK-09	0.06	0.99

【図 3 6 A】



【図 3 6 B】



10

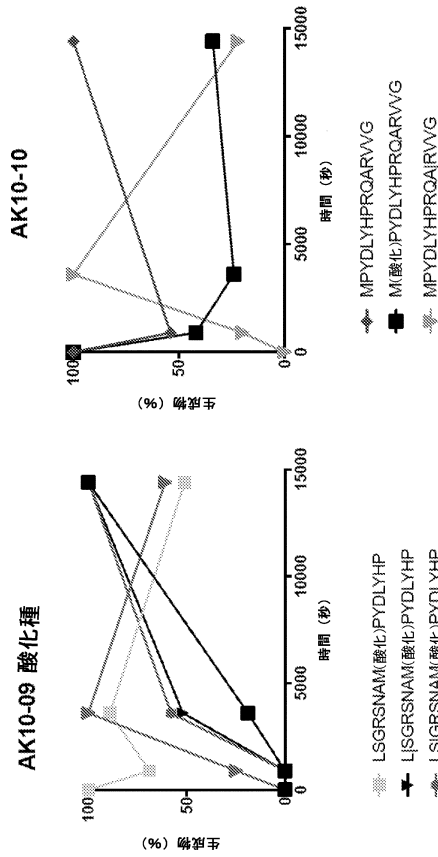
20

30

40

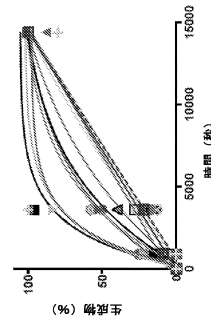
50

【図 3 6 C】



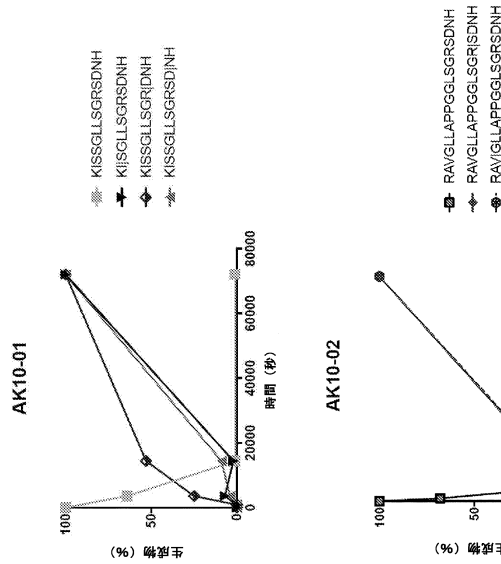
【図 3 6 D】

腫瘍での主要な切断

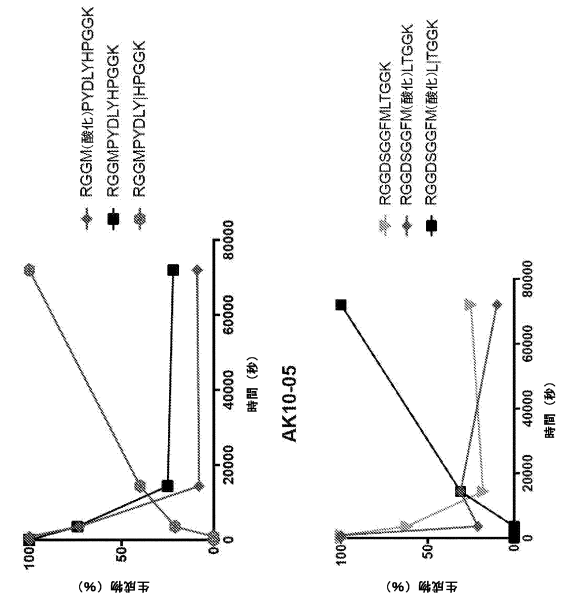


ペプチド	相対効率	r ²
RGDGGGFM(酸化)LTGGK	>1.00	フィッティングなし
RAVGLLAPPGGLSGRSNDH	>1.00	フィッティングなし
AK-02	>1.00	フィッティングなし
AK-05	>1.00	フィッティングなし
AK-03	1.00	0.78
AK-04	0.90	0.97
RGGMPLYDLYHPGGK	0.46	0.96
LSGRSNAM(酸化)PYDLYHP	0.38	0.99
AK-09	0.38	0.99
LJSGRSNAMPYDLYHP	0.23	0.99
AK-09	0.05	0.98
LSGRSNAMPYDLYHP	<0.01	フィッティングなし
AK-01	<0.01	フィッティングなし
KISSGLLSGRSDNH	<0.01	フィッティングなし
LSGRSNAMPYDLYHP	<0.01	フィッティングなし
AK-09	<0.01	フィッティングなし
LSGRSNAM(酸化)PYDLYHP	<0.01	フィッティングなし
AK-09	<0.01	フィッティングなし
LSGRSNAMPYDLYHP	<0.01	フィッティングなし

【図 3 7 A】



【図 3 7 B】



10

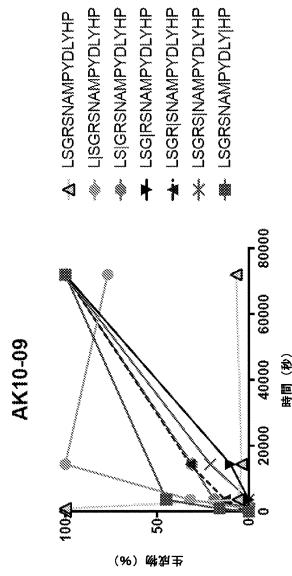
20

30

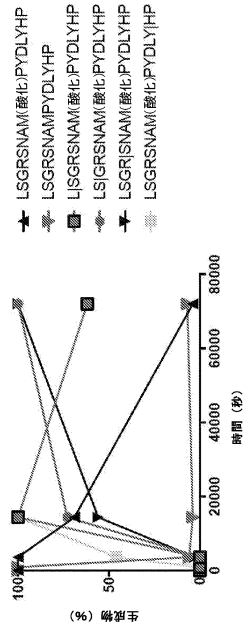
40

50

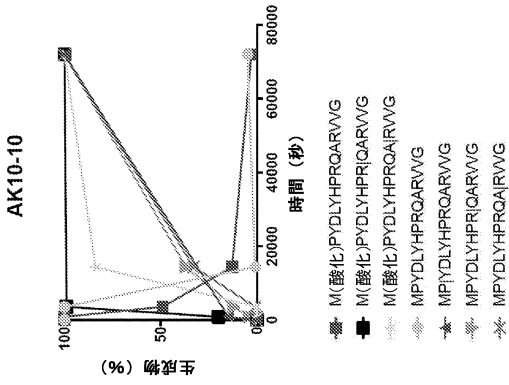
【図 3 7 C】



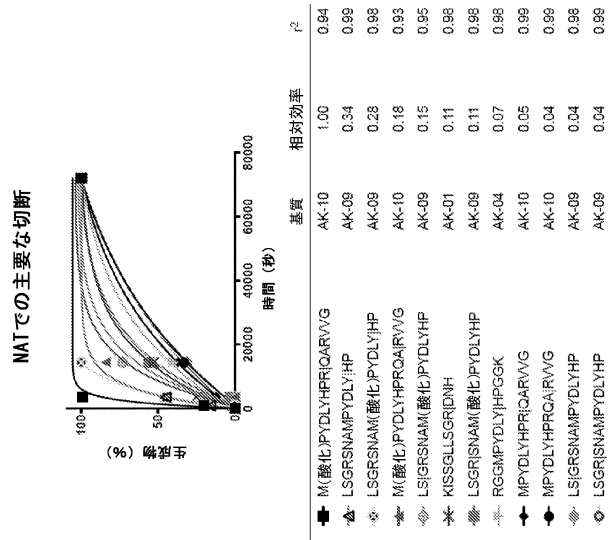
AK10-09 酸化種



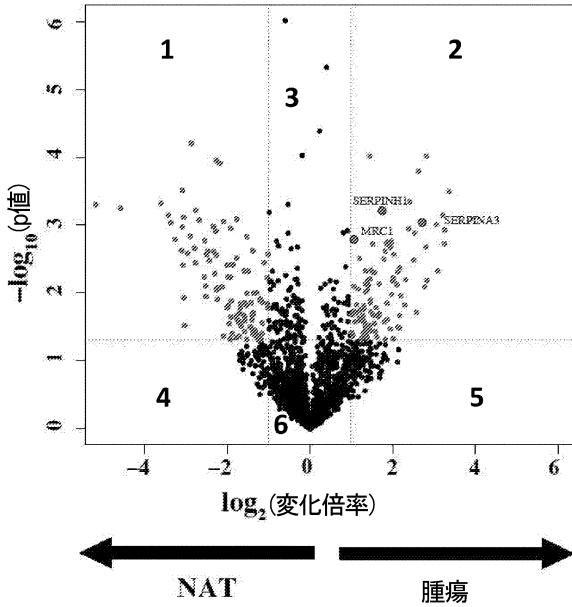
【図 3 7 D】



【図 3 7 E】



【図 3 8】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007680954000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	7/06	(2006.01)	C 0 7 K	7/06	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 3
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	C
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
			A 6 1 K	47/68	
			A 6 1 K	45/00	
			C 1 2 N	15/13	

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ウィリアムズ ジョン シー.

アメリカ合衆国 9 1 0 1 0 - 3 0 0 0 カリフォルニア州 ドゥアーテ イースト ドゥアーテ ロード 1 5 0 0 シティ オブ ホープ内

(72)発明者 カロウ マーガレット

アメリカ合衆国 0 2 4 5 1 マサチューセッツ州 ウォルサム ウィンター ストリート 8 2 8 キシリオ ディベロップメント インコーポレイテッド内

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 8 / 2 0 9 7 0 1 (WO, A 1)

JOSHUA M DONALDSON; ET AL, DESIGN AND DEVELOPMENT OF MASKED THERAPEUTIC ANTIBODIES TO LIMIT OFF-TARGET EFFECTS:APPLICATION TO ANTI-EGFR ANTIBODIES, CANCER BIOLOGY & THERAPY, 米国, 2009年11月15日, Vol. 8, No. 22, p. 2145-2150, <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.8.22.9765>KRISHNA R POLU; ET AL, PROBODY THERAPEUTICS FOR TARGETING ANTIBODIES TO DISEASED TISSUE, EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, 英国, 2014年08月, Vol. 14, No. 8, p. 1049-1053, <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2014.920814>

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C07K 16/00

C07K 19/00

C12P 21/00

C12N 15/00

C07K 14/00

C12N 5/10

C07K 7/06

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)