

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6915987号
(P6915987)

(45) 発行日 令和3年8月11日(2021.8.11)

(24) 登録日 令和3年7月19日(2021.7.19)

(51) Int.Cl.	F 1
C07K 19/00	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C12N 15/00	(2006.01)
	C07K 19/00
	C07K 7/06
	C07K 16/28
	C12N 15/00

請求項の数 14 (全 172 頁)

(21) 出願番号	特願2016-516911 (P2016-516911)
(86) (22) 出願日	平成26年9月25日 (2014.9.25)
(65) 公表番号	特表2016-538240 (P2016-538240A)
(43) 公表日	平成28年12月8日 (2016.12.8)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/057523
(87) 國際公開番号	W02015/048329
(87) 國際公開日	平成27年4月2日 (2015.4.2)
審査請求日	平成29年9月25日 (2017.9.25)
審判番号	不服2019-12676 (P2019-12676/J1)
審判請求日	令和1年9月24日 (2019.9.24)
(31) 優先権主張番号	61/882,377
(32) 優先日	平成25年9月25日 (2013.9.25)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	514270641 シトムクス セラピューティクス、インコ ーポレイティド アメリカ合衆国、カリフォルニア 940 80, サウス サンフランシスコ、オイス ター ポイント ブールバード 151, スイート 400
(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
(74) 代理人	100123582 弁理士 三橋 真二
(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(74) 代理人	100114018 弁理士 南山 知広

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】マトリックスメタロプロテイナーゼ基質及び他の切断可能部分並びにそれらの使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1 4のアミノ酸配列を含む、切斷可能部分(CM)を含む単離ポリペプチドであって、ここで、前記切斷可能部分が、マトリックス・メタロプロテアーゼのための基質である、単離ポリペプチド。

【請求項2】

前記CMが、MMP 1 4により切斷される、請求項1に記載の単離ポリペプチド。

【請求項3】

前記ポリペプチドが、標的と結合する抗体又はその抗原結合フラグメント(AB)を含み、

任意には、前記抗原結合フラグメントは、Fabフラグメント、F(ab)₂フラグメント、scFv、scAb、dAb、單一ドメイン重鎖抗体、及び单ードメイン軽鎖抗体から成る群から選択される、

請求項1又は2に記載の単離ポリペプチド。

【請求項4】

前記CMが、前記標的と組織において共局在するマトリックス・メタロプロテアーゼのための基質である、請求項3に記載の単離ポリペプチド。

【請求項5】

前記単離ポリペプチドがABを含むとき、前記ABが、前記CMに連結され、

任意には、前記単離ポリペプチドがABを含むとき、前記ABが、前記CMに直接連結

され、

任意には、前記単離ポリペプチドが A B を含むとき、前記 A B が、連結ペプチドを介して前記 C M に連結される、

請求項3又は4に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 6】

前記単離ポリペプチドが、マスキング部分 (M M) を含む、請求項3～5のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 7】

前記 M M が、標的への結合についての A B の平衡解離定数よりも高い、A B への結合についての平衡解離定数を有する、請求項6に記載の単離ポリペプチド。 10

【請求項 8】

前記 M M が、40 個以下のアミノ酸の長さのポリペプチドである、請求項6又は7に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 9】

前記 M M が前記 C M に結合されて、未切断状態での前記単離ポリペプチドが、以下の N - 末端から C - 末端への構造配置：

M M - C M - A B 又は A B - C M - M M

を含む、請求項6～8のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 10】

前記単離ポリペプチドが、前記 M M と前記 C M との間に連結ペプチドを含み、かつ / 又は、 20

前記単離ポリペプチドが、前記 C M と前記 A B との間に連結ペプチドを含む、請求項9に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 11】

前記単離ポリペプチドが、第 1 連結ペプチド (L P 1) 及び第 2 連結ペプチド (L P 2)) を含み、そして

未切断状態での前記単離ポリペプチドが、以下の N - 末端から C - 末端への構造配置：

M M - L P 1 - C M - L P 2 - A B、又は A B - L P 2 - C M - L P 1 - M M

を有し、

任意には、前記 2 種の連結ペプチドが、お互いに同一である必要はない、

請求項7～10のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。 30

【請求項 12】

各 L P 1 及び L P 2 が、約 1 ～ 20 個のアミノ酸の長さのペプチドである、請求項11に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 13】

前記 M M のアミノ酸配列が、前記標的の配列とは異なり、そして前記 A B の天然の結合パートナーのアミノ酸配列に対して 50 % 以下の同一性である、請求項7～12のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 14】

前記単離ポリペプチドが切断された状態であるとき、前記 M M は、標的への結合について、前記 A B に干渉しないか、又は前記 A B と競合しない、請求項7～13のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。 40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2013年9月25日に提出された米国特許仮出願第 61/882,377 号及び 2014 年 3 月 27 日に提出された米国特許仮出願第 61/971,332 号の利益を主張し、その内容は参照により全体が本明細書に組込まれる。

【0002】

本発明は一般的に、少なくとも1つのマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)のための基質である切断可能部分を含むポリペプチド、少なくとも1つのMMPプロテアーゼのための基質である切断可能部分を含む活性化可能抗体及び他の大分子、及び少なくとも1つのMMPプロテアーゼのための基質である切断可能部分を含むそれらのポリペプチドの製造方法及び種々の治療的、診断的及び予防的適用のためへのそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

プロテアーゼは、アミノ酸残基間のペプチド結合を切斷することにより、タンパク質を分解する酵素である。プロテアーゼは天然において、すべての生物に存在し、そして単純な分野から高度に制御された経路までの種々の生理的反応に関与している。いくつかのプロテアーゼは、タンパク質内の特定のアミノ酸配列の存在に基づいて、特定のペプチド結合を分離することが知られている。10

【0004】

従って、プロテアーゼのための新規基を同定し、そして種々の治療的、診断的及び予防的適用のためにそれらの基質を使用する必要性が存在する。

【発明の概要】

【0005】

本開示は、少なくとも1つのマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)のための基質である切断可能部分(CM)を含むアミノ酸配列を提供する。それらのCMは、種々の治療的、診断的及び予防的適用において有用である。20

【0006】

いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくとも1つのマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)のための基質である。MMPの例としては、次のものを包含する：MMP1；MMP2；MMP3；MMP7；MMP8；MMP9；MMP10；MMP11；MMP12；MMP13；MMP14；MMP15；MMP16；MMP17；MMP19；MMP20；MMP23；MMP24；MMP26；及びMMP27。いくつかの実施形態によれば、CMは、MMP9、MMP14、MMP1、MMP3、MMP13、MMP17、MMP11、及びMMP19のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CMは、MMP9のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CMは、複数のMMPのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくともMMP9及びMMP14のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CMは、同じMMPのための複数の基質を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくとも複数のMMP9基質を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくとも複数のMMP14基質を含む。30

【0007】

いくつかの実施形態によれば、CMは、MMPのための基質であり、そして配列ISSGLLSS(配列番号14)；QNQALRMA(配列番号15)；AQNLGLGMV(配列番号16)；STFPFGMF(配列番号17)；PVGYTSSL(配列番号18)；DWLYWPGI(配列番号19)；MIAPVAYR(配列番号20)；RPSPMWA(配列番号21)；WATPRPMR(配列番号22)；FRLLDWQW(配列番号23)；LKAAPRWA(配列番号24)；GPSHLVL(配列番号25)；LPGGLSPW(配列番号26)；MGLFSEAG(配列番号27)；SPLPLRVP(配列番号28)；RMHLLRSLG(配列番号29)；LAAPLGLL(配列番号30)；AVGLLAPP(配列番号31)；LLAPSHRA(配列番号32)；PAGLWLDP(配列番号33)；及び/又はISSGGLSS(配列番号159)を包含する。40

【0008】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列ISSGGLLSS(配列番号14)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列QNQALRMA(配列番号15)を含む。50

番号 15) を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列AQNL LGMV (配列番号16)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列STFPFGMF (配列番号17)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列PVGYTSSL (配列番号18)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列DWLYWPGI (配列番号19)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列MIAPVAYR (配列番号20)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列RPSPMWAY (配列番号21)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列WATPRPMR (配列番号22)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列FRLLDWQW (配列番号23)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列LKAAPRWA (配列番号24)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列GPSHLVLT (配列番号25)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列LPGGLSPW (配列番号26)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列MGLFSEAG (配列番号27)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列SPLPLRVP (配列番号28)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列RMHLLRSLG (配列番号29)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列LAAPLGLL (配列番号30)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列AVGLLAPP (配列番号31)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列LLAPSHRA (配列番号32)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列PAGLWLDP (配列番号33)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列ISSGLSS (配列番号159)を含む。
10
20

【0009】

いくつかの実施形態によれば、CMは、抗体に連結されるか、又は他方では、結合される。例えば、CMは所定の標的を結合する抗体又はその抗原結合フラグメント(AB)に1又は2以上の剤を連結するために使用され、結果的に、CMは、MMPに暴露される場合、切断され、そして剤がABから放出される。典型的な標的は、表1に示される標的を包含するが、但しそれらだけには制限されない。典型的なABは、表2に示される標的を包含するが、但しそれらだけには制限されない。いくつかの実施形態によれば、未切断状態での抗体は、次のような、N-末端からC-末端への構造配置を有する：剤-CM-AB又はAB-M-剤。いくつかの実施形態によれば、抗体は、ABとCMとの間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、抗体は、CMと接合された剤との間に連結ペプチドを含む。
30

【0010】

いくつかの実施形態によれば、抗体は、第1連結ペプチド(LP1)及び第2連結ペプチド(LP2)を含み、そして未切断状態での抗体は、次のような、N-末端からC-末端への構造配置を有する：剤-LP1-CM-LP2-AB又はAB-LP2-CM-LP1-剤。いくつかの実施形態によれば、各LP1及びLP2は、約1~20個の長さのアミノ酸のペプチドである。いくつかの実施形態によれば、2種の連結ペプチドは、お互い同一である必要はない。
40

【0011】

いくつかの実施形態によれば、LP1又はLP2の少なくとも1つは、(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(配列番号1)及び(GGGGS)_n(配列番号2)(nは少なくとも1つの整数である)から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0012】

いくつかの実施形態によれば、LP1又はLP2の少なくとも1つは、GGSG(配列番号3)、GGSGG(配列番号4)、GS GSG(配列番号5)、GSGGG(配列番号6)、GGGSG(配列番号7)、及びGSSSG(配列番号8)から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0013】

いくつかの実施形態によれば、L P 1は、アミノ酸配列G S S G G S G G S G G S G (配列番号9)、G S S G G S G G S G G (配列番号10)、G S S G G S G G S G G S (配列番号11)、G S S G G S G G S G G G S (配列番号155)、G S S G G S G G S G (配列番号156)、又はG S S G G S G G S G S (配列番号157)を含む。

【0014】

いくつかの実施形態によれば、L P 2は、アミノ酸配列G S S、G G S、G G G S (配列番号158)、G S S G T (配列番号12)又はG S S G (配列番号13)を含む。

【0015】

いくつかの実施形態によれば、A Bは、標的への結合のために、約100nM又はそれ以下の平衡解離定数を有する。

10

【0016】

いくつかの実施形態によれば、抗体は、標的を特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態によれば、標的を結合する抗体又はその免疫学的活性フラグメントは、モノクローナル抗体、ドメイン、抗体、一本鎖、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、scFv、scAb, dAb、單一ドメインH鎖抗体、及び單一ドメインL鎖抗体である。いくつかの実施形態によれば、標的を結合するそのような抗体又はその免疫学的活性フラグメントは、マウス、他の齧歯類、ヒト化又は完全ヒトモノクローナル抗体である。

【0017】

いくつかの実施形態によれば、MMPプロテアーゼは、組織において標的と共に局在化され、そしてMMPプロテアーゼは、抗体がプロテアーゼに暴露される場合、抗体におけるCMを切断する。

20

【0018】

いくつかの実施形態によれば、CMは、15個までの長さのアミノ酸のポリペプチドである。

【0019】

いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくとも1つのマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)のための基質である。MMPの例としては、次のものを包含する：MMP1; MMP2; MMP3; MMP7; MMP8; MMP9; MMP10; MMP11; MMP12; MMP13; MMP14; MMP15; MMP16; MMP17; MMP19; MMP20; MMP23; MMP24; MMP26; 及び MMP27。いくつかの実施形態によれば、CMは、MMP9、MMP14、MMP1、MMP3、MMP13、MMP17、MMP11、及びMMP19のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CMは、MMP9のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CMは、複数のMMPのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくともMMP9及びMMP14のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CMは、同じMMPのための複数の基質を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくとも複数のMMP9基質を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくとも複数のMMP14基質を含む。

30

【0020】

いくつかの実施形態によれば、CMは、MMPのための基質であり、そして配列I S S G L L S S (配列番号14); Q N Q A L R M A (配列番号15); A Q N L L G M V (配列番号16); S T F P F G M F (配列番号17); P V G Y T S S L (配列番号18); D W L Y W P G I (配列番号19); M I A P V A Y R (配列番号20); R P S P M W A Y (配列番号21); W A T P R P M R (配列番号22); F R L L D W Q W (配列番号23); L K A A P R W A (配列番号24); G P S H L V L T (配列番号25); L P G G L S P W (配列番号26); M G L F S E A G (配列番号27); S P L P L R V P (配列番号28); R M H L R S L G (配列番号29); L A A P L G L L (配列番号30); A V G L L A P P (配列番号31); L L A P S H R A (配列番号32); P A G L W L D

40

50

P (配列番号 33); 及び/又は I S S G L S S (配列番号 159)を包含する。

【0021】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 I S S G L L S S (配列番号 14)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 Q N Q A L R M A (配列番号 15)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 A Q N L L G M V (配列番号 16)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 S T F P F G M F (配列番号 17)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 P V G Y T S S L (配列番号 18)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 D W L Y W P G I (配列番号 19)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 M I A P V A Y R (配列番号 20)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 R P S P M W A Y (配列番号 21)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 W A T P R P M R (配列番号 22)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 F R L L D W Q W (配列番号 23)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 L K A A P R W A (配列番号 24)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 G P S H L V L T (配列番号 25)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 L P G G L S P W (配列番号 26)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 M G L F S E A G (配列番号 27)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 S P L P L R V P (配列番号 28)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 R M H L R S L G (配列番号 29)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 L A A P L G L L (配列番号 30)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 A V G L L A P P (配列番号 31)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 L L A P S H R A (配列番号 32)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 P A G L W L D P (配列番号 33)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 I S S G L S S (配列番号 159)を含む。10

【0022】

いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくとも 1 つのマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) のための基質であり、そして MMP 9 により認識されるモチーフ配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくとも 1 つの MMP のための基質であり、そして MMP 14 により認識されるモチーフ配列を含む。30

【0023】

いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくとも 1 つの MMP のための基質であり、そして CM ポリペプチド、及び/又は CM を含む任意のポリペプチドの CM 部分は、50 未満の長さのアミノ酸、40 未満の長さのアミノ酸、30 未満の長さのアミノ酸、25 未満の長さのアミノ酸、20 未満の長さのアミノ酸、19 未満の長さのアミノ酸、18 未満の長さのアミノ酸、17 未満の長さのアミノ酸、16 未満の長さのアミノ酸、15 未満の長さのアミノ酸、14 未満の長さのアミノ酸、13 未満の長さのアミノ酸、12 未満の長さのアミノ酸、11 未満の長さのアミノ酸、又は 10 未満の長さのアミノ酸を有するポリペプチドを含む。40

【0024】

いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくとも 1 つの MMP のための基質であり、そして同じ MMP プロテアーゼにより、天然において切断される任意のヒトポリペプチド配列とは実質的に同一ではないポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくとも 1 つの MMP のための基質であり、そして同じ MMP プロテアーゼにより、天然において切断される任意のヒトポリペプチド配列に対して、せいぜい 90% 又はそれ以上、同一であるポリペプチド配列を含む。

【0025】

いくつかの実施形態によれば、モチーフ配列は、少なくとも MMP のための基質であり、そして下記表 8A - 8M に示されるコアー CM コンセンサス配列を含む。いくつかの実50

施形態によれば、モチーフ配列は、下記表 8 A - 8 M に示されるコア - CM コンセンサス配列の下位部類、すなわち下位組を含む。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態によれば、モチーフ配列は、少なくとも MMP 9 のための基質であり、そして表 8 A - 8 D に示されるコア - CM コンセンサス配列を含む。いくつかの実施形態によれば、モチーフ配列は、少なくとも MMP 9 のための基質であり、そして下記表 8 A - 8 D に示されるコア - CM コンセンサス配列の下位部類、すなわち下位組を含む。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態によれば、モチーフ配列は、少なくとも MMP 14 のための基質であり、そして表 8 E - 8 M に示されるコア - CM コンセンサス配列を含む。いくつかの実施形態によれば、モチーフ配列は、少なくとも MMP 14 のための基質であり、そして下記表 8 E - 8 M に示されるコア - CM コンセンサス配列の下位部類、すなわち下位組を含む。

【 0 0 2 8 】

表 8 A . MMP 9 切断可能コア - CM コンセンサス配列 1

【 表 1 】

コアCMコンセンサス 1	コアCMコンセンサス 1 (subgenus)
X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (配列番号317), (式中、 X ₂₂ はA, C, D, G, H, L, P, R, 又はS; X ₂₃ はL, M, P, S, 又は T; X ₂₄ はA, D, F, G, L, M, N, P, R, S, T, 又はV; X ₂₅ はA, D, E, G, H, I, M, P, S, 又はV; X ₂₆ はA, C, D, G, L, M, N, R, V, W, 又は Y; X ₂₇ はC, F, G, H, P, Q, R, T, V, 又はW; X ₂₈ はA, D, G, L, M, S, T, V, 又はY; 及び X ₂₉ はC, H, L, R, S, V, W, 又はYである。)	Subgenus1.1 : X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (配列番号318) , (式中、X ₂₂ はG, P, R, 又はS; X ₂₃ はP又はS; X ₂₄ はL, M, P, 又はS; X ₂₅ はA, G, P, 又はS; X ₂₆ はL, M, 又はR; X ₂₇ はG又はW; X ₂₈ はA, G, S, 又はY; 及びX ₂₉ はL, R, V, 又はYである。) Subgenus1.2 : X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (配列番号319) , (式中、X ₂₂ はG, P又はR; X ₂₃ はP; X ₂₄ はL, M又はS; X ₂₅ はG, P, 又はS; X ₂₆ はL, M, 又はR; X ₂₇ はW; X ₂₈ はA, G, 又はS; 及びX ₂₉ はR, V, 又はYである。) Subgenus1.3 : X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (配列番号320) , (式中、X ₂₂ はP又はR; X ₂₃ はP; X ₂₄ はM又はS; X ₂₅ はG又はP; X ₂₆ はL, M, 又はR; X ₂₇ はW; X ₂₈ はA, G, 又はS; 及びX ₂₉ はR, V, 又はYである。) Subgenus1.4 : X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (配列番号321) , (式中、X ₂₂ はP又はR; X ₂₃ はP; X ₂₄ はS; X ₂₅ はG又はP; X ₂₆ はM, 又はR; X ₂₇ はW; X ₂₈ はA, G, 又はS; 及びX ₂₉ はV又はYである。) Subgenus1.5 : X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (配列番号322) , (式中、X ₂₂ はP又はR; X ₂₃ はP; X ₂₄ はS; X ₂₅ はG又はP; X ₂₆ はM, 又はR; X ₂₇ はW; X ₂₈ はA又はS; 及びX ₂₉ はYである。) Subgenus1.6 : X ₂₂ X ₂₃ X ₂₄ X ₂₅ X ₂₆ X ₂₇ X ₂₈ X ₂₉ (配列番号323) , (式中、X ₂₂ はC, G, H, L, 又はR; X ₂₃ はP, S又はT; X ₂₄ はN, R, S又はT; X ₂₅ はP又はS; X ₂₆ はC, M, R, V, 又はW; X ₂₇ はC, P, R, 又はW; X ₂₈ はA, D, 又はG; 及びX ₂₉ はC又はYである。)

【 0 0 2 9 】

表 8 B . MMP 9 切断可能コア - CM コンセンサス配列 2

【表2】

コアCMコンセンサス2	コアCMコンセンサス2 (subgenus)
$X_{32} X_{33} X_{34} X_{35} X_{36} X_{37} X_{38} X_{39}$ (配列番号324) , (式中、 X_{32} はF, G, V, 又はW; X_{33} はA, D, L, M, P, R, T, 又はV; X_{34} はC, G, H, L, Q, S, T, W, X_{35} はD, G, L, P; X_{36} はE, G, I, L, N, P, R, 又はV; X_{37} はG, L, P, R, S, 又はV; X_{38} はA, I, L, M, T, 又はV; 及び X_{39} はA, G, L, P, Q, R, S, 又はVである。)	Subgenus2.1 : $X_{32} X_{33} X_{34} X_{35} X_{36} X_{37} X_{38} X_{39}$ (配列番号325) , (式中、 X_{32} はW; X_{33} はD, P, 又はT; X_{34} はH, Q, 又はW; X_{35} はD又はP; X_{36} はI又はR; X_{37} はS; X_{38} はL, M, 又はV; 及び X_{39} はG, L, 又はSである。)
	Subgenus2.2 : $X_{32} X_{33} X_{34} X_{35} X_{36} X_{37} X_{38} X_{39}$ (配列番号326) , (式中、 X_{32} はW; X_{33} はD; X_{34} はH, Q, 又はW; X_{35} はD又はP; X_{36} はI又はR; X_{37} はG, S又はV; X_{38} はL, M, 又はV; 及び X_{39} はG, L, 又はSである。)
	Subgenus2.3 : $X_{32} X_{33} X_{34} X_{35} X_{36} X_{37} X_{38} X_{39}$ (配列番号327) , (式中、 X_{32} はW; X_{33} はD; X_{34} はH, Q, 又はW; X_{35} はP; X_{36} はI又はR; X_{37} はS; X_{38} はL, M, 又はV; 及 び X_{39} はLである。)

10

20

【0030】

表8 C.MMP9切断可能コア-CMコンセンサス配列3

【表3】

コアCMコンセンサス3	コアCMコンセンサス3 (subgenus)
$X_{42} X_{43} X_{44} X_{45} X_{46} X_{47} X_{48} X_{49}$ (配列番号329) , (式中、 X_{42} はG, I, L, M, P, R, S, T, 又はV; X_{43} はA, D, H, I, L, P, S, 又はT; X_{44} はF, L, S, 又はV; X_{45} はH, L, M, P, Q, R, S, 又はT; X_{46} はA, D, F, G, L, M, R, S, T, 又はV; X_{47} はA, C, G, H, Q, T又はY; X_{48} はC, G, I, M, R, S, T, V, 又はW; 及び X_{49} はF, L, S, 又はYで ある。)	Subgenus3.1 : $X_{42} X_{43} X_{44} X_{45} X_{46} X_{47} X_{48} X_{49}$ (配列番号330) , (式中、 X_{42} はI, L, M, 又はS; X_{43} はD, P, S, 又 はT; X_{44} はF, L, S, 又はV; X_{45} はL, P, 又是S; X_{46} 是A, F, R, S, 又是T; X_{47} 是G, H, T又是Y; X_{48} 是G, I, M, V, 又是W; 及び X_{49} 是F, L, 又是Sである。) 10
	Subgenus3.2 : $X_{42} X_{43} X_{44} X_{45} X_{46} X_{47} X_{48} X_{49}$ (配列番号331) , (式中、 X_{42} 是L, M, 又是S; X_{43} 是S又是T; X_{44} 是F 又是L; X_{45} 是P; X_{46} 是A, F, 又是T; X_{47} 是G, H, T 又是Y; X_{48} 是I, M, 又是W; 及び X_{49} 是Fである。)
	Subgenus3.3 : $X_{42} X_{43} X_{44} X_{45} X_{46} X_{47} X_{48} X_{49}$ (配列番号332) , (式中、 X_{42} 是L, M, 又是S; X_{43} 是S又是T; X_{44} 是F ; X_{45} 是P; X_{46} 是A, F, 又是T; X_{47} 是G, H, 又是Y; X_{48} 是I, M, 又是W; 及び X_{49} 是Fである。)
	Subgenus3.4 : $X_{42} X_{43} X_{44} X_{45} X_{46} X_{47} X_{48} X_{49}$ (配列番号333) , (式中、 X_{42} 是L又是M; X_{43} 是S又是T; X_{44} 是F; X_{45} 是P; X_{46} 是A又是T; X_{47} 是H又是Y; X_{48} 是I又是W; 及 び X_{49} 是Fである。) 20
	Subgenus3.5 : $X_{42} X_{43} X_{44} X_{45} X_{46} X_{47} X_{48} X_{49}$ (配列番号334) , (式中、 X_{42} 是G, I, R, 又是S; X_{43} 是H又是T; X_{44} 是F, L, S, 又是V; X_{45} 是L, P, 又是R; X_{46} 是F, L, 又是S; X_{47} 是A, C, 又是G; X_{48} 是I, M, 又是V; 及 び X_{49} 是F又是Lである。)
	Subgenus3.6 : $X_{42} X_{43} X_{44} X_{45} X_{46} X_{47} X_{48} X_{49}$ (配列番号335) , (式中、 X_{42} 是S; X_{43} 是T; X_{44} 是F又是V; X_{45} 是L又是 P; X_{46} 是F又是L; X_{47} 是G; X_{48} 是I又是M; 及び X_{49} 是F である。) 30

【0031】

表8 D.MMP9切断可能コア-CMコンセンサス配列4

【表4】

コアCMコンセンサス4	コアCMコンセンサス4 (subgenus)
$X_{52} X_{53} X_{54} X_{55} X_{56} X_{57} X_{58} X_{59}$ (配列番号340), (式中、 X_{52} はD, G, H, L, N, P, Q, R, S, W, 又は Y X_{53} はA, C, D, G, L, R, V, W, 又はY; X_{54} はD, H, L, P, Q, R, S, 又はY; X_{55} はD, F, H, I, L, M, P, S, 又はY; X_{56} はA, C, E, F, G, K, M, R, S, V, 又は W; X_{57} はA, G, K, L, M, N, P, R, S, 又はT; X_{58} はA, F, G, H, L, P, R, S, 又はT; 及び X_{59} はA, G, H, I, N, P, S, T, 又はYである 。)	Subgenus4.1 : $X_{52} X_{53} X_{54} X_{55} X_{56} X_{57} X_{58} X_{59}$ (配列番号341) , (式中、 X_{52} はD, G, H, L, P, Q, S, 又はY X_{53} はD, W, 又はY; X_{54} はH, L, 又はR; X_{55} はH, L, M , P, 又はY; X_{56} はE, F, G, M, R, 又はW; X_{57} はA , L, M, N, P, 又はR; X_{58} はG, L, P, R, 又はS ; 及び X_{59} はG, I, P, S, T, 又はYである。) 10
	Subgenus4.2 : $X_{52} X_{53} X_{54} X_{55} X_{56} X_{57} X_{58} X_{59}$ (配列番号342) , (式中、 X_{52} はD又はH; X_{53} はW又はY; X_{54} はH又はL ; X_{55} はH, L, 又はY; X_{56} はG又はW; X_{57} はP又はR ; X_{58} はG, L, 又はP; 及び X_{59} はG, I, S, 又はTである 。)
	Subgenus4.3 : $X_{52} X_{53} X_{54} X_{55} X_{56} X_{57} X_{58} X_{59}$ (配列番号343) , (式中、 X_{52} はH; X_{53} はW; X_{54} はH又はL; X_{55} はH, L , 又はY; X_{56} はG又はW; X_{57} はP; X_{58} はL又はP; 及び X_{59} はG, I, S, 又はTである。)
	Subgenus4.4 : $X_{52} X_{53} X_{54} X_{55} X_{56} X_{57} X_{58} X_{59}$ (配列番号344) , (式中、 X_{52} はH; X_{53} はW; X_{54} はH又はL; X_{55} はL又は Y; X_{56} はG; X_{57} はP; X_{58} はL又はP; 及び X_{59} はG, I, S, 又はTである。) 20
	Subgenus4.5 : $X_{52} X_{53} X_{54} X_{55} X_{56} X_{57} X_{58} X_{59}$ (配列番号345) , (式中、 X_{52} はH; X_{53} はW; X_{54} はH又はL X_{55} はL又は Y X_{56} はG; X_{57} はP; X_{58} はP; 及び X_{59} はTである。)
	Subgenus4.6 : $X_{52} X_{53} X_{54} X_{55} X_{56} X_{57} X_{58} X_{59}$ (配列番号346) , (式中、 X_{52} はD, G, S, 又はY; X_{53} はW; X_{54} はL又 はP; X_{55} はD又はY; X_{56} はC, E, G, 又はW; X_{57} はM 又はP; X_{58} はG, R, 又はS; 及び X_{59} はH, I, 又はYで ある。) 30
	Subgenus4.7 : $X_{52} X_{53} X_{54} X_{55} X_{56} X_{57} X_{58} X_{59}$ (配列番号347) , (式中、 X_{52} はD, G, 又はS; X_{53} はW; X_{54} はL; X_{55} はY; X_{56} はE又はW; X_{57} はM又はP; X_{58} はG又はS; 及 び X_{59} はI 又はYである。)

【0032】

表8 E.MMP14切断可能コア-CMコンセンサス配列5

【表5】

コアCMコンセンサス5	コアCMコンセンサス5 (subgenus)
$X_{62} X_{63} X_{64} X_{65} X_{66} X_{67} X_{68} X_{69}$ (配列番号352), (式中、 X_{62} はA, I, G, L, M, P, Q, S, T, 又はV; X_{63} はA, D, L, P, Q, S, T, V, 又はY; X_{64} はA, C, E, F, G, H, K, L, P, Q, R, S, 又はV; X_{65} はD, E, G, S, 又は V; X_{66} はA, I, L, M, 又は V; X_{67} はC, E, G, I, K, L, M, N, Q, R, 又是 Y; X_{68} はA, F, H, I, L, M, N, P, R, S, 又是 T; 及び X_{69} はA, C, G, H, I, L, N, P, Q, R, S, T, V, 又是Wである。)	Subgenus5.1 : $X_{62} X_{63} X_{64} X_{65} X_{66} X_{67} X_{68} X_{69}$ (配列番号353) , (式中、 X_{62} はA, G, I, P, Q, S, T, 又はV; X_{63} はA, L, Q, S, 又はV; X_{64} はA, E, L, R, 又是S ; X_{65} はD又是G; X_{66} はI又是L; X_{67} はE, I, L, M, Q, R, 又是Y; X_{68} はF, H, L, M, R, 又是S; 及び X_{69} はA, G, H, L, N, P, Q, 又是Sである。) 10
	Subgenus5.2 : $X_{62} X_{63} X_{64} X_{65} X_{66} X_{67} X_{68} X_{69}$ (配列番号354) , (式中、 X_{62} はA, I, S又是T; X_{63} はL, Q, S, 又是 V; X_{64} はA, L, R, 又是S; X_{65} はG; X_{66} はI又是L; X_{67} はE, L, R, 又是Y; X_{68} はF, H, L, R, 又是S; 及び X_{69} はH, L, P, 又是Sである。)
	Subgenus5.3 : $X_{62} X_{63} X_{64} X_{65} X_{66} X_{67} X_{68} X_{69}$ (配列番号355) , (式中、 X_{62} はA, I, S又是T; X_{63} はL, S, 又是V; X_{64} はA, R, 又是S; X_{65} はG; X_{66} はL; X_{67} はE, L, 又是R; X_{68} はF, H, 又是S; 及び X_{69} はL, P, 又是Sである。) 20
	Subgenus5.4 : $X_{62} X_{63} X_{64} X_{65} X_{66} X_{67} X_{68} X_{69}$ (配列番号356) , (式中、 X_{62} はA, I, S又是T; X_{63} はL, S, 又是V; X_{64} はR又是S; X_{65} はG; X_{66} はL; X_{67} はL又是R; X_{68} は F, H, 又是S; 及び X_{69} はP又是Sである。)
	Subgenus5.5 : $X_{62} X_{63} X_{64} X_{65} X_{66} X_{67} X_{68} X_{69}$ (配列番号357) , (式中、 X_{62} はA, I, S又是T; X_{63} はL, S, 又是V; X_{64} はR又是S; X_{65} はG; X_{66} はL; X_{67} はL又是R; X_{68} は S; 及び X_{69} はP又是Sである。) 30
	Subgenus5.6 : $X_{62} X_{63} X_{64} X_{65} X_{66} X_{67} X_{68} X_{69}$ (配列番号358) , (式中、 X_{62} はT; X_{63} はL, S, 又是V; X_{64} はS; X_{65} はG; X_{66} はL; X_{67} はR; X_{68} はS; 及び X_{69} はPである。)

【0033】

【表6】

コアCMコンセンサス5	コアCMコンセンサス5 (subgenus)
	Subgenus5.7 : $X_{62} X_{63} X_{64} X_{65} X_{66} X_{67} X_{68} X_{69}$ (配列番号359) (式中、 X_{62} はA, G, I, M, P, S, T, 又はV ; X_{63} はL, Q, S, 又はV ; X_{64} はA, C, F, K, L, Q, R 又はS ; X_{65} はD, G, S, 又はV ; X_{66} はL又はM ; X_{67} はG, I, L, M, N, Q, 又はR ; X_{68} はI, N, P, 又はS ; 及び X_{69} はA, H, I, N, Q, 又はSである。) 10
	Subgenus5.8 : $X_{62} X_{63} X_{64} X_{65} X_{66} X_{67} X_{68} X_{69}$ (配列番号360) (式中、 X_{62} はA, I, 又はS ; X_{63} はL, Q, S, 又はV ; X_{64} はL, R又はS ; X_{65} はG ; X_{66} はL ; X_{67} はL, M, 又是R ; X_{68} はS ; 及び X_{69} はA, H, N, Q, 又はSである。)
	Subgenus5.9 : $X_{62} X_{63} X_{64} X_{65} X_{66} X_{67} X_{68} X_{69}$ (配列番号361) (式中、 X_{62} はA, I, 又はS ; X_{63} はL, Q, S, 又はV ; X_{64} はL, R又はS ; X_{65} はG ; X_{66} はL ; X_{67} はL, M, 又はR ; X_{68} はS ; 及び X_{69} はA, H, N, Q, 又はSである。)
	Subgenus5.10 : $X_{62} X_{63} X_{64} X_{65} X_{66} X_{67} X_{68} X_{69}$ (配列番号362) (式中、 X_{62} はA又はS ; X_{63} はL又はV ; X_{64} はL又はS ; X_{65} はG ; X_{66} はL ; X_{67} はL又是R ; X_{68} はS ; 及び X_{69} はH, 又はSである。) 20
	Subgenus5.11 : $X_{62} X_{63} X_{64} X_{65} X_{66} X_{67} X_{68} X_{69}$ (配列番号363) (式中、 X_{62} はA又はS ; X_{63} はL又はV ; X_{64} はS ; X_{65} はG ; X_{66} はL ; X_{67} はL又是R ; X_{68} はS ; 及び X_{69} はH, 又はSである。)

【0034】

表8 F - 1 . M M P 1 4 切断可能コア-CMコンセンサス配列 6

30

【表7】

コアCMコンセンサス6	コアCMコンセンサス6 (subgenus)
X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ X ₇₉ (配列番号371), (式中、 X ₇₂ はA, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, 又は V; X ₇₃ はA, C, E, F, H, L, N, R, S, 又はV; X ₇₄ はA, D, E, K, N, P, Q, S, T, 又はY; X ₇₅ はA, E, G, H, K, L, N, P, R, S, 又是 T; X ₇₆ はI, K, L, M, N, R, T, V又はY; X ₇₇ はA, D, E, I, K, L, P, Q, R, S, T, V, 又はY; X ₇₈ はA, C, D, E, G, I, L, M, Q, R, S, T, 又はV; 及び X ₇₉ はA, F, G, H, I, L, P, Q, R, S, T, 又はYである。)	Subgenus6.1 : X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ X ₇₉ (配列番号372) , (式中、X ₇₂ はA, F, G, H, I, L, M, Q, R, 又 はS; X ₇₃ はA, F, H, L, 又はN; X ₇₄ はA, E, N, Q , 又はS; X ₇₅ はA, E, K, N, S, 又はT; X ₇₆ はL又是 M; X ₇₇ はA, I, K, L, P, R, 又はV; X ₇₈ はA, D, I, L, M, R, T, 又是V; 及びX ₇₉ はA, F, G, H, I, L, P, Q, R, 又はSである。) 10
	Subgenus6.2 : X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ X ₇₉ (配列番号373) , (式中、X ₇₂ はG, L又はR, 又はS; X ₇₃ はA又是L; X 74はA, E, N, Q, 又是S; X ₇₅ はA, E, N, S, 又是T ; X ₇₆ はL又是M; X ₇₇ はL又是R; X ₇₈ はA, L, 又是T ; 及びX ₇₉ はF, G, L, R, 又是Sである。)
	Subgenus6.3 : X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ X ₇₉ (配列番号374) , (式中、X ₇₂ はL; X ₇₃ はA又是L; X ₇₄ はE, N, Q, 又 是S; X ₇₅ はA又是S; X ₇₆ はL又是M; X ₇₇ はR; X ₇₈ はA又 是T; 及びX ₇₉ はF, L, 又是Rである。) 20
	Subgenus6.4 : X ₇₂ X ₇₃ X ₇₄ X ₇₅ X ₇₆ X ₇₇ X ₇₈ X ₇₉ (配列番号375) , (式中、X ₇₂ はL; X ₇₃ はA又是L; X ₇₄ はE, N, Q, 又 是S; X ₇₅ はA又是S; X ₇₆ はL又是M; X ₇₇ はR; X ₇₈ はA; 及びX ₇₉ はL又是Rである。) 30

【0035】

表8 F - 2 . M M P 1 4 切断可能コア-CMコンセンサス配列 6 A

【表 8】

コアCMコンセンサス6A	コアCMコンセンサス6A (subgenus)
$X_{72} X_{73} X_{74} X_{75} X_{76} X_{77} X_{78}$ (配列番号485) , (式中、 X_{72} はA, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, 又はV ; X_{73} はA, C, E, F, H, L, N, R, S, 又はV ; X_{74} はA, D, E, K, N, P, Q, S, T, 又はY ; X_{75} はA, E, G, H, K, L, N, P, R, S, 又是T ; X_{76} はI, K, L, M, N, R, T, V又はY ; X_{77} はA, D, E, I, K, L, P, Q, R, S, T, V, 又是Y ; 及び X_{78} はA, C, D, E, G, I, L, M, Q, R, S, T, 又是Vである。)	Subgenus6A. 1 : $X_{72} X_{73} X_{74} X_{75} X_{76} X_{77} X_{78}$ (配列番号376) , (式中、 X_{72} はA, E, L, N, P, 又はQ ; X_{73} はF, H, L, N, 又はS ; X_{74} はQ又はY ; X_{75} はA ; X_{76} はL, T, V又はY ; X_{77} はD, E, P, Q, 又はR ; 及び X_{78} はA, C, G, I, M, R, S, 又はTである。) Subgenus6A. 2 : $X_{72} X_{73} X_{74} X_{75} X_{76} X_{77} X_{78}$ (配列番号377) , (式中、 X_{72} はA, E, L, 又はQ ; X_{73} はF, H, 又はN ; X_{74} はQ ; X_{75} はA ; X_{76} はL又はT ; X_{77} はQ又はR ; 及び X_{78} はI 又はMである。) Subgenus6A. 3 : $X_{72} X_{73} X_{74} X_{75} X_{76} X_{77} X_{78}$ (配列番号378) , (式中、 X_{72} はA ; X_{73} はF, H, 又はN ; X_{74} はQ ; X_{75} はA ; X_{76} はL ; X_{77} はR ; 及び X_{78} はMである。)
	10
	20

【0036】

表 8 G . M M P 1 4 切断可能コアー CM コンセンサス配列 7

【表9】

コアCMコンセンサス7	コアCMコンセンサス7 (subgenus)
X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (配列番号394) . (式中、 X ₈₂ はA, F, L, Q, S, T, 又はV; X ₈₃ はA, E, G, H, K, Q, R, V, 又はY; X ₈₄ はA, G, I, K, L, M, N, S, T, 又はV; X ₈₅ はA, D, F, G, I, L, N, P, R, S, T, 又はV; X ₈₆ はA, P, 又はR; X ₈₇ はA, D, G, L, M, P, R, S, T, V, W, 又はY; X ₈₈ はA, C, E, F, H, I, L, N, R, S, T, W, 又はY; 及び X ₈₉ はA, F, G, I, L, M, R, S, T, 又はVで ある。)	Subgenus7.1 : X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (配列番号395) . (式中、X ₈₂ はL; X ₈₃ はH, K, Q, R, 又はY; X ₈₄ は A, L, M, S, T, 又はV; X ₈₅ はA, I, L, S, 又は V; X ₈₆ はP; X ₈₇ はA, G, R, S, V, 又はW; X ₈₈ はI , R, T, 又はW; 及びX ₈₉ はA, F, G, L, S, 又はV である。) 10 Subgenus7.2 : X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (配列番号396) . (式中、X ₈₂ はL; X ₈₃ はH, K, R, 又はY; X ₈₄ はA, L, 又はV; X ₈₅ はA, I, 又是L; X ₈₆ はP; X ₈₇ はG, R , 又はV; X ₈₈ はT又はW; 及びX ₈₉ はA, F, L, 又是Sで ある。) Subgenus7.3 : X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (配列番号397) . (式中、X ₈₂ はL; X ₈₃ はK, R, 又はY; X ₈₄ はA; X ₈₅ はA又はL; X ₈₆ はP; X ₈₇ はG, R, 又はV; X ₈₈ はW; 及 びX ₈₉ はA又はLである。) 20 Subgenus7.4 : X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (配列番号398) . (式中、X ₈₂ はA, F, L, Q, 又はS; X ₈₃ はA, E, G , H, K, Q, 又はY; X ₈₄ はA, G, K, S, 又はV; X ₈₅ はA, I, L, P, 又是T; X ₈₆ はA, P, 又是R; X ₈₇ は A, L, M, R, V, 又是Y; X ₈₈ はC, H, R, T, 又是 W; 及びX ₈₉ はA, F, L, R, S, 又是Tである。) Subgenus7.5 : X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (配列番号399) . (式中、X ₈₂ はF又是L; X ₈₃ はG, K, Q, 又是Y; X ₈₄ はA, G, S, 又是V; X ₈₅ はA, I, 又是L; X ₈₆ はP; X ₈₇ はA, R, 又是V; X ₈₈ はR又是W; 及びX ₈₉ はA, F, L , 又是Rである。) 30 Subgenus7.6 : X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (配列番号400) . (式中、X ₈₂ はL; X ₈₃ はK又是Y; X ₈₄ はA又是S; X ₈₅ はA, I, 又是L; X ₈₆ はP; X ₈₇ はA, R, 又是V; X ₈₈ は W; 及びX ₈₉ はA又是Fである。) Subgenus7.7 : X ₈₂ X ₈₃ X ₈₄ X ₈₅ X ₈₆ X ₈₇ X ₈₈ X ₈₉ (配列番号401) . (式中、X ₈₂ はL; X ₈₃ はK又是Y; X ₈₄ はA; X ₈₅ はA又是 I; X ₈₆ はP; X ₈₇ 是R又是V; X ₈₈ 是W; 及びX ₈₉ 是A又是F である。)

【0037】

表8 H - 1 . M M P 1 4 切断可能コア-C M コンセンサス配列 8

【表 10】

コアCMコンセンサス8	コアCMコンセンサス8 (subgenus)
X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (配列番号410), (式中、	Subgenus8.1 : X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (配列番号411), (式中、X ₉₂ はA, F, G, I, L, M, N, S, T, V, 又はW; X ₉₃ はP; X ₉₄ はA, E, F, H, I, K, N, P, Q, R, S, T, 又はV; X ₉₅ はA, D, E, G, H, N, P, 又はS; X ₉₆ はC, F, I, L, M, R, S, 又はV; X ₉₇ はC, F, G, I, L, R, S, T, V, 又はY; 及びX ₉₈ はA, F, L, M, P, Q, R, S, T, V, 又はYである。) 10
X ₉₂ はA, D, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, 又はW; X ₉₃ はA, P, R, 又はT; X ₉₄ はA, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, 又はV; X ₉₅ はA, D, E, G, H, K, M, N, P, R, S, 又はT; X ₉₆ はC, F, H, I, L, M, P, R, S, V, W, 又はY; X ₉₇ はA, C, F, G, H, I, K, L, M, R, S, T, V, W, 又はY; 及び X ₉₈ はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, 又はYである。)	Subgenus8.2 : X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (配列番号412), (式中、X ₉₂ はF, G, L, S, T, 又はV; X ₉₃ はP; X ₉₄ はA, E, H, K, N, Q, R, S, T, 又はV; X ₉₅ はA, G, H, N, P, 又はS; X ₉₆ はI, L, M, 又はV; X ₉₇ はF, I, L, R, S, T, V, 又はY; 及びX ₉₈ はA, F, L, R, T, V, 又はYである。)
X ₉₂ はF, L, 又はS; X ₉₃ はP; X ₉₄ はA, K, Q, R, 又はS; X ₉₅ はA, G, H, 又はS; X ₉₆ はI, L, M, 又はV; X ₉₇ はF, L, R, S, T, V, 又はY及び; X ₉₈ はF, L, T, 又はVである。) 20	Subgenus8.3 : X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (配列番号413), (式中、X ₉₂ はF, L, 又はS; X ₉₃ はP; X ₉₄ はA, K, Q, R, 又はS; X ₉₅ はA, G, H, 又はS; X ₉₆ はI, L, M, 又はV; X ₉₇ はF, L, R, S, T, V, 又はY及び; X ₉₈ はF, L, T, 又はVである。)
X ₉₂ はF, L, 又はS; X ₉₃ はP; X ₉₄ はA, Q, 又 はS; X ₉₅ はG又はS; X ₉₆ はI, L, 又是M; X ₉₇ はL, S, 又はV; 及びX ₉₈ はF, L, 又是Tである。) 30	Subgenus8.4 : X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (配列番号414), (式中、X ₉₂ はF, L, 又はS; X ₉₃ はP; X ₉₄ はA, Q, 又 はS; X ₉₅ はG又はS; X ₉₆ はI, L, 又是M; X ₉₇ 是L又是V; 及 びX ₉₈ 是Lである。)
X ₉₂ はF, L, 又はS; X ₉₃ はP; X ₉₄ はA, Q又 はS; X ₉₅ はG; X ₉₆ はI, L, 又是M; X ₉₇ 是L又是V; 及 びX ₉₈ 是Lである。) 30	Subgenus8.6 : X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (配列番号416), (式中、X ₉₂ はF, L, 又はS; X ₉₃ はP; X ₉₄ はA又はS; X ₉₅ 是G; X ₉₆ 是I, L, 又是M; X ₉₇ 是L又是V; 及 びX ₉₈ 是Lである。)
X ₉₂ はF, G, L, M, P, S, V, 又是W; X ₉₃ 是P; X ₉₄ 是A, N, Q, 又是S; X ₉₅ 是A, D, G, H, M, N, P, 又是S; X ₉₆ 是F, I, L, M, 又是V; X ₉₇ 是A, I, L, M, S, 又是V; 及びX ₉₈ 是A, G, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, 又是Yである。) 40	Subgenus8.7 : X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (配列番号417), (式中、X ₉₂ 是F, G, L, M, P, S, V, 又是W; X ₉₃ 是P; X ₉₄ 是A, N, Q, 又是S; X ₉₅ 是A, D, G, H, M, N, P, 又是S; X ₉₆ 是F, I, L, M, 又是V; X ₉₇ 是A, I, L, M, S, 又是V; 及びX ₉₈ 是A, G, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, 又是Yである。)
X ₉₂ 是L, S, 又是V; X ₉₃ 是P; X ₉₄ 是A, N, Q, 又是S; X ₉₅ 是H, N, P, 又是S; X ₉₆ 是F, I, L, 又 是M; X ₉₇ 是I, L, S, 又是V; 及びX ₉₈ 是A, L, 又是Q である。) 40	Subgenus8.8 : X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (配列番号418), (式中、X ₉₂ 是L, S, 又是V; X ₉₃ 是P; X ₉₄ 是A, N, Q, 又是S; X ₉₅ 是H, N, P, 又是S; X ₉₆ 是F, I, L, 又 是M; X ₉₇ 是I, L, S, 又是V; 及びX ₉₈ 是A, L, 又是Q である。)
X ₉₂ 是L; X ₉₃ 是P; X ₉₄ 是A, N, Q, 又是S; X ₉₅ 是H; X ₉₆ 是I 又是L; X ₉₇ 是V; 及びX ₉₈ 是Lである。)	Subgenus8.9 : X ₉₂ X ₉₃ X ₉₄ X ₉₅ X ₉₆ X ₉₇ X ₉₈ (配列番号419), (式中、X ₉₂ 是L; X ₉₃ 是P; X ₉₄ 是A, N, Q, 又是S; X ₉₅ 是H; X ₉₆ 是I 又是L; X ₉₇ 是V; 及びX ₉₈ 是Lである。)

【0038】

表 8 H - 2 . M M P 1 4 切断可能拡張コア-C M コンセンサス配列 8

【表 1 1】

拡張コアCMコンセンサス8A	拡張コアCMコンセンサス8A (subgenus)
$X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98} X_{99}$ (配列番号486), (式中、 X_{92} はA, D, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, 又はW; X_{93} はA, P, R, 又はT; X_{94} はA, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, 又はV; X_{95} はA, D, E, G, H, K, M, N, P, R, S, 又はT; X_{96} はC, F, H, I, L, M, P, R, S, V, W, 又はY; X_{97} はA, C, F, G, H, I, K, L, M, R, S, T, V, W, 又はY; X_{98} はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, 又はY; 及び X_{99} はA, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, 又はYである。)	Subgenus8A. 1 : $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98} X_{99}$ (配列番号487)) , (式中、 X_{92} はA, F, G, I, L, M, N, S, T, V, 又はW; X_{93} はP; X_{94} はA, E, F, H, I, K, N, P, Q, R, S, T, 又はV; X_{95} はA, D, E, G, H, N, P, 又はS; X_{96} はC, F, I, L, M, R, S, 又は V; X_{97} はC, F, G, I, L, R, S, T, V, 又はY; X_{98} はA, F, L, M, P, Q, R, S, T, V, 又はY; 及び X_{99} はA, D, E, G, H, I, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, 又はYである。) 10
	Subgenus8A. 2 : $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98} X_{99}$ (配列番号488)) , (式中、 X_{92} はF, G, L, S, T, 又はV; X_{93} はP; X_{94} はA, E, H, K, N, Q, R, S, T, 又はV; X_{95} はA, G, H, N, P, 又はS; X_{96} はI, L, M, 又はV ; X_{97} はF, I, L, R, S, T, V, 又はY; X_{98} はA, F , L, R, T, V, 又はY; 及び X_{99} はA, D, G, L, P , R, S, T, V, 又はYである。)
	Subgenus8A. 3 : $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98} X_{99}$ (配列番号489)) , (式中、 X_{92} はF, L, 又はS; X_{93} はP; X_{94} はA, K , Q, R, 又はS; X_{95} はA, G, H, 又はS; X_{96} はI, L , M, 又はV; X_{97} はF, L, R, S, T, V, 又はY; X_{98} はF, L, T, 又はV; 及び X_{99} はA, D, G, L, R, T 又はVである。) 20
	Subgenus8A. 4 : $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98} X_{99}$ (配列番号490)) , (式中、 X_{92} はF, L, 又はS; X_{93} はP; X_{94} はA, Q , 又はS; X_{95} はG又はS; X_{96} はI, L, 又はM; X_{97} はL , S, 又はV; X_{98} はF, L, 又是T; 及び X_{99} はA, R, 又 是Tである。) 30
	Subgenus8A. 5 : $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98} X_{99}$ (配列番号491)) , (式中、 X_{92} はF, L, 又はS; X_{93} はP; X_{94} はA, Q 又はS; X_{95} はG; X_{96} はI, L, 又はM; X_{97} はL又はV; X_{98} はL; 及び X_{99} はRである。)

【0039】

【表 1 2】

拡張コアCMコンセンサス8A	拡張コアCMコンセンサス8A (subgenus)
	Subgenus8A. 6 : $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98} X_{99}$ (配列番号492)), (式中、 X_{92} はF, L, 又はS ; X_{93} はP ; X_{94} はA又はS ; X_{95} はG ; X_{96} はI, L, 又はM ; X_{97} はL又はV ; X_{98} はL ; 及び X_{99} はRである。)
	Subgenus8A. 7 : $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98} X_{99}$ (配列番号493)) , (式中、 X_{92} はF, G, L, M, P, S, V, 又はW ; X_{93} はP ; X_{94} はA, N, Q, 又はS ; X_{95} はA, D, G, H, M, N, P, 又はS ; X_{96} はF, I, L, M, 又はV ; X_{97} はA, I, L, M, S, 又はV ; X_{98} はA, G, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, 又はY ; 及び X_{99} はA, F, H, I, L, Q, R, T, V, W, 又はYである。)
	Subgenus8A. 8 : $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98} X_{99}$ (配列番号494)) , (式中、 X_{92} はL, S, 又はV ; X_{93} はP ; X_{94} はA, N, Q, 又はS ; X_{95} はH, N, P, 又はS ; X_{96} はF, I, L, 又はM ; X_{97} はI, L, S, 又はV ; X_{98} はA, L, 又是Q ; 及び X_{99} はL, T, V, 又是Yである。)
	Subgenus8A. 9 : $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98} X_{99}$ (配列番号495)) , (式中、 X_{92} はL ; X_{93} はP ; X_{94} はA, N, Q, 又はS ; X_{95} はH ; X_{96} はI 又是L ; X_{97} はV ; X_{98} はL ; 及び X_{99} はL又是Vである。)

10

20

【0040】

表 8 I . M M P 1 4 切断可能コアー C M コンセンサス配列 9

【表 1 3】

コアCMコンセンサス9	コアCMコンセンサス9 (subgenus)
$X_{102} X_{103} X_{104} X_{105} X_{106} X_{107} X_{108} X_{109}$ (配列番号425), (式中、 X_{102} はA, D, F, G, H, I, L, M, P, R, S, T, 又はV; X_{103} はA, D, E, L, M, P, Q, R, S, T, V, 又はY; X_{104} はA, G, H, L, N, P, R, S, T, 又はV; X_{105} はA, D, E, H, L, M, N, P, Q, R, S, T, 又はV; X_{106} はA, G, R, S, 又は T; X_{107} はC, F, L, M, S, V, W, 又はY; X_{108} はA, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, V, W, 又はY; 及び X_{109} はA, E, G, L, P, R, S, 又はVである。)	<p>Subgenus9.1 : $X_{102} X_{103} X_{104} X_{105} X_{106} X_{107} X_{108} X_{109}$ (配列番号426), (式中、X_{102}はA, D, F, G, I, R, 又はS; X_{103}はD, E, L, M, P, R, S, T, V, 又はY; X_{104}はA, H, P, 又はS; X_{105}はA, D, E, H, L, M, N, R, T, 又はV; X_{106}はA, G, 又はR; X_{107}はF, L, M, S, V, 又はW; X_{108}はA, E, H, L, M, R, S, 又はV; 及びX_{109}はA, G, L, P, R, S, 又はVである。) 10</p> <p>Subgenus9.2 : $X_{102} X_{103} X_{104} X_{105} X_{106} X_{107} X_{108} X_{109}$ (配列番号427), (式中、X_{102}はF, G, I, R, 又はS; X_{103}はL, P, R, 又はV; X_{104}はA又はH; X_{105}はA, D, 又はR; X_{106}はA又はG; X_{107}はL又はV; X_{108}はH, L, M, R, S, 又はV; 及びX_{109}はA, L, S, 又はVである。)</p> <p>Subgenus9.3 : $X_{102} X_{103} X_{104} X_{105} X_{106} X_{107} X_{108} X_{109}$ (配列番号428), (式中、X_{102}はG, R, 又はS; X_{103}はR又はV; X_{104}はA又はH; X_{105}はA, D, 又はR; X_{106}はA又はG; X_{107}はL又はV; X_{108}はH又はR; 及びX_{109}はA, L, S, 又はVである。) 20</p> <p>Subgenus9.4 : $X_{102} X_{103} X_{104} X_{105} X_{106} X_{107} X_{108} X_{109}$ (配列番号429), (式中、X_{102}はR; X_{103}はR又はA又はH; X_{104}はA又はD; X_{105}はG; X_{106}はL又はV; X_{107}はR; 及びX_{108}はA, S, 又はVである。)</p> <p>Subgenus9.5 : $X_{102} X_{103} X_{104} X_{105} X_{106} X_{107} X_{108} X_{109}$ (配列番号430), (式中、X_{102}はD, F, G, I, L, R, S, 又はT; X_{103}はE, L, M, R, S, T, 又はV; X_{104}はH又はN; X_{105}はA, D, L, M, R, 又是T; X_{106}はA, G, R, 又是T; X_{107}はC, L, M, S, V, 又是W; X_{108}はA, E, F, G, L, R, S, 又是W; 及びX_{109}はA, G, L, P, R, S, 又是Vである。) 30</p> <p>Subgenus9.6 : $X_{102} X_{103} X_{104} X_{105} X_{106} X_{107} X_{108} X_{109}$ (配列番号431), (式中、X_{102}はF, I, R, 又是S; X_{103}はE, L, R, 又是V; X_{104}はH; X_{105}はD, M, R, 又是T; X_{106}はA又是G; X_{107}是L, M, S, 又是V; X_{108}是E, R, 又是S; 及びX_{109}是A, P, S, 又是Vである。)</p> <p>Subgenus9.7 : $X_{102} X_{103} X_{104} X_{105} X_{106} X_{107} X_{108} X_{109}$ (配列番号432), (式中、X_{102}是I又是R; X_{103}是E, R, 又是V; X_{104}是H; X_{105}是D, M, R, 又是T; X_{106}是A又是G; X_{107}是L又是V; X_{108}是R又是S; 及びX_{109}是A, P, S, 又是Vである。) 40</p> <p>Subgenus9.8 : $X_{102} X_{103} X_{104} X_{105} X_{106} X_{107} X_{108} X_{109}$ (配列番号433), (式中、X_{102}是I又是R; X_{103}是R; X_{104}是H; X_{105}是D; X_{106}是A又是G; X_{107}是L又是V; X_{108}是R又是S; 及びX_{109}是A又是Sである。)</p>

【0041】

表 8 J . M M P 1 4 切断可能コアー CM コンセンサス配列 1 0

【表 1 4】

コアCMコンセンサス10	コアCMコンセンサス10 (subgenus)
X ₁₁₂ X ₁₁₃ X ₁₁₄ X ₁₁₅ X ₁₁₆ X ₁₁₇ X ₁₁₈ X ₁₁₉ (配列番号436), (式中、 X ₁₁₂ はA, D, G, H, I, L, N, P, R, S, T, V, W, 又はY; X ₁₁₃ はA, D, G, H, L, M, N, P, Q, R, S, V, 又はY; X ₁₁₄ はA, H, K, L, N, P, Q, R, S, T, 又は V; X ₁₁₅ はA, D, F, G, H, I, L, P, R, S, V, 又はY; X ₁₁₆ はC, F, I, L, P, V, 又はY; X ₁₁₇ はA, D, E, F, G, I, K, M, N, R, S, T, V, 又はW; X ₁₁₈ はA, D, E, F, H, K, L, M, N, Q, R, V, 又はY; 及び X ₁₁₉ はA, F, I, L, M, 又はVである。)	Subgenus10.1 : X ₁₁₂ X ₁₁₃ X ₁₁₄ X ₁₁₅ X ₁₁₆ X ₁₁₇ X ₁₁₈ X ₁₁₉ (配列番号 437), (式中、X ₁₁₂ はA, I, P, S, T, V, 又はY; X ₁₁₃ はA, D, G, L, M, Q, R, S, V, 又はY; X ₁₁₄ 是 A, H, K, L, N, S, 又是T; X ₁₁₅ 是G, H, I, L, S, 又是V; X ₁₁₆ 是I, L, 又是V; X ₁₁₇ 是A, F, G, K, , R, S, 又是W; X ₁₁₈ 是D, H, L, M, N, Q, R, 又是V; 及びX ₁₁₉ 是A, I, L, 又是Vである。) 10
	Subgenus10.2 : X ₁₁₂ X ₁₁₃ X ₁₁₄ X ₁₁₅ X ₁₁₆ X ₁₁₇ X ₁₁₈ X ₁₁₉ (配列番号 438), (式中、X ₁₁₂ 是A, I, T, 又是V; X ₁₁₃ 是A, L, M, Q, R, V, 又是Y; X ₁₁₄ 是A, N, S, 又是T; X ₁₁₅ 是G, L, S, 又是V; X ₁₁₆ 是L又是V; X ₁₁₇ 是A, F, G, K, 又是S; X ₁₁₈ 是M, N, Q, R, 又是V; 及びX ₁₁₉ 是 I, L, 又是Vである。)
	Subgenus10.3 : X ₁₁₂ X ₁₁₃ X ₁₁₄ X ₁₁₅ X ₁₁₆ X ₁₁₇ X ₁₁₈ X ₁₁₉ (配列番号 439), (式中、X ₁₁₂ 是A, I, T, 又是V; X ₁₁₃ 是M, Q, 又是Y; X ₁₁₄ 是A, N, 又是S; X ₁₁₅ 是G, L, S, 又是V ; X ₁₁₆ 是L又是V; X ₁₁₇ 是A, F, G, 又是S; X ₁₁₈ 是M, N, Q, 又是R; 及びX ₁₁₉ 是I, L, 又是Vである。) 20
	Subgenus10.4 : X ₁₁₂ X ₁₁₃ X ₁₁₄ X ₁₁₅ X ₁₁₆ X ₁₁₇ X ₁₁₈ X ₁₁₉ (配列番号 440), (式中、X ₁₁₂ 是A, I, 又是V; X ₁₁₃ 是Y; X ₁₁₄ 是N 又是S; X ₁₁₅ 是G, L, 又是V; X ₁₁₆ 是L; X ₁₁₇ 是A, G, 又是S; X ₁₁₈ 是M, Q, 又是R; 及びX ₁₁₉ 是L又是Vである 。)
	Subgenus10.5 : X ₁₁₂ X ₁₁₃ X ₁₁₄ X ₁₁₅ X ₁₁₆ X ₁₁₇ X ₁₁₈ X ₁₁₉ (配列番号 441), (式中、X ₁₁₂ 是A, I, 又是V; X ₁₁₃ 是Y; X ₁₁₄ 是N 又是S; X ₁₁₅ 是G, L, 又是V; X ₁₁₆ 是L; X ₁₁₇ 是G又是S ; X ₁₁₈ 是M又是R; 及びX ₁₁₉ 是L又是Vである。) 30
	Subgenus10.6 : X ₁₁₂ X ₁₁₃ X ₁₁₄ X ₁₁₅ X ₁₁₆ X ₁₁₇ X ₁₁₈ X ₁₁₉ (配列番号 442), (式中、X ₁₁₂ 是A, I, 又是V; X ₁₁₃ 是Y; X ₁₁₄ 是N 又是S; X ₁₁₅ 是G, L, 又是V; X ₁₁₆ 是L; X ₁₁₇ 是S; X ₁₁₈ 是M又是R; 及びX ₁₁₉ 是L又是Vである。)

【0042】

【表 15】

コアCMコンセンサス10	コアCMコンセンサス10 (subgenus)
	Subgenus10.7 : $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (配列番号443) , (式中、 X_{112} はA ; X_{113} はY ; X_{114} はN又はS ; X_{115} はG又はL ; X_{116} はL ; X_{117} はS ; X_{118} はR ; 及び X_{119} はL又はVである。)
	Subgenus10.8 : $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (配列番号444) , (式中、 X_{112} はA, D, G, I, L, N, P, S, T, V, W, 又はY ; X_{113} はA, D, G, L, M, Q, S, 又はV ; X_{114} はH, K, N, P, Q, R, S, 又はT ; X_{115} はH, I, L, R, 又はV ; X_{116} はI, L, P, 又はV ; X_{117} はA, D, E, G, I, K, M, N, S, 又はT ; X_{118} はD, F, L, M, Q, R, 又はV ; 及び X_{119} はA, F, I, L, 又はVである。)
	Subgenus10.9 : $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (配列番号445) , (式中、 X_{112} はA, I, T, 又はV ; X_{113} はA, D, G, L, M, Q, S, 又はV ; X_{114} はH, K, N, S, 又是T ; X_{115} はH, I, L, 又是V ; X_{116} はL ; X_{117} はA, G, K, 又是S ; X_{118} はL, M, Q, R, 又是V ; 及び X_{119} はA, L, 又是Vである。)
	Subgenus10.10 : $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (配列番号446) , (式中、 X_{112} はA又是I ; X_{113} はA, L, 又是Q ; X_{114} はN, S, 又是T ; X_{115} はL又是V ; X_{116} はL ; X_{117} はA, G, K, 又是S ; X_{118} 是M, R, 又是V ; 及び X_{119} 是L又是Vである。)
	Subgenus10.11 : $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (配列番号447) , (式中、 X_{112} はA又是I ; X_{113} 是A, L, 又是Q ; X_{114} 是N又是S ; X_{115} 是L又是V ; X_{116} 是L ; X_{117} 是A又是S ; X_{118} 是M又是R ; 及び X_{119} 是L又是Vである。)
	Subgenus10.12 : $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (配列番号448) , (式中、 X_{112} 是I ; X_{113} 是A, L, 又是Q ; X_{114} 是N ; X_{115} 是L又是V ; X_{116} 是L ; X_{117} 是A又是S ; X_{118} 是M又是R ; 及び X_{119} 是L又是Vである。)
	Subgenus10.13 : $X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}$ (配列番号449) , (式中、 X_{112} 是I ; X_{113} 是A, L, 又是Q ; X_{114} 是N ; X_{115} 是L又是V ; X_{116} 是L ; X_{117} 是S ; X_{118} 是M ; 及び X_{119} 是L又是Vである。)

【0043】

表 8 K . M M P 1 4 切断可能コアー C M コンセンサス配列 1 1

10

20

30

40

【表 1 6】

コアCMコンセンサス11	コアCMコンセンサス11 (subgenus)
$X_{122} X_{123} X_{124} X_{125} X_{126} X_{127} X_{128}$ X_{129} (配列番号453), (式中、 X_{122} はA, G, H, L, P, R, S, 又はV; X_{123} はA, G, R, S, T又 はV; X_{124} はA, G, P, R, S, 又はT; X_{125} はH, I, L, P, R, 又はV; X_{126} はL又はW; X_{127} はF, H, L, M, Q, S, V, 又はY; X_{128} はA, D, E, I, K, P, R, S, T, 又はV; 及び X_{129} はA, E, F, G, H, I, L, N, P, Q, R, 又はVである。)	Subgenus11.1 : $X_{122} X_{123} X_{124} X_{125} X_{126} X_{127} X_{128} X_{129}$ (配列番号 454), (式中、 X_{122} はA, G, P, R, 又はS; X_{123} はA, R, 又はS; X_{124} はG, P, S, 又はT; X_{125} はL又はV; X_{126} はW; X_{127} はL, S, V, 又はY; X_{128} はD, E, P, 又はT; 及び X_{129} はP, Q又はVである。) Subgenus11.2 : $X_{122} X_{123} X_{124} X_{125} X_{126} X_{127} X_{128} X_{129}$ (配列番号 455), (式中、 X_{122} はG, P, R, 又はS; X_{123} はA又はR ; X_{124} はG, P, 又はS; X_{125} はL又はV; X_{126} はW; X_{127} はL又はY; X_{128} はE又はT; 及び X_{129} はQである。) Subgenus11.3 : $X_{122} X_{123} X_{124} X_{125} X_{126} X_{127} X_{128} X_{129}$ (配列番号 456), (式中、 X_{122} はP; X_{123} はA; X_{124} はP又はS; X_{125} はL又はV; X_{126} はW; X_{127} はY; X_{128} はT; 及び X_{129} はQ である。)
	10
	20

【0044】

表 8 L . M M P 1 4 切断可能コアー C M コンセンサス配列 1 2

【表 1 7】

コアCMコンセンサス12	コアCMコンセンサス12 (subgenus)
$X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$ (配列番号458), (式中、 X_2 はA, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, 又は Y; X_3 はA, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, 又は Y; X_4 はA, E, G, H, K, N, P, R, S, T, V, 又はY; X_5 はA, G, H, I, L, N, P, R, S, T, 又は V;	Subgenus12.1 : $X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$ (配列番号459), (式中、 X_2 はA, G, L, P, 又はS; X_3 はA, E, G, H, L, P, Q, S, T, 又はV; X_4 はG, N, R, 又はS; X_5 はL, P, 又はS; X_6 はI又はL; X_7 はA, G, N, Q, R, 又はS; X_8 はD, F, G, I, L, M, P, S, 又は V; 及び X_9 はF, G, L, P, Q, R, 又はSである。) Subgenus12.2 : $X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$ (配列番号460), (式中、 X_2 はA, P, 又はS; X_3 はL, S又はV; X_4 はG, N, R, 又はS; X_5 はL, P, 又はS; X_6 はL; X_7 はA, G, R, 又はS; X_8 はL, P, 又はV; 及び X_9 はF, L, P, 又はSである。) Subgenus12.3 : $X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 X_8 X_9$ (配列番号461), (式中、 X_2 はA, P, 又はS; X_3 はL, S, 又はV; X_4 はG, N, R, 又はS; X_5 はL, P, 又はS; X_6 はL; X_7 はA, G, R, 又はS; X_8 はL又はP; 及び X_9 はF, P, 又は Sである。)

10

20

【0045】

【表 18】

コアCMコンセンサス12	コアCMコンセンサス12 (subgenus)
X_6 はI, L, M, Q, T, V, W, 又はY; X_7 はA, D, G, H, K, L, N, P, Q, R, S, T, 又はV; X_8 はA, D, E, F, G, I, K, L, M, P, Q, R, S, V, W, 又はY; 及び X_9 はA, F, G, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V又はYである。)	Subgenus12.4 : $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (配列番号462), (式中、 X_2 はA, P, 又はS; X_3 はL又はV; X_4 はG, N, 又はS; X_5 はL又はS; X_6 はL; X_7 はA, G, R, 又はS; X_8 はL又はP; 及び X_9 はP又はSである。) Subgenus12.5 : $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (配列番号463), (式中、 X_2 はA又はS; X_3 はL; X_4 はG, N, 又はS; X_5 はL又はS; X_6 はL; X_7 はR又はS; X_8 はL; 及び X_9 はPである。) Subgenus12.6 : $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (配列番号464), (式中、 X_2 はA, E, G, H, I, L, M, P, 又はS; X_3 はA, E, G, H, I, K, L, P, Q, R, S, T, V, W, 又はY; X_4 はA, G, N, R, S, T, 又はV; X_5 はA, G, H, L, N, P, R, S, T, 又はV; X_6 はI, L, M, 又はQ; X_7 はA, D, G, K, L, N, Q, R, S, 又はV; X_8 はA, D, E, F, G, I, K, L, M, P, R, V, W, 又はY; 及び X_9 はA, F, G, M, P, Q, R, S, V, 又はYである。) Subgenus12.7 : $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (配列番号465), (式中、 X_2 はA, P, 又はS; X_3 はA, H, Q, S, 又はV; X_4 はG, N, 又はS; X_5 はL, P, 又はS; X_6 はL; X_7 はA, D, G, R, 又はS; X_8 はF, I, L, M, 又はP; 及び X_9 はF, P, Q, 又はRである。) Subgenus12.8 : $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (配列番号466), (式中、 X_2 はA, P, 又はS; X_3 はH, S, 又はV; X_4 はG, N, 又はS; X_5 はL, P, 又是S; X_6 はL; X_7 はA, G, R, 又是S; X_8 はF, I, M, 又是P; 及び X_9 はP又是Rである。) Subgenus12.9 : $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (配列番号467), (式中、 X_2 はA, P, 又はS; X_3 はS又はV; X_4 はG, N, 又はS; X_5 はL; X_6 はL; X_7 はA, G又はR; X_8 はF, I, 又はP; 及び X_9 はPである。) Subgenus12.10 : $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (配列番号468), (式中、 X_2 はA, P, 又はS; X_3 はS又はV; X_4 はG, N, 又はS; X_5 はL; X_6 はL; X_7 はA又はR; X_8 はF又はP; 及び X_9 はPである。) Subgenus12.11 : $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (配列番号469), (式中、 X_2 はA又はP; X_3 はS; X_4 はG又はN; X_5 はL; X_6 はL; X_7 はR; X_8 はF; 及び X_9 はPである。)
	10
	20
	30
	40

【0046】

表 8 M.MMP14 切断コア-CMコンセンサス配列 13

【表19】

コアCMコンセンサス13	コアCMコンセンサス13 (subgenus)
$X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19}$ (配列番号473), (式中、 X_{12} はF, I, L, M, R, S, T, 又はV; X_{13} はA, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, 又は Y; X_{14} はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, 又はY; X_{15} はA, E, G, N, P, Q, S, T, V, 又はW; X_{16} はA, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, 又はY; X_{17} はA, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, 又は Y; X_{18} はA, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, 又はY; 及び X_{19} はA, D, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, 又は Yである。)	Subgenus13.1 : $X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19}$ (配列番号475) , (式中、 X_{12} はF, I, L, M, S, 又はV; X_{13} はA, E, H, K, L, M, N, Q, S, T, V, 又はY; X_{14} はA, F, H, L, M, Q, S, T, 又はV; X_{15} はA, G, 又はP; X_{16} はA, F, G, H, I, L, M, N, R, S, V, 又はY; X_{17} はA, E, G, H, L, M, P, Q, R, S, T, 又はV; X_{18} はA, D, E, F, G, H, L, M, N, R, S, V, 又はY; 及び X_{19} はA, F, G, I, L, M, P, Q, R, S, W, 又はYである。) 10
	Subgenus13.2 : $X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19}$ (配列番号476) , (式中、 X_{12} はL, M, 又はV; X_{13} はA, H, L, N, Q, S, 又はV; X_{14} はA, L, M, Q, S, T, 又はV; X_{15} はP; X_{16} はA, F, G, I, L, R, S, V, 又はY; X_{17} はH, L, M, Q, 又はS; X_{18} はA, D, G, H, R, 又はS; 及び X_{19} はA, F, G, L, R, 又はSである。) 20
	Subgenus13.3 : $X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19}$ (配列番号477) , (式中、 X_{12} はL, M, 又はV; X_{13} はA又はL; X_{14} はA, L, 又是S; X_{15} はP; X_{16} はL又是V; X_{17} はH, L, 又是Q; X_{18} はG又是S; 及び X_{19} はG, R, 又是Sである。) 30
	Subgenus13.4 : $X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19}$ (配列番号478) , (式中、 X_{12} はL又是V; X_{13} はA又是L; X_{14} 是L又是S; X_{15} 是P; X_{16} 是L又是V; X_{17} 是H又是L; X_{18} 是G又是S; 及び X_{19} 是R又是Sである。) 40
	Subgenus13.5 : $X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19}$ (配列番号479) , (式中、 X_{12} 是L又是V; X_{13} 是A又是L; X_{14} 是L又是S; X_{15} 是P; X_{16} 是L; X_{17} 是H又是L; X_{18} 是G; 及び X_{19} 是Sである。) 40
	Subgenus13.6 : $X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19}$ (配列番号480) , (式中、 X_{12} 是F, I, L, M, S, T, 又是V; X_{13} 是A, E, G, H, L, M, S, V, W, 又是Y; X_{14} 是A, D, E, G, K, L, M, N, Q, R, S, T, 又是V; X_{15} 是E, G, N, P, S, T, 又是V; X_{16} 是A, F, G, L, N, P, Q, R, S, V, 又是Y; X_{17} 是A, E, H, P, Q, 又是R; X_{18} 是D, E, G, N, R, S, 又是T; 及び X_{19} 是A, D, G, Q, S, T, 又是Vである。) 40
	Subgenus13.7 : $X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19}$ (配列番号482) , (式中、 X_{12} 是L又是M; X_{13} 是A又是L; X_{14} 是L; X_{15} 是G又是P; X_{16} 是A又是S; X_{17} 是H; X_{18} 是G; 及び X_{19} 是A又是Gである。) 50

【0047】

いくつかの実施形態によれば、CMは、配列番号352、371、394、410、425、436、453、458、473、485及び486から成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によれば、CMは、配列番号353-363、372-375、376-378、395-401、411-419、426-433、4

37 - 449、454 - 456、459 - 469、475 - 482 及び 487 - 495 から成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によれば、CMは、配列番号 353 - 363 から成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によれば、CMは、配列番号 372 - 375 から成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によれば、CMは、配列番号 376 - 378 から成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によれば、CMは、配列番号 395 - 401 から成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によれば、CMは、配列番号 411 - 419 から成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によれば、CMは、配列番号 426 - 433 から成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によれば、CMは、配列番号 437 - 449 から成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によれば、CMは、配列番号 454 - 456 から成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によれば、CMは、配列番号 459 - 469 から成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によれば、CMは、配列番号 475 - 482 から成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によれば、CMは、配列番号 487 - 495 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0048】

いくつかの実施形態によれば、CMは、配列番号 317、324、329 及び 340 から成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によれば、CMは、配列番号 318 - 323、325 - 327、330 - 335、及び 341 - 347 から成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によれば、CMは、配列番号 318 - 323 から成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によれば、CMは、配列番号 325 - 327 から成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によれば、CMは、配列番号 330 - 335 から成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によれば、CMは、配列番号 341 - 347 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0049】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 R P S P M W A Y (配列番号 21) を含むコアー CM コンセンサス 1 配列を含む。

【0050】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 W D H P I S L L (配列番号 328) を含むコアー CM コンセンサス 2 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 W A T P R P M R (配列番号 22) を含むコアー CM コンセンサス 2 配列を含む。

【0051】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 L T F P T Y I F (配列番号 336) を含むコアー CM コンセンサス 3 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 M T F P T Y I F (配列番号 337) を含むコアー CM コンセンサス 3 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 L T F P T Y W F (配列番号 338) を含むコアー CM コンセンサス 3 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 M T F P T Y W F (配列番号 339) を含むコアー CM コンセンサス 3 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 S T F P F G M F (配列番号 17) を含むコアー CM コンセンサス 3 配列を含む。

【0052】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 D W L Y W M G I (配列番号 348) を含むコアー CM コンセンサス 4 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 D W L Y W P G I (配列番号 19) を含むコアー CM コンセンサス 4 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 D W L Y W M S I (配列番号 349) を含むコアー CM コンセンサス 4 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列 D W L Y W P S I (配列番号 350) を含むコアー CM コンセンサス 4 配列を含む。

ス 4 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列H W H L G P P T (配列番号351)を含むコアーCMコンセンサス4配列を含む。

【0053】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列I S S G L L S S (配列番号14)を含むコアーCMコンセンサス5配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列S V S G L L S H (配列番号364)を含むコアーCMコンセンサス5配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列S V S G L L S S (配列番号365)を含むコアーCMコンセンサス5配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列S V S G L R S H (配列番号366)を含むコアーCMコンセンサス5配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列S V S G L R S S (配列番号367)を含むコアーCMコンセンサス5配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列T L S G L R S P (配列番号368)を含むコアーCMコンセンサス5配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列T S S G L R S P (配列番号369)を含むコアーCMコンセンサス5配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列T V S G L R S P (配列番号370)を含むコアーCMコンセンサス5配列を含む。

【0054】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列A F Q A L R M (配列番号379)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列A H Q A L R M (配列番号380)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列A N Q A L R M (配列番号381)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列A N Q A L R M A (配列番号382)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L L E A L R A L (配列番号383)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L L N A L R A L (配列番号384)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L L Q A L R A L (配列番号385)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L L S A L R A L (配列番号386)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L L Q S L R A L (配列番号389)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L L S S L R A L (配列番号390)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列Q F Q A L R M (配列番号391)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列Q H Q A L R M (配列番号392)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列Q N Q A L R M (配列番号393)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列Q N Q A L R M A (配列番号15)を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。

【0055】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L K A A P R W A (配列番号24)を含むコアーCMコンセンサス7配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L K A A P V W A (配列番号403)を含むコアーCMコンセンサス7配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L K A A P R W F (配列番号404)を含むコアーCMコンセンサス7配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L K A A P V W F (配列番号405)を含むコアーCMコンセンサス7配列を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L Y A A P R W A (配列番号50)

(配列番号 4 0 6) を含むコア－C M コンセンサス 7 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 L Y A A P V W A (配列番号 4 0 7) を含むコア－C M コンセンサス 7 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 L Y A A P R W F (配列番号 4 0 8) を含むコア－C M コンセンサス 7 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 L Y A A P V W F (配列番号 4 0 9) を含むコア－C M コンセンサス 7 配列を含む。

【 0 0 5 6 】

いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 G P S H L V L T (配列番号 2 5) を含むコア－C M コンセンサス 8 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 L P A G L L L (配列番号 4 0 2) を含むコア－C M コンセンサス 8 配列を含む。10 いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 L P A G L L L R (配列番号 4 2 0) を含むコア－C M コンセンサス 8 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 L P A H L V L L (配列番号 4 2 1) を含むコア－C M コンセンサス 8 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 L P S H L V L L (配列番号 4 2 2) を含むコア－C M コンセンサス 8 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 L P A H L V L V (配列番号 4 2 3) を含むコア－C M コンセンサス 8 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 L P S H L V L V (配列番号 4 2 4) を含むコア－C M コンセンサス 8 配列を含む。

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 R M H L R S L G (配列番号 2 9) を含むコア－C M コンセンサス 9 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 R R H D G L R A (配列番号 4 3 4) を含むコア－C M コンセンサス 9 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 R R H D G L R S (配列番号 4 3 5) を含むコア－C M コンセンサス 9 配列を含む。20

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 A Q N L L G M V (配列番号 1 6) を含むコア－C M コンセンサス 1 0 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 I A N L L S M V (配列番号 4 5 0) を含むコア－C M コンセンサス 1 0 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 I L N L L S M V (配列番号 4 5 1) を含むコア－C M コンセンサス 1 0 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 I Q N L L S M V (配列番号 4 5 2) を含むコア－C M コンセンサス 1 0 配列を含む。30

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 P A G L W L D P (配列番号 3 3) を含むコア－C M コンセンサス 1 1 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 P A S L W Y T Q (配列番号 4 5 7) を含むコア－C M コンセンサス 1 1 配列を含む。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 A L G L L R L P (配列番号 4 7 0) を含むコア－C M コンセンサス 1 2 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 A L G L L S L P (配列番号 4 7 1) を含むコア－C M コンセンサス 1 2 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 A S G L L R F P (配列番号 4 7 2) を含むコア－C M コンセンサス 1 2 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 A V G L L A P P (配列番号 3 1) を含むコア－C M コンセンサス 1 2 配列を含む。40

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 L A A P L G L L (配列番号 3 0) を含むコア－C M コンセンサス 1 3 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 L L A P S H R A (配列番号 3 2) を含むコア－C M コンセンサス 1 3 配列を含む。50

【 0 0 6 2 】

いくつかの実施形態によれば、C Mは、アミノ酸配列 L L L P A H G G（配列番号 4 7 4）を含むコアー C Mコンセンサス 1 3 配列を含む。いくつかの実施形態によれば、C Mは、アミノ酸配列 L L L P L L G S（配列番号 4 8 3）を含むコアー C Mコンセンサス 1 3 配列を含む。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態によれば、C Mは、少なくとも 2 種のプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態によれば、少なくとも 1 つのプロテアーゼは M M P であり、そして少なくとも 1 つのプロテアーゼは、表 7 に示されるそれらの酵素から成る群から選択される。

【 0 0 6 4 】

【表20】

表7：典型的なプロテアーゼ及び／又は酵素

ADAMS、ADAMTS、例えば ADAM8 ADAM9 ADAM10 ADAM12 ADAM15 ADAM17/TACE ADAMDEC1 ADAMTS1 ADAMTS4 ADAMTS5 スパラギン酸プロテアーゼ、 例えば BACE レニン	システィンプロテイナーゼ、 例えば クルジパイン レグマイン オツバシン-2 (Otubain-2) KLKs、例えば KLK4 KLK5 KLK6 KLK7 KLK8 KLK10 KLK11 KLK13 KLK14	セリンプロテアーゼ、例えば 活性化されたプロテイン C カテプシン A カテプシン G キマーゼ 凝固因子プロテアーゼ (例えば、FVIIa、FIXa、 FXa、FXIa) エラスターーゼ グランザイムB グアニジノベンゾエターゼ HtrA1 ヒト好中球エラスターーゼ ラクトフェリン マラプシン (Marapsin) NS3/4A PACE4	10
アスパラギン酸カテプシン、 例えば カテプシン D カテプシン E カスパーゼ、例えば カスパーゼ 1 カスパーゼ 2 カスパーゼ 3 カスパーゼ 4 カスパーゼ 5 カスパーゼ 6 カスパーゼ 7 カスパーゼ 8 カスパーゼ 9 カスパーゼ 10 カスパーゼ 14	メタロプロテイナーゼ、 例えば メプリン ネブリライシン PSMA BMP-1 MMPs、例えば MMP1 MMP2 MMP3 MMP7 MMP8 MMP9 MMP10 MMP11 MMP12 MMP13 MMP14 MMP15 MMP16 MMP17 MMP19 MMP20 MMP23 MMP24 MMP26 MMP27	プラスミン PSA tPA トロンビン トリプターーゼ uPA II型トランスマembrane セリンプロテアーゼ (TTSPs)、 例えば DESC1 DPP-4 FAP ヘプシン マトリプターーゼ-2 MT-SP1/マトリプターーゼ TMPRSS2 TMPRSS3 TMPRSS4	20 30 40

【0065】

いくつかの実施形態によれば、抗体は少なくとも、第1CM及び第2CMを含む。いくつかの実施形態によれば、前記第1CM及び第2CMは、それぞれ、15以下の長さのアミノ酸のポリペプチドである。いくつかの実施形態によれば、未切断状態下での抗体中の第1CM及び第2CMは、次のような、N-末端からC-末端への構造配置を有する：剤

- C M 1 - C M 2 - A B、A B - C M 2 - C M 1 - 剤、剤 - C M 2 - C M 1 - A B 又は A B - C M 1 - C M 2 - 剤。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、剤と C M 1 との間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、C M 1 と C M 2 との間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、C M 2 と A B との間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、剤と C M 1 との間に連結ペプチド、及び C M 2 と A B との間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、剤と C M 1 との間に連結ペプチド、及び C M 1 と C M 2 との間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、C M 1 と C M 2 との間に連結ペプチド、及び C M 2 と A B との間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、剤と C M 1 との間に連結ペプチド、C M 1 と C M 2 との間に連結ペプチド、及び C M 2 と A B との間に連結ペプチドを含む。10

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、少なくとも 1 つのマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) のための基質を含む第 1 C M、及び基質配列を含む第 2 C M を少なくとも含む。第 2 C M (C M 2) のための典型的な基質は、表 7 に列挙される 1 又は 2 以上の次の酵素又はプロテアーゼにより切断できる基質を包含するが、但しそれらだけには制限されない。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、特定のプロテアーゼとの使用のために選択される。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、マトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP)、好中球エステラーゼ、u型プラスミノーゲン活性化因子 (uPA、また、ウロキナーゼとも呼ばれる)、レグマイン、マトリプターゼ (また、本明細書においては、MT-SP 1 又は M T S P 1 とも呼ばれる)、トロンビン、システインプロテアーゼ、例えばカテプシン、ADAM 17、BMP - 1、HtrA 1 及び TMPRSSS、例えば TMPRSS 3 又は TMPRSS 4 から成る群から選択される、少なくとも 1 つのプロテアーゼのための基質である。20

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、好中球エラスターーゼのための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、uPA のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、レグマインのための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、マトリプターゼのための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、トロンビンのための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、システインプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、カテプシンのための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、ADAM 17 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、BMP - 1 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、HtrA 1 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、TMPRSSS のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、TMPRSS 3 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、TMPRSS 4 のための基質である。30

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態によれば、適切な C M 2 は、少なくとも 1 つのプロテアーゼにより切斷され、そして配列 T G R G P S W V (配列番号 34); S A R G P S R W (配列番号 35); T A R G P S F K (配列番号 36); L S G R S D N H (配列番号 37); G G W H T G R N (配列番号 38); H T G R S G A L (配列番号 39); P L T G R S G G (配列番号 40); A A R G P A I H (配列番号 41); R G P A F N P M (配列番号 42); S S R G P A Y L (配列番号 43); R G P A T P I M (配列番号 44); R G P A (配列番号 45); G G Q P S G M W G W (配列番号 46); F P R P L G I T G L (配列番号 47); V H M P L G F L G P (配列番号 48); S P L T G R S G (配列番号 49); S A G F S L P A (配列番号 126); L A P L G L Q R R (配列番号 50); S G G P L G V R (40
50)

配列番号 51); P L G L (配列番号 52); G P R S F G L (配列番号 315) 及び/又は G P R S F G (配列番号 316)を含む。

【0070】

いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 T G R G P S W V (配列番号 34)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 S A R G P S R W (配列番号 35)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 T A R G P S F K (配列番号 36)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 L S G R S D N H (配列番号 37)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 G G W H T G R N (配列番号 38)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 H T G R S G A L (配列番号 39)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 P L T G R S G G (配列番号 40)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 A A R G P A I H (配列番号 41)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 R G P A F N P M (配列番号 42)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 S S R G P A Y L (配列番号 43)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 R G P A T P I M (配列番号 44)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 R G P A (配列番号 45)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 G G Q P S G M W G W (配列番号 46)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 F P R P L G I T G L (配列番号 47)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 V H M P L G F L G P (配列番号 48)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 S P L T G R S G (配列番号 49)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 L A P L G L Q R R (配列番号 50)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 S G G P L G V R (配列番号 51)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 P L G L (配列番号 52)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 G P R S F G L (配列番号 315)を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、アミノ酸配列 G P R S F G (配列番号 316)を含む。
10

【0071】

いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、少なくとも 1 つのM M P のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、表 7 に列挙される少なくとも 1 つのM M P のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は、M M P 9 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 1 は第 1 M M P のための基質であり、そして C M 2 は第 2 M M P のための基質であり、ここで第 1 M M P 及び第 2 M M P は異なったM M P である。いくつかの実施形態によれば、C M 1 はM M P のための第 1 基質配列であり、そして C M 2 は同じ M M P のための第 2 基質であり、ここで C M 1 及び C M 2 は異なった基質配列を有する。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は複数のM M P のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は少なくともM M P 9 又はM M P 1 4 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は複数のM M p のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 2 は少なくともM M P 9 及びM M P 1 4 のための基質である。いくつかの実施形態によれば C M 1 及び C M 2 は両者とも、M M P 9 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 1 及び C M 2 は両者ともM M P 1 4 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 1 はM M P 9 のための基質であり、そして C M 2 はM M P 1 4 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M 1 はM M P 9 のための基質であり、そして C M 2 はM M P 1 4 のための基質である。
30

【0072】

いくつかの実施形態によれば、C M 1 及び/又はC M 2 の少なくとも 1 つは、M M P のための基質であり、そして配列 I S S G L L S S (配列番号 14); Q N Q A L R M A (配列番号 15); A Q N L L G M V (配列番号 16); S T F P F G M F (配列番号 17); P V G Y T S S L (配列番号 18); D W L Y W P G I (配列番号 19); M I A P V A
40

Y R (配列番号 2 0); R P S P M W A Y (配列番号 2 1); W A T P R P M R (配列番号 2 2); F R L L D W Q W (配列番号 2 3); L K A A P R W A (配列番号 2 4); G P S H L V L T (配列番号 2 5); L P G G L S P W (配列番号 2 6); M G L F S E A G (配列番号 2 7); S P L P L R V P (配列番号 2 8); R M H L R S L G (配列番号 2 9); L A A P L G L L (配列番号 3 0); A V G L L A P P (配列番号 3 1); L L A P S H R A (配列番号 3 2); P A G L W L D P (配列番号 3 3); 及び/又は I S S G L S S (配列番号 1 5 9)を含む。

【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態によれば、第1切断剤及び第2切断剤は同じプロテアーゼであり、そして第1CM及び第2CMは、酵素のための異なった基質である。いくつかの実施形態によれば、第1切断剤及び第2切断剤は異なったプロテアーゼである。いくつかの実施形態によれば、第1切断及び第2切断剤は、標的組織に共局在される。いくつかの実施形態によれば、第1CM及び第2CMは、標的組織において少なくとも1つの切断剤により切断される。

【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態によれば、A Bに接合される剤は、治療剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は、抗腫瘍剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は毒素又はそのフラグメントである。本明細書において使用される場合、毒素フラグメントは、毒性活性を保存するフラグメントである。いくつかの実施形態によれば、剤は切断可能リンカーを介してA Bに接合される。いくつかの実施形態によれば、剤は、少なくとも1つのMMP-切断可能基質配列を含むリンカーを介してA Bに接合される。いくつかの実施形態によれば、剤は非切断可能リンカーを介してA Bに接合される。いくつかの実施形態によれば、剤は微小管阻害剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は、核酸損傷剤、例えばDNAアルキル化剤又はDNAインターラーカー、又は他のDNA損傷剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は、表3に列挙される群から選択される剤である。いくつかの実施形態によれば、剤はドラスタチンである。いくつかの実施形態によれば、剤はアウリスタチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤は、アウリスタチンE又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤は、モノメチルアウリスタチンE(MMAE)である。いくつかの実施形態によれば、剤は、モノメチルアウリスタチンD(MMAD)である。いくつかの実施形態によれば、剤は、メイタンシノイド又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤はDM1又はDM4である。いくつかの実施形態によれば、剤はデュオカルマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤はカリケアマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば剤はピロロベンゾジアゼピンである。

【 0 0 7 5 】

いくつかの実施形態によれば、剤は抗炎症剤である。

【 0 0 7 6 】

いくつかの実施形態によれば、抗体はまた、検出可能部分も含む。いくつかの実施形態によれば、検出可能部分は、診断剤である。

【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態によれば、接合された抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、検出できる標識を含む。いくつかの実施形態によれば、検出できる標識は、イメージング剤、造影剤、酵素、蛍光標識、発色団、色素、1又は2以上の金属イオン、又はリガンドベースの標識を含む。いくつかの実施形態によれば、イメージング剤は、放射性同位体を含む。いくつかの実施形態によれば、放射性同位体は、インジウム又はテクネチウムである。いくつかの実施形態によれば、造影剤は、ヨウ素、ガドリニウム又は酸化鉄を含む。いくつかの実施形態によれば、酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ又は-L-ガラクトシダーゼを含む。いくつかの実施形態によれば、蛍光標識は、黄色蛍光タンパク質(YFP)、シアントンパク質(CFP)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、修飾された赤色蛍光タンパク質(mRFP)、赤色蛍光タンパク質tダイマ

10

20

30

40

50

-2 (RFP-tダイマー2)、HCR赤、又はユーロピウム誘導体を含む。いくつかの実施形態によれば、発光標識は、N-メチルアクリジウム誘導体を含む。いくつかの実施形態によれば、標識は、Alexa Fluor(登録商標)標識、例えばAlexa Fluor(登録商標)680又はAlexa Fluor(登録商標)750を含む。いくつかの実施形態によれば、リガンドベースの標識は、ビオチン、アビジン、ストレプタビジン又は1又は2以上のハプテンを含む。

【0078】

いくつかの実施形態によれば、抗体中のA Bは天然において、1又は2以上のジスルフィド結合を含む。いくつかの実施形態によれば、A Bは、1又は2以上のジスルフィド結合を含むよう操作され得る。

10

【0079】

いくつかの実施形態によれば、抗体及び/又は接合された抗体は、単一特異的である。いくつかの実施形態によれば、抗体及び/又は接合された抗体は、多重特異的であり、本明細書においては、多重特異的抗体及び/又は接合された多重特異的抗体とも呼ばれる。いくつかの実施形態によれば、多重特異的抗体及び/又は接合された多重特異的抗体は、二重特異的又は三重特異的である。いくつかの実施形態によれば、抗体及び/又は接合された抗体は、プロ-二重特異的T細胞エンゲージャー(プロ-BITE)分子の一部として処方される。いくつかの実施形態によれば、抗体及び/又は接合された抗体は、プロ-キメラ抗原受容体(Pro-CAR)修飾T細胞又は他の操作された受容体の一部として処方される。

20

【0080】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、単一特異的である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、多重特異的であり、本明細書においては、多重特異的活性化可能抗体及び/又は接合された多重特異的活性化可能抗体としても言及される。本明細書においてし使用される場合、用語、「活性化可能抗体(activatable antibody)」及びそのすべての文法的变形は、特に断らない限り、活性化可能抗体が、本開示の多重特異的活性化可能抗体である実施形態を包含することが意図されるが、但しそれらだけには限定されない。本明細書においてし使用される場合、用語、「接合された活性化可能抗体(conjugated activatable antibody)」及びそのすべての文法的变形は、特に断らない限り、接合された活性化可能抗体が、本開示の接合された多重特異的活性化可能抗体である実施形態を包含することが意図されるが、但しそれらだけには限定されない。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体及び/又は接合された多重特異的活性化可能抗体は、二重特異的又は三重特異的である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、プロ-二重特異的T細胞エンゲージャー(プロ-BITE)分子の一部として処方される。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、プロ-キメラ抗原受容体(Pro-CAR)修飾T細胞又は他の操作された受容体の一部として処方される。

30

【0081】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に記載される活性化可能抗体、接合された活性化可能抗体、多重特異的活性化可能抗体及び/又は接合された多重特異的活性化可能抗体は、1又は2以上の追加の剤又は追加の剤の組合せと共に使用される。適切な追加の剤は、意図される用途、例えば癌のための現医薬品及び/又は外科的治療剤を包含する。例えば、活性化可能抗体、接合された活性化可能抗体、多重特異的活性化可能抗体及び/又は接合された多重特異的活性化可能抗体は、追加の化学療法又は抗腫瘍剤と共に使用され得る。

40

【0082】

活性化された状態での本明細書に記載される活性化可能抗体は、所定の標的に結合し、そして(i)標的に対して特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント(A B)；(ii)未切断状態下で標的へのA Bの結合を阻害するマスキング部分(M M)；及び(

50

iii) A B にカップリングされる切断可能部分 (C M) (ここで、前記 C M はマトリックス・メタロプロテアーゼのための基質として作用するポリペプチドである) を含む。

【 0 0 8 3 】

いくつかの実施形態によれば、未切断状態での活性化可能抗体は、次のような、N - 末端からC - 末端への構造配置を有する：MM - CM - AB 及びAB - CM - MM。

【 0 0 8 4 】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、MMとCMとの間に連結ペプチドを含む。

【 0 0 8 5 】

いくつかの実施形態によれば、活性可能抗体は、CMとABとの間に連結ペプチドを含む。 10

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、第1連結ペプチド (LP1) 及び第2連結ペプチド (LP2) を含み、そして未切断状態下での活性化可能抗体は、次のような、N - 末端からC - 末端への構造位置を有する：MM - LP1 - CM - LP2 - AB 又はAB - LP2 - CM - LP1 - MM。

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態によれば、LP1及びLP2の個々は、約1～20個の長さのアミノ酸のペプチドである。

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態によれば、前記2種の連結ペプチドは、お互い同一である必要はない。 20

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態によれば、LP1又はLP2の少なくとも1つは、(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (配列番号1) 及び(GGGS)_n (配列番号2) (nは少なくとも1つの整数である) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態によれば、LP1又はLP2の少なくとも1つは、GGS G (配列番号3)、GGSGG G (配列番号4)、GS G SG G (配列番号5)、G S G G G G (配列番号6)、GG G S G G (配列番号7)、及びG S S S G G (配列番号8)から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。 30

【 0 0 9 1 】

いくつかの実施形態によれば、LP1は、アミノ酸配列G S S G G S G G S G G S G (配列番号9)、G S S G G S G G S G G (配列番号10)、G S S G G S G G S G G S (配列番号11)、G S S G G S G G S G G S G G S (配列番号155)、G S S G G S G G S G (配列番号156)、又はG S S G G S G G S G S (配列番号157)を含む。

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施形態によれば、LP2は、アミノ酸配列G S S、G G S、G G G S (配列番号158)、G S S G T (配列番号12) 又はG S S G (配列番号13)を含む。

【 0 0 9 3 】

いくつかの実施形態によれば、ABは、標的への結合のために、約100 nM又はそれ以下の平衡解離定数を有する。 40

【 0 0 9 4 】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、標的を特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態によれば、標的を結合する抗体又はその免疫学的活性フラグメントは、モノクローナル抗体、ドメイン、抗体、一本鎖、Fa b フラグメント、F(ab')₂フラグメント、sc F v、sc A b, d A b、単一ドメインH鎖抗体、及び単一ドメインL鎖抗体である。いくつかの実施形態によれば、標的を結合するそのような抗体又はその免疫学的活性フラグメントは、マウス、他の齧歯類、ヒト化又は完全ヒトモノクローナル抗体である。 50

【0095】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、多重特異的活性化可能抗体である。本明細書において提供される多重特異的活性化可能抗体は、複数の抗原又はエピトープを認識し、そして多重特異的抗体の少なくとも1つの抗原 - 又はエピトープ結合ドメインに連結される少なくとも1つのマスキング部分（MM）を含む多重特異的抗体であり、ここでMMのカッティングが、抗原 - 又はエピトープ - 結合ドメインのその標的を結合する能力を低める。いくつかの実施形態によれば、MMは、少なくとも1つのMMPプロテアーゼのための基質として機能する切断可能部分（CM）を介して、多重特異的抗体の抗原 - 又はエピトープ - 結合ドメインにカッティングされる。本明細書において提供される多重特異的活性化可能抗体は、循環において安定し、治療及び / 又は診断の意図される部位で活性化されるが、しかし正常な、すなわち健康な組織においては活性化されず、そして活性化される場合、その対応する、修飾されていない多重特異的抗体に、少なくとも匹敵する標的への結合を示す。

【0096】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び / 又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び / 又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、Jagged標的、例えばJagged 1 及び / 又はJagged 2 を特異的に結合し、そしてV H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列及びV H C D R 3 配列の組合せを含む第1抗体又はその抗原結合フラグメント（A B 1 ）を少なくとも含み、ここで前記V H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列及びV H C D R 3 配列の少なくとも1つは、アミノ酸配列S Y A M S（配列番号498）を少なくとも含むV H C D R 1 配列；アミノ酸配列S I D P E G R Q T Y Y A D S V K G（配列番号499）を少なくとも含むV H C D R 2 配列；アミノ酸配列D I G G R S A F D Y（配列番号500）を含むV H C D R 3 配列；及びそれらの組合せから選択される。

【0097】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び / 又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び / 又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、Jagged標的、例えばJagged 1 及び / 又はJagged 2 を特異的に結合し、そしてV L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列及びV L C D R 3 配列の組合せを含む第1抗体又はその抗原結合フラグメント（A B 1 ）を少なくとも含み、ここで前記V L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列及びV L C D R 3 配列の少なくとも1つは、アミノ酸配列R A S Q S I S S Y（配列番号501）を少なくとも含むV H C D R 1 配列；アミノ酸配列A A S S L Q S（配列番号502）を少なくとも含むV H C D R 2 配列；アミノ酸配列Q Q T V V A P P L（配列番号503）を含むV L C D R 3 配列；及びそれらの組合せから選択される。

【0098】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び / 又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び / 又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、Jagged標的、例えばJagged 1 及び / 又はJagged 2 を特異的に結合し、そしてV H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列及びV H C D R 3 配列の組合せを含む第1抗体又はその抗原結合フラグメント（A B 1 ）を少なくとも含み、ここで前記V H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列及びV H C D R 3 配列の少なくとも1つは、アミノ酸配列S Y A M S（配列番号498）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含むV H C D R 1 配列；アミノ酸配列S I D P E G R Q T Y Y A D S V K G（配列番号499）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含むV H C D R 2 配列；アミノ酸配列D I G G R S A F D Y（配列番号500）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含むV H C D R 3 配列；アミノ酸配列Q Q T V V A P P L（配列番号501）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含むV L C D R 1 配列；アミノ酸配列A A S S L Q S（配列番号502）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含むV L C D R 2 配列；アミノ酸配列Q Q T V V A P P L（配列番号503）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含むV L C D R 3 配列；及びそれらの組合せから選択される。

6%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含むV H C D R 3 配列；及びそれらの組合せから選択される。

【0099】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、Jagged標的、例えば Jagged 1 及び／又は Jagged 2 を特異的に結合し、そして V L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列及び V L C D R 3 配列の組合せを含む第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント（A B 1 ）を少なくとも含み、ここで前記 V L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列及び V L C D R 3 配列の少なくとも 1 つは、アミノ酸配列 R A S Q S I S S Y （配列番号 5 0 1 ）に対して、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %又はそれ以上同一である配列を含むV H C D R 1 配列；アミノ酸配列 A A S S L Q S （配列番号 5 0 2 ）に対して、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %又はそれ以上同一である配列を含むV H C D R 2 配列；アミノ酸配列 Q Q T V V A P P L （配列番号 5 0 3 ）に対して、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %又はそれ以上同一である配列を含むV L C D R 3 配列；及びそれらの組合せから選択される。 10

【0100】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、Jagged標的、例えば Jagged 1 及び／又は Jagged 2 を特異的に結合し、そして V H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列、V H C D R 3 配列、V L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列、及び V L C D R 3 配列の組合せを含む第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント（A B 1 ）を少なくとも含み、ここで前記 V H C D R 1 配列は、アミノ酸配列 S Y A M S （配列番号 4 9 8 ）を少なくとも含み；V H C D R 2 配列は、アミノ酸配列 S I D P E G R Q T Y Y A D S V K G （配列番号 4 9 9 ）を少なくとも含み；V H C D R 3 配列は、アミノ酸配列 D I G G R S A F D Y （配列番号 5 0 0 ）を含み；V L C D R 1 配列は、アミノ酸配列 R A S Q S I S S Y （配列番号 5 0 1 ）を少なくとも含み；V L C D R 2 配列は、アミノ酸配列 A A S S L Q S （配列番号 5 0 2 ）を少なくとも含み；そして V L C D R 3 配列はアミノ酸配列 Q Q T V V A P P L （配列番号 5 0 3 ）を含む。 20

【0101】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、Jagged標的、例えば Jagged 1 及び／又は Jagged 2 を特異的に結合し、そして V H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列、V H C D R 3 配列、V L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列及び V L C D R 3 配列の組合せを含む第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント（A B 1 ）を少なくとも含み、ここで V H C D R 1 配列は、アミノ酸配列 S Y A M S （配列番号 4 9 8 ）に対して、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %又はそれ以上同一である配列を含み；V H C D R 2 配列は、アミノ酸配列 S I D P E G R Q T Y Y A D S V K G （配列番号 4 9 9 ）に対して、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %又はそれ以上同一である配列を含み；V H C D R 3 配列は、アミノ酸配列 D I G G R S A F D Y （配列番号 5 0 0 ）に対して、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %又はそれ以上同一である配列を含み；V L C D R 1 配列は、アミノ酸配列 R A S Q S I S S Y （配列番号 5 0 1 ）に対して、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %又はそれ以上同一である配列を含み；V L C D R 2 配列は、アミノ酸配列 A A S S L Q S （配列 40

50

番号 502) に対して、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれ以上同一である配列を含み；そして VL CDR3 配列は、アミノ酸配列 QQTVVAPP (配列番号 503) に対して、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれ以上同一である配列を含む。

【0102】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、上皮成長因子受容体（EGFR）を特異的に結合し、そして VH CDR1 配列、VH CDR2 配列及び VH CDR3 配列の組合せを含む第1抗体又はその抗原結合フラグメント（AB1）を少なくとも含み、ここで前記 VH CDR1 配列、VH CDR2 配列及び VH CDR3 配列の少なくとも 1 つは、アミノ酸配列 NYGVH (配列番号 504) を少なくとも含む VH CDR1 配列；アミノ酸配列 VIWSGGNTDYNTPTS (配列番号 505) を少なくとも含む VH CDR2 配列；アミノ酸配列 ALTYDYEFA (配列番号 506) を含む VH CDR3 配列；及びそれらの組合せから選択される。10

【0103】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、EGFR を特異的に結合し、そして VL CDR1 配列、VL CDR2 配列及び VL CDR3 配列の組合せを含む第1抗体又はその抗原結合フラグメント（AB1）を少なくとも含み、ここで前記 VL CDR1 配列、VL CDR2 配列及び VL CDR3 配列の少なくとも 1 つは、アミノ酸配列 RASQSIGTNIH (配列番号 507) を少なくとも含む VH CDR1 配列；アミノ酸配列 KYASESIS (配列番号 508) を少なくとも含む VH CDR2 配列；アミノ酸配列 QQNNNWPTT (配列番号 509) を含む VH CDR3 配列；及びそれらの組合せから選択される。20

【0104】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、EGFR を特異的に結合し、そして VH CDR1 配列、VH CDR2 配列及び VH CDR3 配列の組合せを含む第1抗体又はその抗原結合フラグメント（AB1）を少なくとも含み、ここで前記 VH CDR1 配列、VH CDR2 配列及び VH CDR3 配列の少なくとも 1 つは、アミノ酸配列 NYGVH (配列番号 504) に対して、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれ以上同一である配列を含む VH CDR1 配列；アミノ酸配列 VIWSGGNTDYNTPTS (配列番号 505) に対して、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれ以上同一である配列を含む VH CDR2 配列；アミノ酸配列 ALTYDYEFA (配列番号 506) に対して、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又はそれ以上同一である配列を含む VH CDR3 配列；及びそれらの組合せから選択される。30

【0105】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、EGFR を特異的に結合し、そして VL CDR1 配列、VL CDR2 配列及び VL CDR3 配列の組合せを含む第1抗体又はその抗原結合フラグメント（AB1）を少なくとも含み、ここで前記 VL CDR1 配列、VL CDR2 配列及び VL CDR3 配列の少なくとも 1 つは、アミノ酸配列 RASQSIGTNIH (配列番号 507) に対して、少なくとも 90%40
50

、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含むVH CDR1配列；アミノ酸配列KYASESIS（配列番号508）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含むVH CDR2配列；アミノ酸配列QQNNNWPTT（配列番号509）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含むVH CDR3配列；及びそれらの組合せから選択される。

【0106】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、EGFRを特異的に結合し、そしてVH CDR1配列、VH CDR2配列、VH CDR3配列、VL CDR1配列、VL CDR2配列、及びVL CDR3配列の組合せを含む第1抗体又はその抗原結合フラグメント（AB1）を少なくとも含み、ここで前記VH CDR1配列は、アミノ酸配列NYGVH（配列番号504）を少なくとも含み；VH CDR2配列は、アミノ酸配列VIWSGGNTDYNTPFTS（配列番号505）を少なくとも含み；VH CDR3配列は、アミノ酸配列ALTYDYEFAY（配列番号506）を含み；VL CDR1配列は、アミノ酸配列RASQSIGTNIH（配列番号507）を少なくとも含み；VL CDR2配列は、アミノ酸配列KYASESIS（配列番号508）を少なくとも含み；そしてVL CDR3配列はアミノ酸配列QQNNNWPTT（配列番号509）を含む。

【0107】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、EGFRを特異的に結合し、そしてVH CDR1配列、VH CDR2配列、VH CDR3配列、VL CDR1配列、VL CDR2配列及びVL CDR3配列の組合せを含む第1抗体又はその抗原結合フラグメント（AB1）を少なくとも含み、ここでVH CDR1配列は、アミノ酸配列NYGVH（配列番号504）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含み；VH CDR2配列は、アミノ酸配列VIWSGGNTDYNTPFTS（配列番号505）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含み；VH CDR3配列は、アミノ酸配列ALTYDYEFAY（配列番号506）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含み；VL CDR1配列は、アミノ酸配列RASQSIGTNIH（配列番号507）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含み；VL CDR2配列は、アミノ酸配列KYASESIS（配列番号508）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含み；そしてVL CDR3配列は、アミノ酸配列QQNNNWPTT（配列番号509）に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一である配列を含む。

【0108】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、配列番号54、56、57、58、61、63、65、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、及び114から成る群から選択されるH鎖アミノ酸配列を少なくと

10

20

30

40

50

も含む。いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、配列番号 55、59、60、62、64、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111及び113から成る群から選択されるL鎖アミノ酸配列を少なくとも含む。いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、配列番号 54、56、57、58、61、63、65、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、及び114から成る群から選択されるH鎖アミノ酸配列、及び配列番号 55、59、60、62、64、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111及び113から成る群から選択されるL鎖アミノ酸配列を少なくとも含む。

【0109】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、配列番号 54、56、57、58、61、63、65、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、及び114から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一であるH鎖アミノ酸配列を少なくとも含む。いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、配列番号 55、59、60、62、64、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111及び113から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一であるL鎖アミノ酸配列を少なくとも含む。いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、例えば本開示の多重特異的活性化可能抗体及び／又は接合された多重特異的活性化可能抗体（但し、それらだけには限定されない）は、配列番号 54、56、57、58、61、63、65、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、及び114から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一であるH鎖アミノ酸配列、及び配列番号 55、59、60、62、64、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111及び113から成る群から選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一であるL鎖アミノ酸配列を少なくとも含む。

【0110】

いくつかの実施形態によれば、MMは、標的へのABの平衡解離定数よりも高い、ABへの結合のための平衡解離定数を有する。

【0111】

いくつかの実施形態によれば、MMは、標的へのABの平衡解離定数以下である、Ab

10

20

30

40

50

への結合のための平衡解離定数を有する。

【 0 1 1 2 】

いくつかの実施形態によれば、MM、切断された状態で標的への結合のためにABを妨害も又はそれと競争もしない。

【 0 1 1 3 】

いくつかの実施形態によれば、MMは、約2-40個の長さのアミノ酸のポリペプチドである。例えば、MMは、約40個までの長さのアミノ酸のポリペプチドである。

【 0 1 1 4 】

いくつかの実施形態によれば、MMポリペプチド配列は、ABの任意の天然の結合パートナーのその配列とは異なる。いくつかの実施形態によれば、MMポリペプチド配列は、ABの任意の天然の結合パートナーに対して50%以下、同一である。いくつかの実施形態によれば、MMポリペプチド配列は、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、40%、30%、25%、20%、15%又は10%以下、同一である。10

【 0 1 1 5 】

いくつかの実施形態によれば、ABへのMMのカップリングは、ABのその標的を結合する能力を低め、結果的に、標的側のMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、標的側のMMにカップリングされない場合のABの K_d よりも少なくとも2倍、高い。

【 0 1 1 6 】

いくつかの実施形態によれば、ABへのMMのカップリングは、ABのその標的を結合する能力を低め、結果的に、標的側のMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、標的側のMMにカップリングされない場合のABの K_d よりも少なくとも3倍、高い。20

【 0 1 1 7 】

いくつかの実施形態によれば、ABへのMMのカップリングは、ABのその標的を結合する能力を低め、結果的に、標的側のMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、標的側のMMにカップリングされない場合のABの K_d よりも少なくとも5倍、高い。

【 0 1 1 8 】

いくつかの実施形態によれば、ABへのMMのカップリングは、ABのその標的を結合する能力を低め、結果的に、標的側のMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、標的側のMMにカップリングされない場合のABの K_d よりも少なくとも10倍、高い。30

【 0 1 1 9 】

いくつかの実施形態によれば、ABへのMMのカップリングは、ABのその標的を結合する能力を低め、結果的に、標的側のMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、標的側のMMにカップリングされない場合のABの K_d よりも少なくとも20倍、高い。

【 0 1 2 0 】

いくつかの実施形態によれば、ABへのMMのカップリングは、ABのその標的を結合する能力を低め、結果的に、標的側のMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、標的側のMMにカップリングされない場合のABの K_d よりも少なくとも40倍、高い。40

【 0 1 2 1 】

いくつかの実施形態によれば、ABへのMMのカップリングは、ABのその標的を結合する能力を低め、結果的に、標的側のMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、標的側のMMにカップリングされない場合のABの K_d よりも少なくとも100倍、高い。

【 0 1 2 2 】

いくつかの実施形態によれば、ABへのMMのカップリングは、ABのその標的を結合50

する能力を低め、結果的に、標的側のMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、標的側のMMにカップリングされない場合のABの K_d よりも少なくとも100倍、高い。

【0123】

いくつかの実施形態によれば、ABへのMMのカップリングは、ABのその標的を結合する能力を低め、結果的に、標的側のMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、標的側のMMにカップリングされない場合のABの K_d よりも少なくとも10,000倍、高い。

【0124】

いくつかの実施形態によれば、MMPプロテアーゼは、組織において標的と共に局在化され、そしてMMPは、活性化可能抗体がMMPに暴露される場合、活性化可能抗体中のCMを切断する。10

【0125】

いくつかの実施形態によれば、標的の存在下で、MMは、標的置換アッセイ、例えばPCT国際公開番号2009/025846号及び第2010/081173号に記載されるアッセイを用いて、インビトロでアッセイされる場合、CMが切断されている場合に比較して、CMが切断されていない場合、標的を結合するABの能力を、少なくとも90%低める。

【0126】

いくつかの実施形態によれば、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が、標的への未修飾AB結合の平衡解離定数よりも少なくとも2倍、高い平衡解離定数で生じるよう低められるが、ところが切断された状態で(すなわち、活性化可能抗体が切断された状態にある場合)、ABは標的を結合するよう、CMは活性化可能抗体に配置される。20

【0127】

いくつかの実施形態によれば、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が、標的への未修飾AB結合の平衡解離定数よりも少なくとも5倍、高い平衡解離定数で生じるよう低められるが、ところが切断された状態で(すなわち、活性化可能抗体が切断された状態にある場合)、ABは標的を結合するよう、CMは活性化可能抗体に配置される。

【0128】

いくつかの実施形態によれば、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が、標的への未修飾AB結合の平衡解離定数よりも少なくとも10倍、高い平衡解離定数で生じるよう低められるが、ところが切断された状態で(すなわち、活性化可能抗体が切断された状態にある場合)、ABは標的を結合するよう、CMは活性化可能抗体に配置される。30

【0129】

いくつかの実施形態によれば、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が、標的への未修飾AB結合の平衡解離定数よりも少なくとも20倍、高い平衡解離定数で生じるよう低められるが、ところが切断された状態で(すなわち、活性化可能抗体が切断された状態にある場合)、ABは標的を結合するよう、CMは活性化可能抗体に配置される。

【0130】

いくつかの実施形態によれば、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が、標的への未修飾AB結合の平衡解離定数よりも少なくとも40倍、高い平衡解離定数で生じるよう低められるが、ところが切断された状態で(すなわち、活性化可能抗体が切断された状態にある場合)、ABは標的を結合するよう、CMは活性化可能抗体に配置される。40

【0131】

いくつかの実施形態によれば、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が、標的への未修飾AB結合の平衡解離定数よりも少なくとも50倍、高い平衡解離定数で生じるよう低められるが、ところが切断された状態で(すなわち、活性化可能抗体が切断された状態にある場合)、ABは標的を結合するよう、CMは活性化可能抗体に配置される。

【0132】

いくつかの実施形態によれば、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が、標的50

への未修飾 A B 結合の平衡解離定数よりも少なくとも 100 倍、高い平衡解離定数で生じるよう低められるが、ところが切断された状態で（すなわち、活性化可能抗体が切断された状態にある場合）、A B は標的を結合するよう、C M は活性化可能抗体に配置される。

【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態によれば、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が、標的への未修飾 A B 結合の平衡解離定数よりも少なくとも 200 倍、高い平衡解離定数で生じるよう低められるが、ところが切断された状態で（すなわち、活性化可能抗体が切断された状態にある場合）、A B は標的を結合するよう、C M は活性化可能抗体に配置される。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態によれば、C M は、15 個までの長さのアミノ酸のポリペプチドである。 10

【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態によれば、C M は、少なくとも 1 つのマトリックス・メタロプロテアーゼ (MMP) のための基質である。MMP の例としては、次のものを包含する：MMP 1； MMP 2； MMP 3； MMP 7； MMP 8； MMP 9； MMP 10； MMP 11； MMP 12； MMP 13； MMP 14； MMP 15； MMP 16； MMP 17； MMP 19； MMP 20； MMP 23； MMP 24； MMP 26； 及び MMP 27。いくつかの実施形態によれば、C M は、MMP 9、MMP 14、MMP 1、MMP 3、MMP 13、MMP 17、MMP 11、及び MMP 19 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M は、MMP 9 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M は、MMP 14 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M は、複数の MMP のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M は、少なくとも MMP 9 及び MMP 14 のための基質である。いくつかの実施形態によれば、C M は、同じ MMP のための複数の基質を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、少なくとも複数の MMP 9 基質を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、少なくとも複数の MMP 14 基質を含む。 20

【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態によれば、C M は、MMP のための基質であり、そして配列 I S S G L L S S (配列番号 14)； Q N Q A L R M A (配列番号 15)； A Q N L L G M V (配列番号 16)； S T F P F G M F (配列番号 17)； P V G Y T S S L (配列番号 18)； D W L Y W P G I (配列番号 19)； M I A P V A Y R (配列番号 20)； R P S P M W A Y (配列番号 21)； W A T P R P M R (配列番号 22)； F R L L D W Q W (配列番号 23)； L K A A P R W A (配列番号 24)； G P S H L V L T (配列番号 25)； L P G G L S P W (配列番号 26)； M G L F S E A G (配列番号 27)； S P L P L R V P (配列番号 28)； R M H L R S L G (配列番号 29)； L A A P L G L L (配列番号 30)； A V G L L A P P (配列番号 31)； L L A P S H R A (配列番号 32)； P A G L W L D P (配列番号 33)； 及び/又は I S S G L S S (配列番号 159) を包含する。 30

【 0 1 3 7 】

いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 I S S G L L S S (配列番号 14) を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 Q N Q A L R M A (配列番号 15) を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 A Q N L L G M V (配列番号 16) を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 S T F P F G M F (配列番号 17) を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 P V G Y T S S L (配列番号 18) を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 D W L Y W P G I (配列番号 19) を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 M I A P V A Y R (配列番号 20) を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 R P S P M W A Y (配列番号 21) を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 W A T P R P M R (配列番号 22) を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 F R L L D W Q W (配列番号 23) を含む。いくつかの実施形態によれば、C M は、アミノ酸配列 L K A A P R W A (配列番号 24) を含む。 40

)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列G P S H L V L T (配列番号25)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L P G G L S P W (配列番号26)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列M G L F S E A G (配列番号27)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列S P L P L R V P (配列番号28)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列R M H L R S L G (配列番号29)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L A A P L G L L (配列番号30)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列A V G L L A P P (配列番号31)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列L L A P S H R A (配列番号32)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列P A G L W L D P (配列番号33)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列I S S G L S S (配列番号159)を含む。
10

【0138】

いくつかの実施形態によれば、CMは、少なくとも2種のプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態によれば、少なくとも1つのプロテアーゼはMMPであり、そして少なくとも1つのプロテアーゼは、表7に示されるそれらの酵素から成る群から選択される。

【0139】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は少なくとも、第1CM及び第2CMを含む。いくつかの実施形態によれば、前記第1CM及び第2CMは、それぞれ、15以下の長さのアミノ酸のポリペプチドである。いくつかの実施形態によれば、未切断状態下での活性化可能抗体中の第1CM及び第2CMは、次のような、N-末端からC-末端への構造配置を有する：MM-CM1-CM2-AB、AB-CM2-CM1-MM、MM-CM2-CM1-AB又はAB-CM1-CM2-MM。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、MMとCM1との間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、CM1とCM2との間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、CM2とABとの間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、MMとCM1との間に連結ペプチド、及びCM2とABとの間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、MMとCM1との間に連結ペプチド、及びCM1とCM2との間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、CM1とCM2との間に連結ペプチド、及びCM2とABとの間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、MMとCM1との間に連結ペプチド、CM1とCM2との間に連結ペプチド、及びCM2とABとの間に連結ペプチドを含む。
20
30

【0140】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、少なくとも1つのマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)のための基質を含む第1CM、及び基質配列を含む第2CMを少なくとも含む。第2CM(CM2)のための典型的な基質は、表7に列挙される1又は2以上の次の酵素又はプロテアーゼにより切断できる基質を包含するが、但しそれだけには制限されない。
40

【0141】

いくつかの実施形態によれば、CM2は、特定のプロテアーゼとの使用のために選択される。いくつかの実施形態によれば、CM2は、マトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)、好中球エステラーゼ、u型プラスミノーゲン活性化因子(uPA、また、ウロキナーゼとも呼ばれる)、レグマイン、マトリプターゼ(MT-SP1)、トロンビン、システインプロテアーゼ、例えばカテーテシン、ADAM17、BMP-1、HtrA1及びTMPRSS、例えばTMPRSS3又はTMPRSS4から成る群から選択される、少なくとも1つのプロテアーゼのための基質である。

【0142】

いくつかの実施形態によれば、CM2は、好中球エラスターーゼのための基質である。い
50

いくつかの実施形態によれば、CM2は、uPAのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、レグマインのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、マトリプターゼのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、トロンビンのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、システインプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、カテプシンのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、ADAM17のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、BMP-1のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、HtrA1のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、TMPRSSのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、TMPRSS3のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、TMPRSS4のための基質である。10

【0143】

いくつかの実施形態によれば、適切なCM2は、少なくとも1つのプロテアーゼにより切断され、そして配列TGRGPSWV(配列番号34); SARGPSRW(配列番号35); TARGPSFK(配列番号36); LSGRSDNH(配列番号37); GGWH T GR N(配列番号38); HTGRSGAL(配列番号39); PLTGRSGG(配列番号40); AARGPAIH(配列番号41); RGPAFNPM(配列番号42); SSRGPAYL(配列番号43); RGPATPIM(配列番号44); RGPA(配列番号45); GGQPSGMWGW(配列番号46); FPRPLGITGL(配列番号47); VHMPPLGFLGP(配列番号48); SPLTGRSG(配列番号49); SAGF SLPA(配列番号126); LAPLGLQRR(配列番号50); SGGPLGVR(配列番号51); PLGL(配列番号52); GPRSFG(配列番号315)及び/又はGPRSFG(配列番号316)を含む。20

【0144】

いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列TGRGPSWV(配列番号34)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列SARGPSRW(配列番号35)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列TARG PSFK(配列番号36)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列LSGRSDNH(配列番号37)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列GGWH T GR N(配列番号38)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列HTGRSGAL(配列番号39)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列PLTGRSGG(配列番号40)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列AARGPAIH(配列番号41)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列RGPAFNPM(配列番号42)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列SSRGPAYL(配列番号43)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列RGPA(配列番号44)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列RGQPSGMWGW(配列番号46)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列FPRPLGITGL(配列番号47)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列VHMPPLGFLGP(配列番号48)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列SPLTGRSG(配列番号49)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列LAPLGLQRR(配列番号50)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列SGGPLGVR(配列番号51)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列PLGL(配列番号52)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列GPRSFG(配列番号315)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列GPRSFG(配列番号316)を含む。3040

【0145】

いくつかの実施形態によれば、CM2は、少なくとも1つのMMPのための基質である50

。いくつかの実施形態によれば、CM2は、表7に列挙される少なくとも1つのMMPのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、MMP9のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は、MMPのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM1は第1MMPのための基質であり、そしてCM2は第2MMPのための基質であり、ここで第1MMP及び第2MMPは異なったMMPである。いくつかの実施形態によれば、CM1はMMPのための第1基質配列であり、そしてCM2は同じMMPのための第2基質であり、ここでCM1及びCM2は異なった基質配列を有する。いくつかの実施形態によれば、CM2は複数のMMPのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は少なくともMMP9又はMMP14のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は複数のMMPのための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM2は少なくともMMP9及びMMP14のための基質である。いくつかの実施形態によればCM1及びCM2は両者とも、MMP9のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM1及びCM2は両者ともMMP14のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM1はMMP9のための基質であり、そしてCM2はMMP14のための基質であり、そしてCM2はMMP9のための基質である。

【0146】

いくつかの実施形態によれば、CM1及び/又はCM2の少なくとも1つは、MMPのための基質であり、そして配列ISSGLLSS(配列番号14); QNQALRMA(配列番号15); AQNLGMV(配列番号16); STFPFGMF(配列番号17); PVGYTSSL(配列番号18); DWLYWPGI(配列番号19); MIAPVA
YR(配列番号20); RPSPMWAY(配列番号21); WATPRPMR(配列番号22); FRLLDWQW(配列番号23); LKAAPRWA(配列番号24); GPS
HLVLT(配列番号25); LPGGLSPW(配列番号26); MGLFSEAG(配列番号27); SPLLPLRVP(配列番号28); RMHLRSLG(配列番号29);
LAAPLGLL(配列番号30); AVGLLAPP(配列番号31); LLAPSHRA(配列番号32); PAGLWLDP(配列番号33); 及び/又はISSGLSS(配列番号159)を含む。

【0147】

いくつかの実施形態によれば、第1切断剤及び第2切断剤は同じマトリックス・メタロプロテアーゼであり、そして第1CM及び第2CMは、酵素のための異なった基質である。いくつかの実施形態によれば、第1切断剤及び第2切断剤は異なったプロテアーゼであり、ここで少なくとも1つのプロテアーゼはMMPである。いくつかの実施形態によれば、第1切断及び第2切断剤は、標的組織に共局在される。いくつかの実施形態によれば、第1CM及び第2CMは、標的組織において少なくとも1つの切断剤により切断される。

【0148】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、MMPに暴露され、そしてそれにより切断され、結果的に活性化された又は切断された状態で、活性化された抗体は、MMPがCMを切断した後、LP2及び/又はCM配列の一部を少なくとも含むL鎖アミノ酸配列を含む。

【0149】

いくつかの実施形態によれば、CMは、プロテアーゼ切断部位の非プライム側を含み；すなわち、CMはP1及びP2アミノ酸を少なくとも含み、そしていくつかの実施形態によれば、P1、P2及びP3アミノ酸を含み、そしていくつかの実施形態によれば、P1、P2、P3及びP4アミノ酸を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、プロテアーゼの切断部位の非プライム側及びプライム側を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、プロテアーゼ切断部位の非プライム側を含むが、しかしプライム側の少なくとも一部を欠いている。いくつかの実施形態によれば、CMは、プロテアーゼ切断部位の非プライム側を含むが、しかしプライム側を欠いている。そのようなCMは、抗体又は本明細書に開示されるような他の分子、例えば検出部分(但し、それだけには限定されない)に対

して直接的に、又はリンカーを介して連結され得る。

【0150】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、セツキシマブ又はパニツムマブであるか又はそれらに由来する A B ; 配列番号 160、167-200 及び 497 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む M M : 及び配列番号 14-33 及び 159 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む C M を少なくとも含む抗 - E G F R 活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、セツキシマブ又はパニツムマブであるか又はそれらに由来する A B ; 配列番号 160、167-200 及び 497 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む M M : 及び表 8 A - 8 M に提供される配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む C M を少なくとも含む抗 - E G F R 活性化可能抗体である。10 いくつかの実施形態によれば、抗 - E G F R 活性化可能抗体はまた、第 1 連結ペプチド (L P 1) 及び第 2 連結ペプチド (L P 2) も含み、そして未切断状態下での活性化可能抗体は、次のような、N - 末端から C - 末端への構造配置を有する : M M - L P 1 - C M - L P 2 - A B 又は A B - L P 2 - C M - L P 1 - M M 。いくつかの実施形態によれば、L P 1 及び L P 2 の個々は、約 1 - 20 個の長さのアミノ酸のペプチドである。いくつかの実施形態によれば、前記 2 種の連結ペプチドは、お互い同一である必要はない。いくつかの実施形態によれば、L P 1 又は L P 2 の少なくとも 1 つは、(G S)_n、(G G S)_n、(G S G G S)_n (配列番号 1) 及び (G G G S)_n (配列番号 2) (n は少なくとも 1 つの整数である) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。20 いくつかの実施形態によれば、L P 1 又は L P 2 の少なくとも 1 つは、G G S G (配列番号 3)、G G S G G (配列番号 4)、G S G S G (配列番号 5)、G S G G G (配列番号 6)、G G G S G (配列番号 7)、及び G S S S G (配列番号 8) から成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によれば、L P 1 は、アミノ酸配列 G S S G G S G G S G G S G (配列番号 9)、G S S G G S G G S G G (配列番号 10)、G S S G G S G G S G G S G (配列番号 11)、G S S G G S G G S G G S G G G S (配列番号 155)、G S S G G S G G S G G S G (配列番号 156)、又は G S S G G S G G S G S (配列番号 157) を含む。いくつかの実施形態によれば、L P 2 は、アミノ酸配列 G S S S 、G G S 、G G G S (配列番号 158)、G S S G T (配列番号 12) 又は G S S G (配列番号 13) を含む。

【0151】

いくつかの実施形態によれば、配列番号 504 の V H C D R 1 配列、配列番号 505 の V H C D R 2 配列、配列番号 506 の V H C D R 3 配列、配列番号 507 の V L C D R 1 配列、配列番号 508 の V L C D R 2 配列、及び配列番号 509 の V L C D R 3 配列を含む H 鎖アミノ酸配列を含む A B ; 配列番号 160、167-200 及び 497 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む M M : 及び配列番号 14-33 及び 159 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む C M を少なくとも含む抗 - E G F R 活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、配列番号 504 の V H C D R 1 配列、配列番号 505 の V H C D R 2 配列、配列番号 506 の V H C D R 3 配列、配列番号 507 の V L C D R 1 配列、配列番号 508 の V L C D R 2 配列、及び配列番号 509 の V L C D R 3 配列を含む H 鎖アミノ酸配列を含む A B ; 配列番号 160、167-200 及び 497 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む M M : 及び表 8 A - 8 M に提供される配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む C M を少なくとも含む抗 - E G F R 活性化可能抗体である。40 いくつかの実施形態によれば、抗 - E G F R 活性化可能抗体はまた、第 1 連結ペプチド (L P 1) 及び第 2 連結ペプチド (L P 2) も含み、そして未切断状態下での活性化可能抗体は、次のような、N - 末端から C - 末端への構造配置を有する : M M - L P 1 - C M - L P 2 - A B 又は A B - L P 2 - C M - L P 1 - M M 。いくつかの実施形態によれば、L P 1 及び L P 2 の個々は、約 1 - 20 個の長さのアミノ酸のペプチドである。いくつかの実施形態によれば、前記 2 種の連結ペプチドは、お互い同一である必要はない。いくつかの実施形態によれば、L P 1 又は L P 2 の少なくとも 1 つは、(G S)_n、(G G S)_n、(G S G G S)_n (配列番号 1) 及び (G G G S)_n (配列番号 2) (n は少なくとも 1 つの整数である) から成る群から選択されるアミノ酸50

配列を含む。いくつかの実施形態によれば、L P 1 又は L P 2 の少なくとも 1 つは、G G S G (配列番号 3)、G G S G G (配列番号 4)、G S G S G (配列番号 5)、G S G G G (配列番号 6)、G G G S G (配列番号 7)、及び G S S S G (配列番号 8)から成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によれば、L P 1 は、アミノ酸配列 G S S G G S G G S G G S G (配列番号 9)、G S S G G S G G S G G (配列番号 10)、G S S G G S G G S G G S (配列番号 11)、G S S G G S G G S G G S G G G S (配列番号 15 5)、G S S G G S G G S G (配列番号 15 6)、又は G S S G G S G G S G S (配列番号 15 7)を含む。いくつかの実施形態によれば、L P 2 は、アミノ酸配列 G S S 、G G S 、G G G S (配列番号 15 8)、G S S G T (配列番号 12) 又は G S S G (配列番号 13)を含む。

10

【0152】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、配列番号 5 6 , 5 7 又は 5 8 の H 鎖アミノ酸配列、及び配列番号 5 9 の L 鎖アミノ酸配列を含む A B ; 配列番号 1 6 0 、 1 6 7 - 2 0 0 及び 4 9 7 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む M M : 及び配列番号 1 4 - 3 3 及び 1 5 9 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む C M を少なくとも含む抗 - E G F R 活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、配列番号 5 6 , 5 7 又は 5 8 の H 鎖アミノ酸配列、及び配列番号 5 9 の L 鎖アミノ酸配列を含む A B ; 配列番号 1 6 0 、 1 6 7 - 2 0 0 及び 4 9 7 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む M M : 及び表 8 A - 8 M に提供される配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む C M を少なくとも含む抗 - E G F R 活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、抗 - E G F R 活性化可能抗体はまた、第 1 連結ペプチド (L P 1) 及び第 2 連結ペプチド (L P 2) も含み、そして未切断状態下での活性化可能抗体は、次のような、N - 末端から C - 末端への構造配置を有する：M M - L P 1 - C M - L P 2 - A B 又は A B - L P 2 - C M - L P 1 - M M 。いくつかの実施形態によれば、L P 1 及び L P 2 の個々は、約 1 - 2 0 個の長さのアミノ酸のペプチドである。いくつかの実施形態によれば、前記 2 種の連結ペプチドは、お互い同一である必要はない。いくつかの実施形態によれば、L P 1 又は L P 2 の少なくとも 1 つは、(G S)_n 、(G G S)_n 、(G S G G S)_n (配列番号 1) 及び (G G G S)_n (配列番号 2) (n は少なくとも 1 つの整数である) から成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によれば、L P 1 又は L P 2 の少なくとも 1 つは、G G S G (配列番号 3)、G G S G G (配列番号 4)、G S G S G (配列番号 5)、G S G G G (配列番号 6)、G G G S G (配列番号 7)、及び G S S S G (配列番号 8)から成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によれば、L P 1 は、アミノ酸配列 G S S G G S G G S G G S G (配列番号 9)、G S S G G S G G S G G (配列番号 10)、G S S G G S G G S G G G S (配列番号 11)、G S S G G S G G S G G G S (配列番号 15 5)、G S S G G S G G S G (配列番号 15 6)、又は G S S G G S G G S G S (配列番号 15 7)を含む。いくつかの実施形態によれば、L P 2 は、アミノ酸配列 G S S 、G G S 、G G G S (配列番号 15 8)、G S S G T (配列番号 12) 又は G S S G (配列番号 13)を含む。

20

【0153】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、配列番号 5 6 の H 鎖アミノ酸配列、及び配列番号 5 9 の L 鎖アミノ酸配列を含む A B ; 配列番号 1 6 0 のアミノ酸配列を含む M M : 及び配列番号 1 4 - 3 3 及び 1 5 9 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む C M を少なくとも含む抗 - E G F R 活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、配列番号 5 6 の H 鎖アミノ酸配列、及び配列番号 5 9 の L 鎖アミノ酸配列を含む A B ; 配列番号 1 6 0 のアミノ酸配列を含む M M : 及び表 8 A - 8 M に提供される配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む C M を少なくとも含む抗 - E G F R 活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、抗 - E G F R 活性化可能抗体はまた、第 1 連結ペプチド (L P 1) 及び第 2 連結ペプチド (L P 2) も含み、そして未切断状態下での活性化可能抗体は、次のような、N - 末端から C - 末端への構造配置を有する：M M - L P 1 - C M - L P 2 - A B 又は A B - L P 2 - C M - L P 1 - M M 。いく

30

40

50

つかの実施形態によれば、LP1及びLP2の個々は、約1-20個の長さのアミノ酸のペプチドである。いくつかの実施形態によれば、前記2種の連結ペプチドは、お互い同一である必要はない。いくつかの実施形態によれば、LP1又はLP2の少なくとも1つは、(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(配列番号1)及び(GGGS)_n(配列番号2)(nは少なくとも1つの整数である)から成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によれば、LP1又はLP2の少なくとも1つは、GGSG(配列番号3)、GGSGG(配列番号4)、GS GSG(配列番号5)、GS GGGG(配列番号6)、GGGSG(配列番号7)、及びGSSSG(配列番号8)から成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によれば、LP1は、アミノ酸配列GS S G G S G G S G G S G(配列番号9)、G S S G G S G G S G G(配列番号10)、GS S G G S G G S G G S(配列番号11)、G S S G G S G G S G G S G G G S(配列番号155)、G S S G G S G G S G(配列番号156)、又はG S S G G S G G S G S(配列番号157)を含む。いくつかの実施形態によれば、LP2は、アミノ酸配列GSS、G GS、GGGS(配列番号158)、GSSGT(配列番号12)又はGSSG(配列番号13)を含む。
10

【0154】

いくつかの実施形態によれば、配列番号504のVH CDR1配列、配列番号505のVH CDR2配列、配列番号506のVH CDR3配列、配列番号507のVL CDR1配列、配列番号508のVL CDR2配列、及び配列番号509のVL CDR3配列を含むH鎖アミノ酸配列を含むAB；配列番号160のアミノ酸配列を含むMM：及び配列番号14-33及び159から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むCMを少なくとも含む抗-EGFR活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、配列番号504のVH CDR1配列、配列番号505のVH CDR2配列、配列番号506のVH CDR3配列、配列番号507のVL CDR1配列、配列番号508のVL CDR2配列、及び配列番号509のVL CDR3配列を含むH鎖アミノ酸配列を含むAB；配列番号160のアミノ酸配列を含むMM：及び表8A-8Mに提供される配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むCMを少なくとも含む抗-EGFR活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、抗-EGFR活性化可能抗体はまた、第1連結ペプチド(LP1)及び第2連結ペプチド(LP2)も含み、そして未切断状態下での活性化可能抗体は、次のような、N-末端からC-末端への構造配置を有する：MM-LP1-CM-LP2-AB又はAB-LP2-CM-LP1-MM。いくつかの実施形態によれば、LP1及びLP2の個々は、約1-20個の長さのアミノ酸のペプチドである。いくつかの実施形態によれば、前記2種の連結ペプチドは、お互い同一である必要はない。いくつかの実施形態によれば、LP1又はLP2の少なくとも1つは、(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(配列番号1)及び(GGGS)_n(配列番号2)(nは少なくとも1つの整数である)から成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によれば、LP1又はLP2の少なくとも1つは、GGSG(配列番号3)、GGSGG(配列番号4)、GS GSG(配列番号5)、GS GGGG(配列番号6)、GGGSG(配列番号7)、及びGSSSG(配列番号8)から成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によれば、LP1は、アミノ酸配列GSSGGSG(配列番号9)、GSSGGSGGSGG(配列番号10)、GSSGGSGGSG(配列番号11)、GSSGGSGGSGGSGG(配列番号155)、GSSGGSGGSG(配列番号156)、又はGSSGGSGGSGGSG(配列番号157)を含む。いくつかの実施形態によれば、LP2は、アミノ酸配列GSS、GGS、GGGS(配列番号158)、GSSGT(配列番号12)又はGSSG(配列番号13)を含む。
30

【0155】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、配列番号61、63、65、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112又は114のH鎖アミ
40

ノ酸配列及び配列番号 60、62、64、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111又は113のL鎖アミノ酸配列を含むAB；配列番号201-263及び497から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むMM；及び配列番号14-33及び159から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むCMを少なくとも含む抗-Jagged活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、配列番号61、63、65、68、70、72、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112又は114のH鎖アミノ酸配列及び配列番号60、62、64、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111又は113のL鎖アミノ酸配列を含むAB；配列番号201-263及び497から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むMM；及び表8A-8Mに提供される配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むCMを少なくとも含む抗-Jagged活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、抗-Jagged活性化可能抗体はまた、第1連結ペプチド(LP1)及び第2連結ペプチド(LP2)も含み、そして未切断状態下での活性化可能抗体は、次のような、N-末端からC-末端への構造配置を有する：MM-LP1-CM-LP2-AB又はAB-LP2-CM-LP1-MM。いくつかの実施形態によれば、LP1及びLP2の個々は、約1-20個の長さのアミノ酸のペプチドである。いくつかの実施形態によれば、前記2種の連結ペプチドは、お互い同一である必要はない。いくつかの実施形態によれば、LP1又はLP2の少なくとも1つは、(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(配列番号1)及び(GGGS)_n(配列番号2)(nは少なくとも1つの整数である)から成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によれば、LP1又はLP2の少なくとも1つは、GGS G(配列番号3)、GGSGG(配列番号4)、GSGSG(配列番号5)、GS GGG(配列番号6)、GGGSG(配列番号7)、及びGSSSG(配列番号8)から成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によれば、LP1は、アミノ酸配列GSSGGSGGS GG SG(配列番号9)、GSSG GSGGGSGG(配列番号10)、GSSGGSGGGSGGS(配列番号11)、GSSG GSGGSGGGSG(配列番号155)、GSSGGSGGGSG(配列番号156)、又はGSSGGSGGS GS(配列番号157)を含む。いくつかの実施形態によれば。LP2は、アミノ酸配列GSS、GGS、GGGS(配列番号158)、GSSGT(配列番号12)又はGSSG(配列番号13)を含む。

【0156】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、配列番号112のH鎖アミノ酸配列、及び配列番号111のL鎖アミノ酸配列を含むAB；配列番号217のアミノ酸配列を含むMM；及び配列番号14-33及び159から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むCMを少なくとも含む抗-Jagged活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、配列番号112のH鎖アミノ酸配列、及び配列番号111のL鎖アミノ酸配列を含むAB；配列番号217のアミノ酸配列を含むMM；及び表8A-8Mに提供される配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むCMを少なくとも含む抗-Jagged活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、抗-Jagged活性化可能抗体はまた、第1連結ペプチド(LP1)及び第2連結ペプチド(LP2)も含み、そして未切断状態下での活性化可能抗体は、次のような、N-末端からC-末端への構造配置を有する：MM-LP1-CM-LP2-AB又はAB-LP2-CM-LP1-MM。いくつかの実施形態によれば、LP1及びLP2の個々は、約1-20個の長さのアミノ酸のペプチドである。いくつかの実施形態によれば、前記2種の連結ペプチドは、お互い同一である必要はない。いくつかの実施形態によれば、LP1又はLP2の少なくとも1つは、(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n(配列番号1)及び(GGGS)_n(配列番号2)(nは少なくとも1つの整数である)から成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によれば、LP1又はLP2の少なくとも1つは、GGSG(配列番号50)

配列番号 3)、 G G S G G (配列番号 4)、 G S G S G (配列番号 5)、 G S G G G (配列番号 6)、 G G G S G (配列番号 7)、 及び G S S S G (配列番号 8)から成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によれば、 L P 1 は、アミノ酸配列 G S S G G S G G S G G S G (配列番号 9)、 G S S G G S G G G S G G (配列番号 10)、 G S S G G S G G S G G S (配列番号 11)、 G S S G G S G G S G G S G G G S (配列番号 155)、 G S S G G S G G S G (配列番号 156)、又は G S S G G S G G S G S (配列番号 157)を含む。いくつかの実施形態によれば、 L P 2 は、アミノ酸配列 G S S 、 G G S 、 G G G S (配列番号 158)、 G S S G T (配列番号 12) 又は G S S G (配列番号 13)を含む。

【 0157 】

10

いくつかの実施形態によれば、配列番号 498 の V H C D R 1 配列、配列番号 499 の V H C D R 2 配列、配列番号 500 の V H C D R 3 配列、配列番号 501 の V L C D R 1 配列、配列番号 502 の V L C D R 2 配列、及び配列番号 503 の V L C D R 3 配列を含む H 鎖アミノ酸配列を含む A B ; 配列番号 217 のアミノ酸配列を含む M M : 及び配列番号 14 - 33 及び 159 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む C M を少なくとも含む抗 - Jagged 活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、配列番号 498 の V H C D R 1 配列、配列番号 499 の V H C D R 2 配列、配列番号 500 の V H C D R 3 配列、配列番号 501 の V L C D R 1 配列、配列番号 502 の V L C D R 2 配列、及び配列番号 503 の V L C D R 3 配列を含む H 鎖アミノ酸配列を含む A B ; 配列番号 217 のアミノ酸配列を含む M M : 及び表 8A - 8M に提供される配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む C M を少なくとも含む抗 - Jagged 活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、抗 - Jagged 活性化可能抗体はまた、第 1 連結ペプチド (L P 1) 及び第 2 連結ペプチド (L P 2) も含み、そして未切断状態下での活性化可能抗体は、次のような、 N - 末端から C - 末端への構造配置を有する : M M - L P 1 - C M - L P 2 - A B 又は A B - L P 2 - C M - L P 1 - M M 。いくつかの実施形態によれば、 L P 1 及び L P 2 の個々は、約 1 - 20 個の長さのアミノ酸のペプチドである。いくつかの実施形態によれば、前記 2 種の連結ペプチドは、お互い同一である必要はない。いくつかの実施形態によれば、 L P 1 又は L P 2 の少なくとも 1 つは、 (G S)_n 、 (G G S)_n 、 (G S G G S)_n (配列番号 1) 及び (G G G S)_n (配列番号 2) (n は少なくとも 1 つの整数である) から成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によれば、 L P 1 又は L P 2 の少なくとも 1 つは、 G G S G (配列番号 3)、 G G S G G (配列番号 4)、 G S G S G (配列番号 5)、 G S G G G (配列番号 6)、 G G G S G (配列番号 7)、 及び G S S S G (配列番号 8)から成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によれば、 L P 1 は、アミノ酸配列 G S S G G S G G S G G S G (配列番号 9)、 G S S G G S G G S G G (配列番号 10)、 G S S G G S G G S G G S (配列番号 11)、 G S S G G S G G S G G G S (配列番号 155)、 G S S G G S G G S G (配列番号 156)、又は G S S G G S G G S G S (配列番号 157)を含む。いくつかの実施形態によれば、 L P 2 は、アミノ酸配列 G S S 、 G G S 、 G G G S (配列番号 158)、 G S S G T (配列番号 12) 又は G S S G (配列番号 13)を含む。

【 0158 】

40

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体はまた、 A B に接合される剤も含む。いくつかの実施形態によれば、剤は治療剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は抗腫瘍剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は毒素又はそのフラグメントである。いくつかの実施形態によれば、剤は、リンカーを介して A B に接合される。いくつかの実施形態によれば、リンカーは切断可能リンカーである。いくつかの実施形態によれば、剤は微小管阻害剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は核酸損傷剤、例えば D N A アルキル化剤又は D N A インターカレーター、又は他の D N A 損傷剤である。いくつかの実施形態によれば、リンカーは切断可能リンカーである。いくつかの実施形態によれば、剤は、少なくとも 1 つの M M P - 切断可能基質配列を含むリンカーを介して A B に接合される。いくつかの実施形態によれば、剤は、表 3 に列挙される群から選択される剤である。いく

50

つかの実施形態によれば、剤はドラスタチンである。いくつかの実施形態によれば、剤はアウリスタチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤は、アウリスタチンE又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤は、モノメチルアウリスタチンE(MMAE)である。いくつかの実施形態によれば、剤は、モノメチルアウリスタチンD(MMAD)である。いくつかの実施形態によれば、剤は、メイタンシノイド又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤はDM1又はDM4である。いくつかの実施形態によれば、剤はデュオカルマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば剤はピロロベンゾジアゼピンである。

【0159】

10

いくつかの実施形態によれば、剤は抗炎症剤である。

【0160】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体はまた、検出可能部分も含む。いくつかの実施形態によれば、検出可能部分は、診断剤である。

【0161】

20

いくつかの実施形態によれば、接合された抗体は、検出できる標識を含む。いくつかの実施形態によれば、検出できる標識は、イメージング剤、造影剤、酵素、蛍光標識、発色団、色素、1又は2以上の金属イオン、又はリガンドベースの標識を含む。いくつかの実施形態によれば、イメージング剤は、放射性同位体を含む。いくつかの実施形態によれば、放射性同位体は、インジウム又はテクネチウムである。いくつかの実施形態によれば、造影剤は、ヨウ素、ガドリニウム又は酸化鉄を含む。いくつかの実施形態によれば、酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ又は-ガラクトシダーゼを含む。いくつかの実施形態によれば、蛍光標識は、黄色蛍光タンパク質(YFP)、シアノ蛍光タンパク質(CFP)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、修飾された赤色蛍光タンパク質(mRFP)、赤色蛍光タンパク質tダイマー2(RFP tダイマー2)、HCR ED、又はユーロピウム誘導体を含む。いくつかの実施形態によれば、発光標識は、N-メチルアクリジウム誘導体を含む。いくつかの実施形態によれば、標識は、Alexa Fluor(登録商標)標識、例えばAlexa Fluor(登録商標)680又はAlexa Fluor(登録商標)750を含む。いくつかの実施形態によれば、リガンドベースの標識は、ビオチン、アビジン、ストレプタビジン又は1又は2以上のハブテンを含む。

30

【0162】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体はまた、シグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、シグナルペプチドは、スペーサーを介して活性化可能抗体に接合される。いくつかの実施形態によれば、スペーサーは、すぐなるペプチドの不在下で活性化可能抗体に接合される。いくつかの実施形態によれば、スペーサーは、活性化可能抗体のMMに直接的に連結される。いくつかの実施形態によれば、スペーサーは、スペーサー-MM-CM-AのN-末端からC-末端への構造配置において活性化可能抗体のMMに直接的に連結される。活性化可能抗体のMMのN-末端に対して直接的に連結されるスペーサーの例は、Q G Q S G Q(配列番号53)である。いくつかの実施形態によれば、スペーサーは、アミノ酸配列Q G Q S G Q(配列番号53)を少なくとも含む。

40

【0163】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体中のABは天然において、1又は2以上のジスルフィド結合を含む。いくつかの実施形態によれば、ABは、1又は2以上のジスルフィド結合を含むよう操作され得る。

【0164】

50

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、その対応する抗体の半減期よりも長く；例えば、活性化可能抗体のpKは、その対応する抗体のpKよりも長い。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、その対応する抗体の半減期に類似する。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも15日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗

体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 12 日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 11 日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 10 日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 9 日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 8 日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 7 日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 6 日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 5 日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 4 日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 3 日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 2 日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 24 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 20 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 18 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 16 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 14 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 12 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 10 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 8 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 6 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 4 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 3 時間である。

【 0165 】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体は、単一特異的である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体は、多重特異的、例えば非制限的例えば、二重特異的又は三重特異的であるいくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体は、プロ - 二重特異的 T 細胞エンゲージャー（プロ - B I T E ）分子の一部として処方される。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体は、プロ - キメラ抗原受容体（プロ - C A R ）修飾 T 細胞又は他の操作された受容体の一部として処方される。

【 0166 】

本開示はまた、所定の標的を特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント（ A B ）を含む活性化可能抗体を含む組成物及び方法も提供し、ここで前記 A B は、 A B のその標的を結合する能力を低めるマスキング部分（ M M ）にカッティングされる。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体はさらに、少なくとも 1 つの M M P のための基質である切断可能部分（ C M ）も含む。本明細書に提供される組成物及び方法は、活性化可能抗体の活性（例えば、マスキング、活性化又は結合活性）を損なうことなく、 A B における 1 又は 2 以上のシステイン残基への 1 又は 2 以上の剤の結合を可能にする。いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される組成物及び方法は、 M M 内の 1 又は 2 以上のジスルフィド結合も還元しないで、又は他方では妨害しないで、 A B における 1 又は 2 以上のシステイン残基への 1 又は 2 以上の剤の結合を可能にする。本明細書に提供される組成物及び方法は、 1 又は 2 以上の剤、例えば種々の治療、診断及び／又は予防剤の何れかに接合され

10

20

30

40

50

る活性化可能抗体を生成し、例えば、いくつかの実施形態によれば、前記剤の何れも活性化可能抗体のMMの何れにも接合されていない。本明細書に提供される組成物及び方法は、MMが切断されていない状態下で活性化可能抗体のABを効果的且つ効率的にマスキングする能力を保持している、接合された活性化可能抗体を生成する。本明細書に提供される組成物及び方法は、活性可能抗体が、CMを切断できる MMP の存在下で、まだ活性化されている、すなわち切断されている、接合された活性化可能抗体を生成する。

【0167】

活性化可能抗体は、剤のための少なくとも1つの接合点を有するが、本明細書に提供される方法及び組成物においては、すべての可能な接合点が剤への接合のために利用できる。いくつかの実施形態によれば、1又は2以上の接合点は、ジスルフィド接合に含まれる硫黄原子である。いくつかの実施形態によれば、1又は2以上の接合点は、鎖間ジスルフィド結合に含まれる硫黄原子である。いくつかの実施形態によれば、1又は2以上の接合点は、鎖間スルフィド結合に含まれる硫黄原子であるが、しかし鎖内ジスルフィド結合に含まれる硫黄原子ではない。いくつかの実施形態によれば、1又は2以上の接合点は、システイン、又は硫黄原子を含む他のアミノ酸残基の硫黄原子である。そのような残基は、抗体構造で天然において存在することができるか、又は部位特異的突然変異誘発、化学的変換、又は非天然アミノ酸の誤取り込みにより抗体中に組込まれ得る。

【0168】

1又は2以上のABに、1又は2以上の鎖間ジスルフィド結合及びMMに1又は2以上の鎖内ジスルフィド結合を有する活性化可能抗体の接合体の調製方法がまた提供され、そして遊離チオールと反応性の薬剤が提供される。前記方法は一般的に、活性化可能抗体における鎖間ジスルフィド結合を、還元剤、例えばTCEPにより部分的に還元し；そしてその部分的に還元された活性化可能抗体に、遊離チオールと反応性の薬物を接合することを包含する。本明細書において使用される場合、用語「部分的還元」とは、多重特異的活性化可能抗体が、還元剤と接触され、そしてすべて未満ジスルフィド結合、例えばすべて未満の可能な接合部位が還元される状況を意味する。いくつかの実施形態によれば、99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%又は5%未満のすべての可能な接合部位が還元される。

【0169】

いくつかの実施形態によれば、剤、例えば薬剤を還元し、そして前記剤の置換下で選択をもたらす活性化可能抗体に接合する方法が提供される。前記方法は、還元剤により活性化可能抗体を還元し、結果的に、活性化可能抗体のマスキング部分又は他の非-AB部分の何れかにおける任意の接合部位が還元されず、そして活性化可能抗体の1又は2以上のABにおける鎖間チオールに剤を接合することを包含する。接合部位は、所望する部位での接合の発生を可能にする剤の所望する置換を可能にするよう選択される。例えば、還元剤は、TCEPである。還元反応条件、例えば還元剤：活性化可能抗体の比、インキュベーションの長さ、インキュベーションの間の温度、還元反応溶液のpH、等が、MMが切断されていない状態下で活性化可能抗体のABを抗体を効果的且つ効率的にマスキングする能力を保持している、接合された活性化可能抗体を生成する条件を同定することにより決定される。還元剤：活性化可能抗体の比は、活性化可能抗体に依存して変化するであろう。いくつかの実施形態によれば、還元剤：活性化可能抗体の比は、約20:1-1:1、約10:1-1:1、約9:1-1:1、約8:1-1:1、約7:1-1:1、約6:1-1:1、約5:1-1:1、約4:1-1:1、約3:1-1:1、約2:1-1:1、約20:1-1:1.5、約10:1-1:1.5、約9:1-1:1.5、約8:1-1:1.5、約7:1-1:1.5、約6:1-1:1.5、約5:1-1:1.5、約4:1-1:1.5、約3:1-1:1.5、約2:1-1:1.5、約1.5:1-1:1.5又は約1:1-1:1.5の範囲下にあるであろう。いくつかの実施形態によれば、前記比は、約5:1-1.5:1の範囲にある。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態によれば、前記化は、約 4 : 1 - 1 . 4 : 1 の範囲にある。いくつかの実施形態によれば、前記比は、約 8 : 1 - 約 1 : 1 の範囲にある。いくつかの実施形態によれば、前記比は、約 2 . 5 : 1 - 1 : 1 の範囲にある。

【 0 1 7 0 】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の 1 又は 2 以上の A B 中の鎖間ジスルフィド結合を還元し、そして得られる鎖間チオールに、剤、例えばチオール含有剤、例えば薬剤を接合し、前記 A B 上に剤を選択的に位置決定する方法が提供される。前記方法は、活性化可能抗体中のすべての可能な鎖間チオールを形成しないで、少なくとも 2 つの鎖間チオールを形成するために、1 又は 2 以上の A B を還元剤により部分的に還元し；そして前記部分的に還元された A B の鎖間チオールに、前記剤を接合することを一般的に包含する。例えば、活性化可能抗体の 1 又は 2 以上の A B は、還元剤：活性化可能抗体の所望する比で、約 3 7 で約 1 時間、部分的に還元される。いくつかの実施形態によれば、還元剤：活性化可能抗体の比は、約 2 0 : 1 - 1 : 1 、約 1 0 : 1 - 1 : 1 、約 9 : 1 - 1 : 1 、約 8 : 1 - 1 : 1 、約 7 : 1 - 1 : 1 、約 6 : 1 - 1 : 1 、約 5 : 1 - 1 : 1 、約 4 : 1 - 1 : 1 、約 3 : 1 - 1 : 1 、約 2 : 1 - 1 : 1 、約 2 0 : 1 - 1 : 1 . 5 、約 1 0 : 1 - 1 : 1 . 5 、約 9 : 1 - 1 : 1 . 5 、約 8 : 1 - 1 : 1 . 5 、約 7 : 1 - 1 : 1 . 5 、約 6 : 1 - 1 : 1 . 5 、約 5 : 1 - 1 : 1 . 5 、約 4 : 1 - 1 : 1 . 5 、約 3 : 1 - 1 : 1 . 5 、約 2 : 1 - 1 : 1 . 5 、約 1 . 5 : 1 - 1 : 1 . 5 又は 約 1 : 1 - 1 : 1 . 5 の範囲下にあるであろう。いくつかの実施形態によれば、前記比は、約 5 : 1 - 1 . 5 : 1 の範囲にある。いくつかの実施形態によれば、前記化は、約 4 : 1 - 1 . 4 : 1 の範囲にある。いくつかの実施形態によれば、前記比は、約 8 : 1 - 約 1 : 1 の範囲にある。いくつかの実施形態によれば、前記比は、約 2 . 5 : 1 - 1 : 1 の範囲にある。

【 0 1 7 1 】

チオール含有試薬は、例えばシステイン又は N - アセチルシステインであり得る。還元剤は、例えば T C E P であり得る。いくつかの実施形態によれば、還元された活性化可能抗体は、接合の前、例えばカラムクロマトグラフィー、透析又はダイアフィルトレーションを用いて精製され得る。他方では、還元された抗体は、部分的還元の後、及び接合の前、精製されない。

【 0 1 7 2 】

本開示はまた、活性化可能抗体中の少なくとも 1 つの鎖間ジスルフィド結合が、活性化可能抗体中の何れの鎖内ジスルフィド結合も妨害しないで、還元剤により還元されている、部分的に還元された活性化可能抗体も提供し、ここで前記活性化可能抗体は、標的に対して特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント (A B) 、末切断状態下での活性化可能抗体の A B の標的への結合を阻害するマスキング部分 (M M) 、及び A B にカップリングされる切断可能部分 (C M) (少なくとも 1 つの M M P のための基質として機能するポリペプチドである) を含む。いくつかの実施形態によれば、 M M は、 C M を介して A B にカップリングされる。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の 1 又は 2 以上の鎖内ジスルフィド結合は、還元剤により妨害されない。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体内の M M の 1 又は 2 以上の鎖内ジスルフィド結合は、還元剤により妨害されない。いくつかの実施形態によれば、末切断状態下での活性化可能抗体は、次のような、 N - 末端から C - 末端への構造配置を有する： M M - C M - A B 又は A B - C M - M M 。いくつかの実施形態によれば、還元剤は T C E P である。

【 0 1 7 3 】

本開示はまた、活性化可能抗体中の少なくとも 1 つの鎖内ジスルフィド結合が、活性化可能抗体の活性及び / 又は効力を妨害しないで、又は他方では、損なわないで、還元剤により還元されている、部分的に還元されている活性化可能抗体（例えば、本開示の多重特異的活性化可能抗体を包含するが、但しそれらだけには限定されない）も提供し、ここで前記活性化可能抗体は、標的に対して特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント

10

20

30

40

50

(A B)、未切断状態下での活性化可能抗体の A B の標的への結合を阻害するマスキング部分 (M M)、及び A B にカップリングされる切断可能部分 (C M) (プロテアーゼのための基質として機能するポリペプチドである) を含む。活性化可能抗体の活性及び / 又は効力は、非制限的例によれば、マスキング活性、活性化可能抗体の活性化、及び / 又は活性化された活性化可能抗体の結合活性である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の 1 又は 2 以上の鎖内ジスルフィド結合は、還元剤により妨害されない。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体内の M M の 1 又は 2 以上の鎖内ジスルフド結合は、還元剤により妨害されない。いくつかの実施形態によれば、未切断状態下での活性化可能抗体は、次のような、 N - 末端から C - 末端への構造配置を有する : M M - C M - A B 又は A B - C M - M M 。いくつかの実施形態によれば、還元剤は T C E P である。

10

【 0 1 7 4 】

本開示はまた、モノメチルアウリスタチン D (M M A D) ペイロードに連結される活性化可能抗体を含む接合された活性化可能抗体も提供し、ここで前記活性化可能抗体は、標的に対して特異的に接合する抗体又はその抗原結合フラグメント (A B) 、標的への未切断状態での活性化可能抗体の A B の結合を阻害するマスキング部分 (M M) 、及び A B にカップリングされる切断可能部分 (C M) (前記 C M は少なくとも 1 つの M M P プロテアーゼのための基質として機能するポリペプチドである) を含む。

【 0 1 7 5 】

いくつかの実施形態によれば、 M M A D - 接合された活性化可能抗体は、次のような、 A B に剤を結合するためのいくつかの方法の何れかを用いて接合され得る : (a) A B の炭水化物部分への接合、又は (b) A B のスルフヒドリル基への結合、又は (c) A B のアミノ基への結合、又は (d) A B のカルボキシレート基への結合。

20

【 0 1 7 6 】

いくつかの実施形態によれば、 M M A D ペイロードは、リンカーを介して A B に接合される。いくつかの実施形態によれば、 M M A D ペイロードは、リンカーを介してシステインに接合される。いくつかの実施形態によれば、 M M A D ペイロードは、リンカーを介して A B におけるリシンに接合される。いくつかの実施形態によれば、 M M A D は、リンカー、例えば本明細書に開示されるそれらの残基を介して A B の別の残基に接合される。いくつかの実施形態によれば、リンカーは、チオール含有リンカーである。いくつかの実施形態によれば、リンカーは切断可能リンカーである。いくつかの実施形態によれば、リンカーは、非切斷可能リンカーである。いくつかの実施形態によれば、リンカーは、表 5 及び 6 に示されるリンカーから成る群から選択される。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び M M A D ペイロードは、マレイミドカプロイル - バリン - シトルリンリンカーを介して連結される。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び M M A D ペイロードは、マレイミド P E G - バリン - シトルリンリンカーを介して連結される。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び M M A D ペイロードは、マレイミドカプロイド - バリン - シトルリン - パラ - アミノベンジルオキシカルボニルリンカーを介して連結される。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び M M A D ペイロードは、マレイミド P E G - バリン - シトルリン - パラ - アミノベンジルオキシカルボニルリンカーを介して連結される。いくつかの実施形態によれば、 M M A D ペイロードは、本明細書に開示される部分的還元及び接合技法を用いて、 A B に接合される。

30

【 0 1 7 7 】

いくつかの実施形態によれば、標的は、表 1 に列挙される標的群から選択される。いくつかの実施形態によれば、標的は E G F R である。いくつかの実施形態によれば、標的は、 Jagged タンパク質、例えば Jagged 1 及び / 又は Jagged 2 である。いくつかの実施形態によれば、標的はインターロイキン 6 受容体 (I L - 6 R) である。いくつかの実施形態によれば、 A B は、表 2 に列挙される抗体群から選択される抗体であるか又はそれに由来する。いくつかの実施形態によれば、その抗原結合フラグメントは、 F a b フラグメント、 F (a b)₂ フラグメント、 s c F v , s c a b 、 d A b 、単一ドメイン H 鎖抗体、及び単一ドメイン L 鎖抗体から成る群から選択される。いくつかの実施形態によれば、 A B

40

50

は、標的への結合のために、約 1 0 0 nM 又はそれ以下の平衡解離定数を有する。いくつかの実施形態によれば、MM は、標的への AB の結合のための平衡解離定数よりも高い、ABへの結合への結合のための平衡解離定数を有する。いくつかの実施形態によれば、MM は、切断された状態で、標的への結合のために、活性化可能抗体の AB を妨害しないか、又はそれと競争もしない。いくつかの実施形態によれば、MM は、40 個以下の長さのアミノ酸のポリペプチドである。いくつかの実施形態によれば、MM ポリペプチド配列は、標的のそれとは異なり、そして MM ポリペプチド配列は、AB の任意の天然の結合パートナーに対してせいぜい 50 %、同一である。いくつかの実施形態によれば、MM は、標的に対して 25 % 以上のアミノ酸配列同一を有さない。いくつかの実施形態によれば、MM は、標的に対して 10 % 以上のアミノ酸配列同一性を有さない。いくつかの実施形態によれば、CM は、15 個までの長さのアミノ酸のポリペプチドである。いくつかの実施形態によれば、MMP プロテアーゼは、組織において標的と共に局在化され、そして MMP プロテアーゼは、活性化可能抗体が MMP プロテアーゼに暴露される場合、活性化可能抗体における CM を切断する。いくつかの実施形態によれば、MMP - プロテアーゼは、MMP 9 プロテアーゼである。いくつかの実施形態によれば、MMP プロテアーゼは、MMP 14 プロテアーゼである。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、MM と CM との間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、CM と AB との間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体はまた、第 1 連結ペプチド (LP1) 及び第 2 連結ペプチド (LP2) も含み、そして未切断状態下での活性化可能抗体は、次のような、N - 末端から C - 末端への構造配置を有する：MMP - LP1 - CM - LP2 - AB 又は AB - LP2 - CM - LP1 - MM。いくつかの実施形態によれば、前記 2 種の連結ペプチドは、お互い同一である必要はない。いくつかの実施形態によれば、LP1 及び LP2 の個々は、約 1 - 20 個の長さのアミノ酸のペプチドである。いくつかの実施形態によれば、LP1 又は LP2 の少なくとも 1 つは、(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (配列番号 1) 及び (GGGS)_n (配列番号 2) (_n は少なくとも 1 つの整数である) から成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によれば、LP1 又は LP2 の少なくとも 1 つは、GGSG (配列番号 3)、GGSGG (配列番号 4)、GS GSG (配列番号 5)、GS GGG (配列番号 6)、GGGSG (配列番号 7)、及び GSSSG (配列番号 8) から成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によれば、活性化可能抗体は、第 2 CM を含み；いくつかの実施形態によれば、第 2 CM は、表 7 に示されるそれらの酵素から成る群から選択される酵素のための基質である。

【0178】

本開示はまた、本明細書に提供される 1 又は 2 以上の MMP - 切断可能基質配列を含む、ポリペプチド及び他の大分子も提供する。非制限的例によれば、本明細書に提供される MMP - 切断可能基質配列は、プロドラッグ組成物及びその使用方法において有用である。本明細書に提供されるそれらの MMP - 切断可能基質配列もまた、プローブ及び他の検出剤、及びその使用方法において有用である。例えば、本明細書に提供される MMP - 切断可能基質配列は、検出剤、例えばイメージング剤及び / 又は他の診断剤を生成するために、フラー及びクエンチャーと組合して使用され得る。当業者は、本明細書に提供される MMP - 切断可能基質配列が、1 又は 2 以上の MMP，例えば MMP 9 及び / 又は MMP 14 により切断できる基質を用いるであろう当該技術分野における任意の組成物及び / 又は方法において有用であることを理解するであろう。

【0179】

本開示はまた、本明細書に記載される抗体及び / 又は活性化可能抗体をコードする単離核酸分子、及びそれらの単離された核酸配列を含むベクターも提供する。本開示は、抗体及び / 又は活性化可能抗体の発現を導く条件下で、前記ベクターを含む細胞を培養することによる、抗体及び / 又は活性化可能抗体の製造方法を提供する。

【0180】

本開示は、(a) 抗体の発現を導く条件下で、抗体をコードする核酸コンストラクトを

含む細胞を培養し、ここで(i)抗体は切断可能部分(ＣＨ)を含み、そして(ii)CMはマトリックス・メタロプロテアーゼのための基質として機能するポリペプチドであり；(b)抗体を回収し；そして(c)1又は2以上の追加の剤に、前記回収される抗体を接合することによる、所定の標的を結合する本開示の接合をされた抗体の製造方法を提供する。

【0181】

本開示はまた、(a)活性化可能抗体の発現を導く条件下で、活性化可能抗体をコードする核酸コンストラクトを含む細胞を培養し、ここで前記活性化可能抗体は、マスキング部分(ＭＭ)、切断可能部分(ＣＭ)、及び標的を特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント(ＡＢ)を含み、ここで(i)前記CMはMMPのための基質として機能するポリペプチドであり；そして(ii)CMは、未切断状態下で、MMが標的へのABの特異的結合を妨害し、そして切断された状態下で、MMが標的へのABの特異的結合を妨害しないか、又はそれと競争しないよう、活性化可能抗体に配置され；そして(b)活性化可能抗体を回収することによる、所定の標的を、活性化された状態下で結合する本開示の活性化可能抗体の製造方法も提供する。

10

【0182】

本開示は、治療的有効量の本明細書に記載される接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体を、その必要な対象に投与することにより、対照における標的関連疾患を、予防し、その進行を遅延し、それを治療し、その症状を軽減するか、又は他方では、改善する方法を提供する。

20

【0183】

本開示は、治療的有効量の本明細書に記載される接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体を、その必要な対象に投与することにより、対照における炎症及び／又は炎症性疾患を、予防し、その進行を遅延し、それを治療し、その症状を軽減するか、又は他方では、改善する方法を提供する。本開示は、治療的有効量の本明細書に記載される接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体を、その必要な対象に投与することにより、対照における癌を、予防し、その進行を遅延し、それを治療し、その症状を軽減するか、又は他方では、改善する方法を提供する。本開示は、治療的有効量の本明細書に記載される接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体を、その必要な対象に投与することにより、対照における自己免疫疾患を、予防し、その進行を遅延し、それを治療し、その症状を軽減するか、又は他方では、改善する方法を提供する。

30

【0184】

それらの方法及び使用の実施形態の何れかに使用される、接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体は、疾患の任意の段階で投与され得る。例えば、そのような接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体は、早期～転移性の任意の段階の癌を有する患者に投与され得る。用語、対象及び患者は本明細書においては、交換可能的に使用される。

【0185】

いくつかの実施形態によれば、対象は、哺乳類、例えばヒト、非ヒト靈長類、愛玩動物(例えば、ネコ、イヌ、ウマ)、農業用動物、作業用動物又は動物園の動物である。いくつかの実施形態によれば、対象はヒトである。いくつかの実施形態によれば、対象は愛玩動物である。いくつかの実施形態によれば、対象は、獣医師のケア動物である。

40

【0186】

接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、及びそれらの治療用製剤は、異常標的発現及び／又は活性に関連する疾患又は障害を有するか、又はそれの影響を受けやすい対象に投与される。異常標的発現及び／又は活性に関連する疾患又は障害を有するか、又はそれの影響を受けやすい対象は、当業界において知られている種々の方法の何れかを用いて、同定される。例えば、癌又は他の腫瘍性状態を有する対象は、種々の臨床学的及び／又は実験室試験の何れか、例えば物理的試験、及び健康状態を評

50

価するための血液、尿及び／又はツール分析を用いて、同定される。例えば、炎症及び／又は炎症性障害を有する対象は、種々の臨床学的及び／又は実験室試験の何れか、例えば物理的試験及び／又は体液分析、例えば、健康状態を評価するための血液、尿及び／又はツール分析を用いて、同定される。

【0187】

異常標的発現及び／又は活性に関連する疾患又は障害を有する患者への接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体の投与は、種々の実験室又は臨床目的の何れかが達成されると、成功したとして見なされる。例えば、接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体は、疾患又は障害に関連する1又は2以上の症状が軽減されるか、低められるか、阻害されるか、又はさらに悪化状態に進行しない場合、成功したとして見なされる。接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体は、患者又は障害が寛解に入るか、又はさらに悪化状態に進行しない場合、成功したとして見なされる。

10

【0188】

いくつかの実施形態によれば、接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体は、1又は2以上の追加の剤、例えば、非制限的例によれば、抗炎症剤、免疫抑制剤、化学療法剤、例えばアルキル化剤、代謝拮抗剤、抗微小管剤、トポイソメラーゼ阻害剤、細胞毒性抗生物質及び／又は何れか他の核酸損傷剤と組合して、治療の間及び／又は治療の後、投与される。いくつかの実施形態によれば、追加の剤は、タキサン、例えばパクリタキセル（例えば、Abraxane（登録商標））である。いくつかの実施形態によれば、追加の剤は、代謝拮抗剤、例えばゲムシタビンである。いくつかの実施形態によれば、追加の剤は、アルキル化剤、例えば白金を用いた化学療法剤、例えばカルボプラチニン又はシスプラチニンである。いくつかの実施形態によれば、追加の剤は、標的剤、例えばキナーゼ阻害剤、例えばソラフェニブ又はエルロチニブである。いくつかの実施形態によれば、追加の剤は、標的剤、例えば別の抗体、例えばモノクローナル抗体（例えば、ベバシズマブ）、二重特異的抗体、又は多重特異的抗体である。いくつかの実施形態によれば、追加の剤は、プロテアソーム阻害剤、例えばボルテゾミブ又はカーフィルゾミブである。いくつかの実施形態によれば、追加の剤は、免疫調節剤、例えばレノリドマイド又はIL-2である。いくつかの実施形態によれば、追加の剤は、放射線である。いくつかの実施形態によれば、追加の剤は、当業者によるケアの標準として見なされる剤である。いくつかの実施形態によれば、追加の剤は、当業者に良く知られている化学療法剤である。

20

【0189】

いくつかの実施形態によれば、追加の剤は、抗体、別の接合された抗体、別の活性化可能抗体及び／又は別の接合された活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、及び追加の剤は、同時に投与される。例えば、接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、及び追加の剤は、単一組成物に配合され、又は複数の別々の組成物として投与され得る。いくつかの実施形態によれば、接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体、及び追加の剤は、連続的に投与されるか、又は抗体及び／又は接合された抗体及び追加の剤が、治療計画の間、異なった時点で、投与される。例えば、抗体及び／又は接合された抗体は、追加の剤の投与の前、投与され、抗体及び／又は接合された抗体は、追加の剤の投与に続いて投与されるか、又は抗体及び／又は接合された抗体及び追加の剤は、交互に投与される。本明細書に記載されるように、抗体及び／又は接合された抗体及び追加の剤は、単回用量又は複数回用量で投与される。

30

【0190】

いくつかの実施形態によれば、CMは、マスキング部分（MM）にカップリングされる所定の標的を特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含む活性化可能抗体に連結されるか、又は他方では、結合され、結果的に、ABへのMMのカップリングが、標的を結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの能力を低める。いくつかの実施形態によれば、MMは、CMを介してカップリングされる。典型的な標的は、表1に示される

40

50

標的を包含するが、但しそれらだけには限定されない。典型的な A B は、表 2 に示される標的を包含するが、但しそれらだけには限定されない。本明細書に提供される活性化可能抗体は、循環において安定し、治療及び / 又は診断の意図される側で活性化されるが、しかし正常、例えば健康組織又は治療及び診断のために標的化されない他の組織においては、活性化されず、そして活性化される場合、その対応する未修飾抗体と少なくとも同等である標的への結合を示す。

【 0 1 9 1 】

本開示はまた、種々の診断的及び / 又は予防的適用のためへの接合された抗体、活性化可能抗体及び / 又は接合された活性化可能抗体の使用方法及びキットも提供する。

【 0 1 9 2 】

いくつかの実施形態によれば、本開示は、(i) 対象又はサンプルと、活性化可能抗体とを接触し、ここで活性化可能抗体は、マスキング部分 (M M) 、切断剤により切断される切断部分 (C M) 、及び目的の標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント (A B) を含み、ここで活性化可能抗体は、未切断、非活性化状態で、次のような、 N - 末端から C - 末端への構造配置を有し ; M M - C M - A B 又は A B - C M - M M ; ここで、(a) M M は、標的への A B の結合を阻害するペプチドであり、そして M M は、 A B の天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そして A B の天然の結合パートナーの変性形ではなく ; そして (b) 未切断、非活性化状態で、 M M は標的への A B の特異的結合を妨害し、そして切断された、活性化された状態で、 M M は、標的への A B の特異的結合を妨害せず、又はそれと競争せず ; そして (i i) 対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤及び目的の標的の存在又は非存在を検出するための方法及びキットを提供し、ここで対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出レベルが、切断剤及び標的が対象又はサンプルに存在することを示唆し、そして対象又はサンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の検出レベルの不在は、切断剤、標的又は切断剤及び標的の両者が対象又はサンプルに存在しないことを示唆する。

【 0 1 9 3 】

いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、治療剤が接合される活性化できる活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、剤に接合されない。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、検出できる標識を含む。いくつかの実施形態によれば、検出できる標識は、 A B 上に位置決定される。いくつかの実施形態によれば、対象又はサンプル中の活性化できる活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された活性化可能抗体に対して特異的に結合する、検出可能標識を含む二次試薬を用いて達成される。いくつかの実施形態によれば、前記二次試薬は、検出できる標識を含む抗体である。

【 0 1 9 4 】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、検出できる標識を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、検出できる標識は、イメージング剤、造影剤、酵素、蛍光標識、発色団、色素、1 又は 2 以上の金属イオン、又はリガンドベースの標識を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、イメージング剤は、放射性同位体を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、放射性同位体は、インジウム又はテクネチウムである。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、造影剤は、ヨウ素、ガドリニウム又は酸化鉄を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ又は - ガラクトシダーゼを含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、蛍光標識は、黄色蛍光タンパク質 (Y F P) 、シアノ蛍光タンパク質 (C F P) 、緑色蛍光タンパク質 (G F P) 、修飾された赤色蛍光タンパク質 (M R F P) 、赤色蛍光タンパク質 t ダイマー 2 (R F P t ダイマー 2) 、 H C R E D 、又はユーロピウム誘導体を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、発光標識は、 N - メチルアクリジウム誘導体を含む。そ

10

20

30

40

50

れらの方法のいくつかの実施形態によれば、標識は、Alexa Fluor(登録商標)標識、例えばAlexa Fluor(登録商標)680又はAlexa Fluor(登録商標)750を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、リガンドベースの標識は、ビオチン、アビジン、ストレプタビジン又は1又は2以上のハプテンを含む。

【0195】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、対象は哺乳類である。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、対象はヒトである。いくつかの実施形態によれば、対象は、非ヒト哺乳類、例えば非ヒト靈長類、愛玩動物(例えば、ネコ、イヌ、ウマ)、農業用動物、作業用動物又は動物園の動物である。いくつかの実施形態によれば、対象は齧歯動物である。いくつかの実施形態によれば、対象はヒトである。いくつかの実施形態によれば、対象は愛玩動物である。いくつかの実施形態によれば、対象は、獣医師のケア動物である。10

【0196】

それらの方法のいくつかの実施形態によれば、前記方法は、インビボ方法である。それらの方法のいくつかの実施形態によれば、前記方法は、現場方法である。それらの方法のいくつかの実施形態によれば、前記方法は、エキソビボ方法である。それらの方法のいくつかの実施形態によれば、前記方法は、インビトロ方法である。

【0197】

それらの方法のいくつかの実施形態によれば、前記方法は、本開示の活性化可能抗体による治療、続いて、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体を、その必要な対象に投与することによる治療のために適切な患者集団を同定するか又は他方では、さらに絞り込むために使用される。例えば、それらの方法において試験される、標的、及び活性化可能抗体中の切断可能部分(CM)において基質を切断する少なくとも1つの MMP の両者について陽性である患者は、そのような CM を含む活性化可能抗体による治療のための適切な候補体として同定され、そして次に、患者は試験される、治療的に有効な量の活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体を投与される。同様に、それらの方法を用いて試験される、標的、及び活性化可能抗体中の CM において基質を切断する MMP の両者について陰性である患者は、別の形の治療のための適切な候補体として同定され得る。いくつかの実施形態によれば、そのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体(例えば、疾患の部位で患者により切断される CM を含む活性化可能抗体)が同定されるまで、他の活性化可能抗体により試験され得る。いくつかの実施形態によれば、次に、患者は、治療的有効量の活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体が投与され、患者が陽性として判定される。2030

【0198】

本開示の医薬組成物は、本開示の抗体は、及び担体を含むことができる。医薬組成物は、キット、例えば診断キットに含まれ得る。

【図面の簡単な説明】

【0199】

【図1A】図1Aは、アミノ酸配列 C I S P R G C P D G P Y V M Y (配列番号160)を含むマスキング部分、MMP14基質520(また、MN520とも、本明細書において呼ばれる)I S S G L L S S (配列番号14)を含む切断部分、及び抗-E G F R 抗体C225v5(ここで、完全な活性化可能抗体コンストラクトは、本明細書に置いて、Pb-MN520とも呼ばれる)を含む活性化可能抗-E G F R 抗体の、H292異種移植肺癌モデルにおける腫瘍増殖を阻害する能力を示す一連のグラフである。40

【図1B】図1Bは、アミノ酸配列 C I S P R G C P D G P Y V M Y (配列番号160)を含むマスキング部分、MMP14基質520(また、MN520とも、本明細書において呼ばれる)I S S G L L S S (配列番号14)を含む切断部分、及び抗-E G F R 抗体C225v5(ここで、完全な活性化可能抗体コンストラクトは、本明細書に置いて、Pb-MN520とも呼ばれる)を含む活性化可能抗-E G F R 抗体の、H292異種移植肺癌モデルにおける腫瘍増殖を阻害する能力を示す一連のグラフである。50

【図2A】図2Aは、SMP87として本明細書において呼ばれる基質プールの5nMのMMP9による切断を示す一連のグラフである。

【図2B】図2Bは、SMP87として本明細書において呼ばれる基質プールの5nMのMMP9による切断を示す一連のグラフである。

【図3A】図3Aは、5nMのMMP9による基質配列VAGRSMRP（配列番号484）の切断を示す一連のグラフである。

【図3B】図3Bは、5nMのMMP9による基質配列VAGRSMRP（配列番号484）の切断を示す一連のグラフである。

【図4】図4は、基質配列頻度と機能との相互関係を示すがグラフである。

【図5A】図5Aは、60nMのMMP14による基質プールSMP39の切断を示す一連のグラフである。10

【図5B】図5Bは、60nMのMMP14による基質プールSMP39の切断を示す一連のグラフである。

【図6A】図6Aは、30nMのMMP14による基質配列QNQALRMA（配列番号15）の切断を示す一連のグラフである。

【図6B】図6Bは、30nMのMMP14による基質配列QNQALRMA（配列番号15）の切断を示す一連のグラフである。

【図7A】図7Aは、本明細書に提供される実施例に使用されるペプチドディスプレイプラットフォームの一連の概略図である。図7Aは、「ディスプレイプラットフォームCYTX-DP-XXXXXX」又は「CYTX-DP-XXXXXXX」（配列番号512）として本明細書において言及されるディスプレイプラットフォームの配列の概略図である。20

【図7B】図7Bは、本明細書に提供される実施例に使用されるペプチドディスプレイプラットフォームの一連の概略図である。図7Bは、「ディスプレイプラットフォームSP-CYTX-DP-XXXXXXX」又は「SP-CYTX-DP-XXXXXXX」（配列番号513）として本明細書において言及されるディスプレイプラットフォームの配列の概略図であり、ここでSP-CYTX-DP-XXXXXXX（配列番号513）は、シグナルペプチドを有するCYTX-DP-XXXXXXX（配列番号512）プラットフォームである。

【発明を実施するための形態】

【0200】

本開示は、少なくとも1つのマトリックス・メタロプロテアーゼ（MMP）のための基質である切断可能部分（CM）を含むアミノ酸配列を提供する。それらのCMは、種々の治療的、診断的及び予防的適用において有用である。

【0201】

本明細書に提供される実施例は、それらのCMが、ペプチドディスプレイプラットフォームで表示される場合、特定の条件下でMMPプロテアーゼに暴露される場合の多くの所望する切断特徴を示すことを実証する。例えば、表9は、次のことを示す：(a) 150mMのNaCl、10mMのCaCl₂、及び0.05%（w/v）Brij-35により補充された、50mMのトリス-HCl（pH 7.4）において、37℃で1時間、50nMのヒトMMP9と共にインキュベートされる場合、少なくとも20%の切断率を示したCYTX-DPディスプレイプラットフォームで試験されるMMP9 - 選択された基質の百分率（50nMのMMP9による20%以上の切断率）；(b) 10mMのCaCl₂、及び0.5mMのMgCl₂により補充された、50mMのHEPES（pH 6.8）において、37℃で1時間、50nMのヒトMMP14と共にインキュベートされる場合、少なくとも20%の切断率を示したCYTX-DPディスプレイプラットフォームで試験されるMMP14 - 選択された基質の百分率（50nMのMMP14による20%以上の切断率）；及び(c) 100mMのNaCl、0.01%のTween20、及び1mMのEDTAにより補充された、50mMのトリス-HCl（pH 7.4）において、37℃で1時間、500pMのヒトプラスミンと共にインキュベートされる場合、20%以40

下の切断率を示したCYT-X-DPディスプレイプラットフォームで試験されるMMP9 - 選択された又はMMP14 - 選択された基質の百分率(500pMのプラスミンによる20%以下の切断率)。

【0202】

いくつかの実施形態によれば、CYT-X-DPプラットフォームで表示される場合、MMP9基質は、150mMのNaCl、10mMのCaCl₂及び0.05%(w/v)のBrij-35により補充された、50mMのトリス-HCl(pH7.4)において37

で1時間、50nMのヒトMMP9と共にインキュベートされる場合、少なくとも20%ノン切断率を示す。いくつかの実施形態によれば、CYT-X-DPプラットフォームで表示される場合、MMP9基質は、100mMのNaCl、0.01%のTween20、及び1mMのEDTAにより補充された、50mMのトリス-HCl(pH7.4)において37 10で1時間、500pMのヒトプラスミンと共にインキュベートされる場合、20%以下の切断率を示す。いくつかの実施形態によれば、CYT-X-DPプラットフォームで表示される場合、MMP9基質は、150mMのNaCl、10mMのCaCl₂及び0.05%(w/v)のBrij-35により補充された、50mMのトリス-HCl(pH7.4)において37 20で1時間、50nMのヒトMMP9と共にインキュベートされる場合、少なくとも20%ノン切断率を示し、そして100mMのNaCl、0.01%のTween20、及び1mMのEDTAにより補充された、50mMのトリス-HCl(pH7.4)において37 で1時間、500pMのヒトプラスミンと共にインキュベートされる場合、20%以下の切断率を示す。

【0203】

いくつかの実施形態によれば、MMP14基質は、10mMのCaCl₂及び0.5mMのMaCl₂により補充された、50mMのHEPES(pH6.8)において、37

で1時間、50mnMのヒトMMP14と共にインキュベートされる場合、少なくとも20%の切断率を示す。いくつかの実施形態によれば、MMP14基質は、CYT-X-DP法ラットフォームで示される場合、100mMのNaCl、0.01%のTween20及び1mMのEDTAにより補充された、50mMのトリス-HCl(pH7.4)において、37 30で1時間、500pMのヒトプラスミンと共にインキュベートされる場合、20%以下の切断率を示す。いくつかの実施形態によれば、MMP14基質は、10mMのCaCl₂及び0.5mMのMaCl₂により補充された、50mMのHEPES(pH6.8)において、37 で1時間、50mnMのヒトMMP14と共にインキュベートされる場合、少なくとも20%の切断率を示し、そして100mMのNaCl、0.01%のTween20及び1mMのEDTAにより補充された、50mMのトリス-HCl(pH7.4)において、37 で1時間、500pMのヒトプラスミンと共にインキュベートされる場合、20%以下の切断率を示す。

【0204】

いくつかの実施形態によれば、MMP9についての活性化可能抗体における基質の観察されるK_{cat}/K_M値は、100M⁻¹s⁻¹以上である。いくつかの実施形態によれば、MMP9についての活性化可能抗体における基質の観察されるK_{cat}/K_M値は、1、000M⁻¹s⁻¹以上である。いくつかの実施形態によれば、MMP9についての活性化可能抗体における基質の観察されるK_{cat}/K_M値は、10、000M⁻¹s⁻¹以上である。

【0205】

いくつかの実施形態によれば、MMP14についての活性化可能抗体における基質の観察されるK_{cat}/K_M値は、100M⁻¹s⁻¹以上である。いくつかの実施形態によれば、MMP14についての活性化可能抗体における基質の観察されるK_{cat}/K_M値は、1、000M⁻¹s⁻¹以上である。いくつかの実施形態によれば、MMP14についての活性化可能抗体における基質の観察されるK_{cat}/K_M値は、10、000M⁻¹s⁻¹以上である。

【0206】

本開示はまた、1又は2以上のそれらのMMP - 切断可能基質を含む抗体も提供する。例えば、それらのMMP - 切断可能基質は、接合された抗体を生成するために、抗体を、

10

20

30

40

50

1 又は 2 以上の追加の剤に接合する場合、有用である。それらの M M P - 切断可能基質は、活性化可能抗体コンストラクトにおいて有用である。

【 0 2 0 7 】

接合された抗体及び / 又は活性化可能抗体は、標的を特異的に接合する抗体又はその抗原結合フラグメント (A B) を含む。 A B の典型的な種類の標的は、細胞表面受容体及び分泌された結合タンパク質 (例えは、成長因子) 、可溶性酵素、構造タンパク質 (例えは、コラーゲン、フィブロネクチン) 及び同様のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない。いくつかの実施形態によれば、接合された抗体及び / 又は活性化可能抗体は、細胞外標的、通常、細胞外タンパク質標的を結合する A B を有する。いくつかの実施形態によれば、接合された抗体及び / 又は活性化可能抗体は、細胞摂取のために企画され、そして細胞内で切替え可能である。 10

【 0 2 0 8 】

非制限的な例として、 A B は、表 1 に列挙される任意の標的のための接合パートナーである。

【 0 2 0 9 】

【表 2 1】

表 1 : 典型的な標的

1-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LAG-3	STEAP1
α-4インテグ リン	CD56	DLK1	ヒアルロニ ダーゼ	LIF-R	STEAP2
α-Vインテグ リン	CD64	DLL4	ICOS	ルイス X	TAG-72
α4β1 イン テグリン	CD70	DPP-4	IFNα	LIGHT	TAPA1
α4β7 イン テグリン	CD71	DSG1	IFNβ	LRP4	TGFβ
AGR2	CD74	EGFR	IFNγ	LRRC26	TIGIT
抗-ルイス-Y		EGFRviii	IgE	MCSP	TIM-3
アペリンJ 受容体	CD80	エンドセリンB 受容体(ETBR)	IgE 受容体	メソテリン (FcεRI)	TLR2
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MRP4	TLR4
B7-H4	CD86	EpCAM	IGF1R	MUC1	TLR6
BAFF	CD95	EPHA2	IL1B	ムチン-16 (MUC16, CA-125)	TLR7
BTLA	CD117	EPHB2	IL1R	Na/K ATP アーゼ	TLR8
C5 捕体	CD125	ERBB3	IL2	好中球 エラスター	TLR9
C-242	CD132 (IL-2RG)	RSVのFタンパク質	IL11	NGF	TMEM31
CA9	CD133	FAP	IL12	ニカストリン	TNFα
CA19-9 (ルイス a)	CD137	FGF-2	IL12p40	ノッチ受容体	TNFR
炭酸脱水 酵素9	CD138	FGF8	IL-12R, IL-12Rβ	ノッチ 1	TNFRS12A
CD2	CD166	FGFR1	IL13	ノッチ 2	TRAIL-R1
CD3	CD172A	FGFR2	IL13R	ノッち 3	TRAIL-R2
CD6	CD248	FGFR3	IL15	ノッち 4	トランスフェリン
CD9	CDH6	FGFR4	IL17	NOV	トランスフェリン 受容体
CD11a	CEACAM5 (CEA)	葉酸受容体	IL18	OSM-R	TRK-A
CD19	CEACAM6 (NCA-90)	GAL3ST1	IL21	OX-40	TRK-B
CD20	CLAUDIN-3	G-CSF	IL23	PAR2	uPAR
CD22	CLAUDIN-4	G-CSFR	IL23R	PDGF-AA	VAP1
CD24	cMet	GD2	IL27/IL27R	PDGF-BB	VCAM-1 (wsx1)

10

20

30

40

【 0 2 1 0 】

【表 2 2】

CD25	コラーゲン	GITR	IL29	PDGFR α	VEGF
CD27	Cripto	GLUT1	IL-31R	PDGFR β	VEGF-A
CD28	CSFR	GLUT4	IL31/IL31R	PD-1	VEGF-B
CD30	CSFR-1	GM-CSF	IL2R	PD-L1	VEGF-C
CD33	CTLA-4	GM-CSFR	IL4	PD-L2	VEGF-D
CD38	CTGF	GP IIb/IIIa 受容体	IL4R	ホスファチジル セリン	VEGFR1
CD40	CXCL10	Gp130	IL6, IL6R	P1GF	VEGFR2
CD40L	CXCL13	GPIIB/IIIA 受容体	インスリン	PSCA	VEGFR3
CD41	CXCR1	GPNMB	Jagged リガンド	PSMA	VISTA
CD44	CXCR2	GRP78	Jagged 1	RAAG12	WISP-1
CD44v6		HER2/neu	Jagged 2	RAGE	WISP-2
CD47	CXCR4	HGF		SLC44A4	WISP-3
CD51	CYR61	hGH		スフィンゴシン 1リン酸	

10

【0211】

20

非制限的な例として、A B は、表 2 に列挙される抗体であるか、又はその抗体に由来する。

【0212】

【表23】

表2：ABのための典型的な源

抗体商号(抗体名)	標的
Avastin (登録商標) (ペバシズマブ)	VEGF
Lucentis (登録商標) (ラニビズマブ)	VEGF
Erbitux (登録商標) (セツキシマブ)	EGFR
Vectibix (登録商標) (パニツムマブ)	EGFR
Remicade (登録商標) (インフリキシマブ)	TNF α
Humira (登録商標) (アダリムマブ)	TNF α
Tysabri (登録商標) (ナタリズマブ)	インテグリン $\alpha 4$
Simulect (登録商標) (バシリキシマブ)	IL2R
Soliris (登録商標) (エクリズマブ)	補体 C5
Raptiva (登録商標) (エファリズマブ)	CD11a
Bexxar (登録商標) (トシツモマブ)	CD20
Zevalin (登録商標) (イブリツモマブチウキセタン)	CD20
Rituxan (登録商標) (リツキシマブ)	CD20
オクレリズマブ	CD20
Arzerra (登録商標) (オファツムマブ)	CD20
オビヌツズマブ (Obinutuzumab)	CD20
Zenapax (登録商標) (ダクリズマブ)	CD25
Adcentris (登録商標) (ブレンツキシマブベドチン)	CD30
Myelotarg (登録商標) (ゲムツズマブ)	CD33
Mylotarg (登録商標) (ゲムツズマブオゾガミシン)	CD33
Campath (登録商標) (アレムツズマブ)	CD52
ReoPro (登録商標) (アブシキシマブ)	糖タンパク質受容体IIb/IIIa
Xolair (登録商標) (オマリズマブ)	IgE
Herceptin (登録商標) (トラスツズマブ)	Her2
Kadcyla (登録商標) (トラスツズマブエムタシン)	Her2
Synagis (登録商標) (パリビズマブ)	RSVのFタンパク質
(イピリムマブ)	CTLA-4
(トレメリムマブ)	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(ペルツズマブ)	Her2-neu
(エルタマキソマブ)	CD3/Her2-neu
Orencia (登録商標) (アバセプト)	CTLA-4
(タネズマブ)	NGF
(バビツキシマブ)	ホスファチジルセリン
(ザルツムマブ)	EGFR
(マバツムマブ)	EGFR
(マツズマブ)	EGFR
(ニモツズマブ)	EGFR
ICR62	EGFR
mAb 528	EGFR
CH806	EGFR

【0213】

【表 2 4】

MDX-447	EGFR/CD64
(エドレコロマブ)	EpCAM
RAV12	RAAG12
huJ591	PSMA
Enbrel (登録商標) (エタネルセプト)	TNF-R
Amevive (登録商標) (アレファセプト)	1-92-LFA-3
Antril (登録商標)、Kineret (登録商標) (アナキンラ)	IL-1Ra
GC1008	TGF β
	ノッチ、例えばノッチ 1
	Jagged 1 又は Jagged 2
(アデカツムマブ)	EpCAM
(フィギツムマブ)	IGF1R
(トリシリズマブ)	IL-6受容体
Stelara (登録商標) (アステキヌマブ)	IL-12/IL-23
Prolia (登録商標) (デノスマブ)	RANKL

10

20

【0214】

本開示の典型的な接合された抗体及び / 又は活性化可能抗体は例えば、インターロイキン 6 受容体 (IL - 6 R) を結合し、そしてインターロイキン - 6 受容体 (IL - 6 R) を結合する、「A v 1」抗体として、本明細書において言及される抗体であるか、又はその抗体に由来する H 鎖及び L 鎖を含む抗体を包含する。A v 1 H 鎖及び A v 1 L 鎖についてのアミノ酸配列が、それぞれ配列番号 5 4 及び配列番号 5 5 として下記に示されている。

【0215】

A v 1 抗体 H 鎖アミノ酸配列：

【化 1】

30

QVQLQESEGPGLVRPSQTLSTCTVSGYSITSDHAWSVRQPPGRGLEWIGYISYSGITTYN PSLKSRVTISRDN SKNTLYLQ
MNSLR AEDTAVYYCARS LARTTAMDYWGQGS LTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKD YFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL F
PPKPKDTLM I SRTPEVTCVWDVSHEDPEVKF N WYVDGVEVHN A KTKPREEQYNSTYRW SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPI EKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 5 4)

【0216】

A v 1 抗体 L 鎖アミノ酸配列：

40

【化 2】

DIQM T QSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSYL NWYQQKPGKAPKLLI YYTSRLHSGVPSR FSGSGSGTDFTFTISSLQPED
IATYYCQQGNTLPYTFQGQGTKVEIKRTVAAPS VIFPPSD EQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYLSSTLTSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 5 5)

【0217】

本開示の典型的な接合された抗体及び / 又は活性化可能抗体は例えば、インターロイキン 6 受容体 (IL - 6 R) を結合し、そして A v 1 抗体であるか、又はその抗体に由来する H 鎖及び L 鎖、及びマスキング部分を含む抗体を包含する。本開示の典型的な接合され

50

た抗体及び／又は活性化可能抗体は、AV1L鎖のN-末端に結合されるアミノ酸配列を含む。それらのN-末端アミノ酸配列は、例えばY G S C S W N Y V H I F M D C（配列番号161）；Q G D F D I P F P A H W V P I T（配列番号162）；M G V P A G C V W N Y A H I F M D C（配列番号163）；Q G Q S G Q Y G S C S W N Y V H I F M D C（配列番号164）；Q G Q S G Q G D F D I P F P A H W V P I T（配列番号165）；又はQ G Q S G Q M G V P A G C V W N Y A H I F M D C（配列番号166）を含む。そのようなアミノ酸配列は、AV1H鎖のN-末端に、又はAV1H又はL鎖のC-末端に結合され得ることがまた理解されるべきである。

【0218】

本開示の典型的な活性化可能抗体は、例えば上皮成長因子受容体（EGFR）を結合し、そして「c22v5」抗体として、本明細書において言及される抗体、「c225v4」抗体として、本明細書において言及される抗体、及び「c225v6」抗体として、本明細書に言及される抗体（それぞれ、EGFRを結合する）から成る群から選択される抗体であるか、又はその抗体に由来するH鎖及びL鎖を含む抗体を包含する。c225v5抗体、c225v4抗体及びc225v6抗体は、「c225L鎖」として、本明細書において言及される同じL鎖配列を共有する。c225v5H鎖、c225v4抗体、c225v6抗体、及びc225L鎖についてのアミノ酸配列が下記に示される。

【0219】

c225v5抗体H鎖アミノ酸配列：

【化3】

10

QVQLKQSGPGLVQPSQSLAITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKM
NSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYLFPPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFP
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*（配列番号56）

【0220】

c225v4抗体H鎖アミノ酸配列：

【化4】

30

QVQLKQSGPGLVQPSQSLAITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKM
NSLQSNDTAYYCARALTYDYEFAYWGQGTLTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYLFPPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*（配列番号57）

【0221】

c225v6抗体H鎖アミノ酸配列：

【化5】

40

QVQLKQSGPGLVQPSQSLAITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKM
NSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYLFPPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRW SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTIASKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESENQOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*（配列番号58）

50

【0222】

c 225 抗体 L鎖アミノ酸配列：

【化6】

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNINHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSR FSGSGSGTDFTLSINSVESD
IADYYCQQNNNWPPTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTLTSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (配列番号 59)

【0223】

本開示の典型的な接合された抗体及び／又は活性化可能抗体は、例えば、Jagged標的、
10 例えばJagged - 1、Jagged - 2 及び／又はJagged - 1 及びJagged - 2 の両方を結合し、そ
して下記に示される可変 H鎖及び可変 L鎖配列であるか、又はそれらに由来する、可変 H
鎖領域及び可変 L鎖領域の組合せを含む抗体を包含する。

【0224】

可変 L鎖アミノ酸配列 L c 4

【化7】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSWAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 60)

20

【0225】

可変 H鎖アミノ酸配列 H c 4

【化8】

EVQLLESGGGLVQPQGSRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCAKDIIGRSAFDYWGQGTLTVSS(配列番号 61)

20

【0226】

可変 L鎖アミノ酸配列 L c 5

【化9】

30

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 62)

【0227】

可変 H鎖アミノ酸配列 H c 5

【化10】

40

EVQLLESGGGLVQPQGSRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCAKSPPYHGQFDYWGQGTLTVSS(配列番号 63)

【0228】

可変 L鎖アミノ酸配列 L c 7

【化11】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号64)

【0229】

可変H鎖アミノ酸配列 H c 7

【化12】

10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKSPPFFGQFDYWGQGTLTVSS(配列番号65)

【0230】

可変L鎖アミノ酸配列 L c 8

【化13】

20

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQSWAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号67)

【0231】

可変H鎖アミノ酸配列 H c 8

【化14】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKHIGRTNPFDYWGQGTLTVSS(配列番号68)

30

【0232】

可変L鎖アミノ酸配列 L c 13

【化15】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号69)

【0233】

可変H鎖アミノ酸配列 H c 13

40

【化16】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTEYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKSAAFDYWGQGTLTVSS (配列番号70)

【0234】

可変L鎖アミノ酸配列 L c 16

【化17】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号71)

【0235】

可変H鎖アミノ酸配列 Hc16

【化18】

10

EVQLLESGGGLVQPSSRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKSPPYYGQFDYWGQGTLTVSS (配列番号72)

【0236】

可変L鎖アミノ酸配列 Lc19

【化19】

20

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号73)

【0237】

可変H鎖アミノ酸配列 Hc19

【化20】

EVQLLESGGGLVQPSSRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKSPPFFGQFDYWGQGTLTVSS (配列番号74)

【0238】

30

可変L鎖アミノ酸配列 Lc21

【化21】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号75)

【0239】

可変H鎖アミノ酸配列 Hc21

【化22】

40

EVQLLESGGGLVQPSSRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLTVSS (配列番号76)

【0240】

可変L鎖アミノ酸配列 Lc24

【化23】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTSSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKEIKR (配列番号77)

【0241】

可変H鎖アミノ酸配列 H c 2 4

【化24】

10

EVQLLESGGGLVQPAGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTLYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGTLTVSS (配列番号78)

【0242】

可変L鎖アミノ酸配列 L c 2 6

【化25】

20

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTSSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKEIKR (配列番号79)

【0243】

可変H鎖アミノ酸配列 H c 2 6

【化26】

EVQLLESGGGLVQPAGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLTVSS (配列番号80)

30

【0244】

可変L鎖アミノ酸配列 L c 2 7

【化27】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTSSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKEIKR (配列番号81)

【0245】

可変H鎖アミノ酸配列 H c 2 7

40

【化28】

EVQLLESGGGLVQPAGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCAKSPPFYGQFDYWGQGTLTVSS (配列番号82)

【0246】

可変L鎖アミノ酸配列 L c 2 8

【化29】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号83)

【0247】

可変H鎖アミノ酸配列 Hc28

【化30】

10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKSPPFFGQFDYWGQGTLTVSS (配列番号84)

【0248】

可変L鎖アミノ酸配列 Lc30

【化31】

20

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号85)

【0249】

可変H鎖アミノ酸配列 Hc30

【化32】

30

【0250】

可変L鎖アミノ酸配列 Lc31

【化33】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSWAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号87)

【0251】

可変H鎖アミノ酸配列 Hc31

【化34】

40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLTVSS (配列番号88)

【0252】

可変L鎖アミノ酸配列 Lc32

【化35】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKEIKR (配列番号89)

【0253】

可変H鎖アミノ酸配列 H c 3 2

【化36】

10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGWQTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGTIVTVSS (配列番号90)

【0254】

可変L鎖アミノ酸配列 L c 3 7

【化37】

20

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKEIKR (配列番号91)

【0255】

可変H鎖アミノ酸配列 H c 3 7

【化38】

30

【0256】

可変L鎖アミノ酸配列 L c 3 9

【化39】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKEIKR (配列番号93)

【0257】

可変H鎖アミノ酸配列 H c 3 9

40

【化40】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYYADSKGRF ISRDNSKNTLYLQMN
SLRAED A YYCAKSAAFDYWGQGTIVTVSS (配列番号94)

【0258】

可変L鎖アミノ酸配列 L c 4 0

【化41】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKEIKR (配列番号95)

【0259】

H鎖アミノ配列 Hc40

【化42】

10

EVQLLESGGGLVQPAGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKSPPFFGQFDYWGQGTLVTVSS (配列番号96)

【0260】

可変L鎖アミノ酸配列 Lc47

【化43】

20

DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKEIKR (配列番号97)

【0261】

可変H鎖アミノ酸配列 Hc47

【化44】

EVQLLESGGGLVQPAGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSSIDEQMGWQTEYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKSAAFDYWGQGTLVTVSS (配列番号98)

30

【0262】

可変4B2 L鎖

【化45】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVТИCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQTLDAPPQFGQGTKEIKR (配列番号99)

【0263】

可変4B2 H鎖

40

【化46】

EVQLLESGGGLVQPAGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLVTVSS (配列番号100)

【0264】

可変4D11 L鎖

【化47】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQTWAPPLFGQGTTKVEIKR (配列番号 101)

【0265】

可变 4 D 1 1 H 鎖

【化48】

10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLTVSS (配列番号 102)

【0266】

可变 4 E 7 L 鎖

【化49】

20

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQSLVAPLTFGQGTTKVEIKR (配列番号 103)

【0267】

可变 4 E 7 H 鎖

【化50】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTKYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKSAAFDYWGQGTLTVSS (配列番号 104)

30

【0268】

可变 4 E 1 1 L 鎖

【化51】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED
FATYYCQQALDAPLMFGQGTTKVEIKR (配列番号 105)

【0269】

可变 4 E 1 1 H 鎖

40

【化52】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEPMGQLTEYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRaedTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGTLTVSS (配列番号 106)

【0270】

可变 6 B 7 L 鎖

【化53】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQALVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号107)

【0271】

可変6B7 H鎖

【化54】

10

EVQLLESGGGLVQPAGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEWGQTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGTLTVSS (配列番号108)

【0272】

可変6F8 L鎖

【化55】

20

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQALVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号109)

【0273】

可変6F8 H鎖

【化56】

EVQLLESGGGLVQPAGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEWGQTYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGTLTVSS (配列番号110)

30

【0274】

本開示の典型的な接合された抗体及び/又は活性化可能抗体は、例えば、Jagged標的、
例えばJagged-1、Jagged-2及び/又はJagged-1及びJagged-2の両方を結合し、そ
して下記に示されるH鎖及びL鎖配列であるか、又はそれらに由来する、H鎖領域及びL
鎖領域の組合せを含む抗体を包含する。

【0275】

4D11 L鎖配列:

【化57】

40

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKRTVAAPSFIGPPSD EQLKSGTASVVCLNNFYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSTYSLSSTTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号111)

【0276】

4D11 H鎖配列:

【化 5 8】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ
MNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWQGQTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL F
PPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 112)

【0277】

10

4 D 1 1 v 2 H 鎖配列：

【化 5 9】

EVHLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWQGQTLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 113)

20

【0278】

4 D 1 1 v 2 L 鎖配列：

【化 6 0】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSSLQPED
FATYYCQQTVVAPPFLFGQGTKEIKRTVAAPSVIDFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLXK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 114)

【0279】

30

本明細書に提供される活性化可能抗体及び活性化可能抗体組成物は、標的、例えばヒト標的を特異的に結合する抗体又はその抗体フラグメント（集合的には、本開示を通して A B として言及される）を少なくとも含み、ここで前記 A B はマスキング部分（MM）により修飾される。

【0280】

いくつかの実施形態によれば、マスキング部分は、特定の抗体又は抗体フラグメントとの使用のために選択される。例えば、EGFRを結合する抗体との使用のための適切なマスキング部分は、配列 C I S P R G (配列番号 167)を含むMMを包含する。非制限的例によれば、MMは、配列、例えば C I S P R G C (配列番号 497); C I S P R G C G (配列番号 168); C I S P R G C P D G P Y V M Y (配列番号 160); C I S P R G C P D G P Y V M (配列番号 169); C I S P R G C E P G T Y V P T (配列番号 170) 及び C I S P R G C P G Q I W H P P (配列番号 171)を含むことができる。他の適切なマスキング部分は、PCT国際公開番号 2010 / 081173号に開示される EGFR - 特異的マスクの何れか、例えば、非制限的例によれば、G S H C L I P I N M G A P S C (配列番号 172); C I S P R G C G G S S A S Q S G Q G S H C L I P I N M G A P S C (配列番号 173); C N H H Y F Y T C G C I S P R G C P G (配列番号 174); A D H V F W G S Y G C I S P R G C P G (配列番号 175); C H H V Y W G H C G C I S P R G C P G (配列番号 176); C P H F T T T S C G C I S P R G C P G (配列番号 177); C N H H Y H Y Y C G C I S P R G C P G (配列番号 178); C P H V S F G S C G C I S P R G C P G (配列番号 179); C P Y Y T L S Y C G C I S P R G C P G (配列番号 180); C N H V Y F G T C G C I S P R G C P G

40

50

(配列番号 181); CNHFTLTTCGCISPRGCPG (配列番号 182); CHHFTLTTCGCISPRGCPG (配列番号 183); YNPATPMCCISPRGCPG (配列番号 184); CNHHYFYTCGCISPRGCG (配列番号 185); CNHHYHYCGCISPRGCG (配列番号 186); CNHVYFGTCGCISPRGCG (配列番号 187); CHHVYWGHCGCISPRGCG (配列番号 188); CPHTTTS CGCISPRGCG (配列番号 189); CNHFTLTTCGCISPRGCG (配列番号 190); CHHFTLTTCGCISPRGCG (配列番号 191); CPYYTLSYCGCISPRGCG (配列番号 192); CPHVSGSCGCISPRGCG (配列番号 193); ADHVFWGSYGCISPRGCG (配列番号 194); YNPATPMCCISPRGCG (配列番号 195); CHHVYWGHCGCISPRGCG (配列番号 196); C(N/P)H(H/V/F)(Y/T)(F/W/T/L)(Y/G/T/S)(T/S/Y/H)CGCISPRGCG (配列番号 197); CISPRGCGQPIPSVK (配列番号 198); CISPRGCTQPYHVS (配列番号 199); 及び/又は CISPRGCNAVSGLGS (配列番号 200)を含む。

【0281】

Jagged標的、例えばJagged 1 及び / 又はJagged 2 を結合する抗体との使用のための適切なマスキング部分は、非制限的例によれば、配列、例えばQ G Q S G Q C N I W L V G G D C R G W Q G (配列番号 496); Q G Q S G Q G Q Q Q W C N I W I N G G D C R G W N G (配列番号 201); PWCMQRQDFLRC P Q P (配列番号 202); Q L G L P A Y M C T F E C L R (配列番号 203); CNLWVSGGDCGGLQG (配列番号 204); SCSLWTSGSCLPHSP (配列番号 205); YCLQLPH YM Q A M C G R (配列番号 206); C F L Y S C T D V S Y W N N T (配列番号 207); PWCMQRQDYLRCPQP (配列番号 208); CNLWI SGGDCR G L A G (配列番号 209); CNLWVSGGDCRGVQG (配列番号 210); CNLWVSGGDCRGLRG (配列番号 211); CNLWI SGGDCRG L P G (配列番号 212); CNLWVSGGDCRDAPW (配列番号 213); CNLWVSGGDCRDLLG (配列番号 214); CNLWVSGGDCRG L Q G (配列番号 215); CNLWLHGGDCRGWQG (配列番号 216); CNIWL VGGDCRGWQG (配列番号 217); CTTWF C G G D C G V M R G (配列番号 218); CNIWGP S V D C G A L L G (配列番号 219); CNIWVNGGDCRSFEG (配列番号 220); YCLNL PRYMQDMCWA (配列番号 221); YCLALP HYMQADCAR (配列番号 222); C F L Y S C G D V S Y W G S A (配列番号 223); CYLYSCTDSAFWNRR (配列番号 224); CYLYS CNDVS YWSNT (配列番号 225); C F L Y S C T D V S Y W (配列番号 226); C F L Y S C T D V A Y W N S A (配列番号 227); C F L Y S C T D V S Y W G D T (配列番号 228); C F L Y S C T D V S Y W G N S (配列番号 229); C F L Y S C T D V A Y W N N T (配列番号 230); C F L Y S C G D V S Y W G N P G L S (配列番号 231); C F L Y S C T D V A Y W S G L (配列番号 232); CYLYSCTDGS YWNST (配列番号 233); C F L Y S C S D V S Y W G N I (配列番号 234); C F L Y S C T D V A Y W (配列番号 235); C F L Y S C T D V S Y W G S T (配列番号 236); C F L Y S C T D V A Y W G D T (配列番号 237); GCNIWLNG G D C R G W V D P L Q G (配列番号 238); GCNIWL VGGDCRGWIGDT NG (配列番号 239); GCNIWL VGGDCRGWIEDSNG (配列番号 240); GCNIWANGGDCRGWIDNIDG (配列番号 241); GCNIWL VGGDCRGWLGEAVG (配列番号 242); GCNIWL VGGDCRGWLEEA VG (配列番号 243); GGPALCN IWLNNGGDCRGWMSG (配列番号 244); GAPVFCN IWLNNGGDCRGWMG (配列番号 245); GQQQWCNIWINGGDCRGWNG (配列番号 246); GKSEFCN IWLNNGGDCRGWIG (配列番号 247); GTPGGCNIWANGGDCRGWEG (配列番号 248)

8); G A S Q Y C N L W I N G G D C R G W R G (配列番号 249); G C N I W L V G G D C R P W V E G G (配列番号 250); G C N I W A V G G D C R P F V D G G (配列番号 251); G C N I W L N G G D C R A W V D T G (配列番号 252); G C N I W I V G G D C R P F I N D G (配列番号 253); G C N I W L N G G D C R P V V F G G (配列番号 254); G C N I W L S G G D C R M F M N E G (配列番号 255); G C N I W V N G G D C R S F V Y S G (配列番号 256); G C N I W L N G G D C R G W E A S G (配列番号 257); G C N I W A H G G D C R G F I E P G (配列番号 258); G C N I W L N G G D C R T F V A S G (配列番号 259); G C N I W A H G G D C R G F I E P G (配列番号 260); G F L E N C N I W L N G G D C R T G (配列番号 261); G I Y E N C N I W L N G G D C R M G (配列番号 262); 及び/又は G I P D N C N I W I N G G D C R Y G (配列番号 263)を含むマスキング部分を含む。 10

【0282】

インターロイキン6標的、例えばインターロイキン6受容体(I L - 6 R)を結合する抗体との使用のためのマスキング部分は、非制限的例によれば、配列、例えばQ G Q S G Q Y G S C S W N Y V H I F M D C (配列番号 264); Q G Q S G Q G D F D I P F P A H W V P I T (配列番号 265); Q G Q S G Q M G V P A G C V W N Y A H I F M D C (配列番号 266); Y R S C N W N Y V S I F L D C (配列番号 267); P G A F D I P F P A H W V P N T (配列番号 268); E S S C V W N Y V H I Y M D C (配列番号 269); Y P G C K W N Y D R I F L D C (配列番号 270); Y R T C S W N Y V G I F L D C (配列番号 271); Y G S C S W N Y V H I F M D C (配列番号 161); Y G S C S W N Y V H I F L D C (配列番号 272); Y G S C N W N Y V H I F L D C (配列番号 273); Y T S C N W N Y V H I F M D C (配列番号 274); Y P G C K W N Y D R I F L D C (配列番号 275); W R S C N W N Y A H I F L D C (配列番号 276); W S N C H W N Y V H I F L D C (配列番号 277); D R S C T W N Y V R I S Y D C (配列番号 278); S G S C K W D Y V H I F L D C (配列番号 279); S R S C I W N Y A H I H L D C (配列番号 280); S M S C Y W Q Y E R I F L D C (配列番号 281); Y R S C N W N Y V S I F L D C (配列番号 282); S G S C K W D Y V H I F L D C (配列番号 283); Y K S C H W D Y V H I F L D C (配列番号 284); Y G S C T W N Y V H I F M E C (配列番号 285); F S S C N W N Y V H I F L D C (配列番号 286); W R S C N W N Y A H I F L D C (配列番号 287); Y G S C Q W N Y V H I F L D C (配列番号 288); Y R S C N W N Y V H I F L D C (配列番号 289); N M S C H W D Y V H I F L D C (配列番号 290); F G P C T W N Y A R I S W D C (配列番号 291); X X s C X W X Y v h 1 f X d C (配列番号 292); M G V P A G C V W N Y A H I F M D C (配列番号 163); R D T G G Q C R W D Y V H I F M D C (配列番号 293); A G V P A G C T W N Y V H I F M E C (配列番号 294); V G V P N G C V W N Y A H I F M E C (配列番号 295); D G G P A G C S W N Y V H I F M E C (配列番号 296); A V G P A G C W W N Y V H I F M E C (配列番号 297); C T W N Y V H I F M D C G E G E G P (配列番号 298); G G V P E G C T W N Y A H I F M E C (配列番号 299); A E V P A G C W W N Y V H I F M E C (配列番号 300); A G V P A G C T W N Y V H I F M E C (配列番号 301); S G A S G G C K W N Y V H I F M D C (配列番号 302); T P G C R W N Y V H I F M E C E A L (配列番号 303); V G V P N G C V W N Y A H I F M E C (配列番号 304); P G A F D I P F P A H W V P N T (配列番号 305); R G A C D I P F P A H W I P N T (配列番号 306); Q G D F D I P F P A H W V P I T (配列番号 162); X G a f D I P F P A H W V P n T (配列番号 307); R G D G N D S D I P F P A H W V P R T (配列番号 308); S G V G R D R D I P F P A H W V P R T (配列番号 309); W A G G N D C D I P F P A H W I P N T (配列番号 310); W G D G M D V D I P F P A H W V P V T (配列番号 311); A G S G N D S D I P F P A H W V P R T (配列番号 312); E S R S G Y A D I P F P A H W V P R T (配列番号 313); 及び/又は R E C G R C G D I 40

P F P A H W V P R T (配列番号 3 1 4)を含むマスキング部分を含む。

〔 0 2 8 3 〕

A B が M M により修飾され、そして標的の存在下にある場合、A B のその標的への特異的結合は、M M により修飾されていない A B の特異的結合、又は親 A B の標的への特異的結合に比較して、低められるか、又は阻害される。

〔 0 2 8 4 〕

標的に対する、MMにより修飾されたABのK_dは、MMにより修飾されていないAB
又は標的に対する親ABのK_dよりも、少なくとも5、10、20、25、40、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、1000,000、10,000,000、50,000,000又はそれ以上、又は5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1000,000、1000-10,000、1000-100,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1000-1000,000、100-100,000、100-1000,000、10,000-1,000、10,000-100,000、10,000-1000,000又は100,000-10,000、100,000-100,000倍、高い。逆に、MMにより修飾されたABの標的に対する結合親和性は、MMにより修飾されていないAB又は親ABの標的に対する結合親和性によも少なくとも2、3、4、5、10、20、25、40、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、1,000,000、5,000,000、100,000,000、500,000,000又はそれ以上、又は5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1000,000、1000-10,000、1000-100,000、1000-1000,000、100-100,000、100-1000,000、10,000-1,000、10,000-100,000、10,000-1000,000又は100,000-10,000、100,000-100,000倍、低い。

[0 2 8 5]

A B に対する MM の解離定数 (K_d) は一般的に、標的にに対する A B の K_d よりも高い。A B に対する MM の K_d は、標的にに対する A B の K_d よりも少なくとも 5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000 又はさらに 10,000,000 倍、高い。逆に、A B に対する MM の結合親和性は、一般的に標的にに対する A B の結合親和性よりも低い。A B に対する MM の結合親和性は、標的にに対する A B の結合親和性よりも少なくとも 5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000 又はさらに 10,000,000 倍、低い。

【 0 2 8 6 】

A B が M M により修飾され、そしてその標的の存在下にある場合、A B のその標的への特異的結合は、M M により修飾されていない A B の特異的結合又は親 A B の標的への特異的結合に比べて、低められるか又は阻害される。M M により修飾されていない A B の標的への結合又は親 A B の標的への結合に比較される場合、M M により修飾される場合の標的を結合する A B の能力は、インビボ又はインビトロアッセイで測定される場合、少なくとも 2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84 又は 96 時間、又は 5、10、15、30、45、60、90、120、150 又は 180 日、又は 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 1 50

1、又は12か月又はそれ以上で、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%及びさらに100%、低められ得る。

【0287】

MMは、ABのその標的に対する結合を阻害する。MMはABの抗原結合ドメインを結合し、そしてABのその標的への結合を阻害する。MMは、ABのその標的への結合を立体的に阻害する。MMはABのその標的への結合をアロステリックに阻害することができる。それらの実施形態によれば、ABが修飾されるか又はMMにカップリングされ、そして標的の存在下にある場合、インビボ又はインビトロアッセイで測定される場合、少なくとも2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、
10
84又は96時間、又は5、10、15、30、45、60、90、120、
150又は180日、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、
11、又は12か月又はそれ以上の間、MMにより修飾されていないAB、親AB、又はMMにカップリングされていないABの標的に対する結合に比べて、ABの標的への結合は存在しないか、又は実質的に存在しないか、又はわずか0.001%、0.01%、
0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、
20%、25%、30%、35%、40%又は50%の標的に対するABの結合が存在する。
。

【0288】

ABがMMにカップリングされるか、又はMMにより修飾される場合、MMはABのその標的への特異的結合を「マスキングするか」又は低めるか、又は他方では、阻害する。ABがMMにカップリングするか又はMMにより修飾される場合、そのようなカップリング又は修飾は、ABのその標的への特異的結合能力を低めるか、阻害する構造変化に影響を及ぼすことができる。

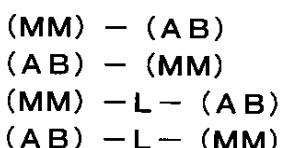
【0289】

MMにカップリングされているか、又はMMにより修飾されたABは、次の式によって表され得る(アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に)：

【0290】

【化61】

30



【0291】

ここで、MMはマスキング部分であり、ABは抗体又はその抗体フラグメントであり、そしてLはリンカーである。多くの実施形態によれば、1又は2以上のリンカー、例えば柔軟リンカーを、組成物中に挿入し、柔軟性を提供することが所望される。

40

【0292】

特定の実施形態によれば、MMはABの天然の結合パートナーではない。いくつかの実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーを含まないか又はそのパートナーに対する相同性を含まない。他の実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、せいぜい5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%又は80%しか同一ではない。いくつかの実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、わずか5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%又は80%しか同一ではない。いくつかの実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、

50

わずか 25 % しか同一ではない。いくつかの実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、わずか 50 % しか同一ではない。いくつかの実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、わずか 20 % しか同一ではない。いくつかの実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、わずか 10 % しか同一ではない。

【0293】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、MMにより修飾され、そしてまた、1又は2以上の切断可能部分(CM)も含むABを含む。そのような活性化可能抗体は、ABの標的への活性化可能／スイッチング可能結合を示す。活性化可能抗体は一般的に、マスキング部分(MM)及び修飾可能又は切断可能部分(CM)により修飾されるか又はそれにカップリングされる少なくとも1つの抗体又は抗体フラグメント(AB)を含む。いくつかの実施形態によれば、CMは、目的のプロテアーゼのための基質として作用するアミノ酸配列を含む。

【0294】

活性化可能抗体中の要素は、MM及びCMが位置決定され、従って、切断された(又は比較的活性)状態下で及び標的の存在下で、ABが標的を結合するが、ところが標的の存在下で、切断されていない(又は相対的に不活性)状態下で、ABのその標的への特異的結合が低められるか又は阻害されるよう、配置される。ABのその標的への特異的結合は、MMによりその標的を特異的に結合するABの能力の阻害又はマスキングのために、低められ得る。

【0295】

標的に対する、MM及びCMにより修飾されたABの K_d は、MM及びCMにより修飾されていないAB、又は標的に対する親ABの K_d よりも、少なくとも5、10、20、25、40、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000又はそれ以上、又は5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1000,000、10,000-1,000、10,000-100,000、10,000-1000,000又は100,000-10,000,000倍、高い。逆に、MM及びCMにより修飾されたABの標的に対する結合親和性は、MM及びCMにより修飾されていないAB又は標的に対する親ABの結合親和性によりも少なくとも2、3、4、5、10、20、25、40、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、50,000,000又はそれ以上、又は5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、10-1,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1000,000、10,000-1,000、10,000-100,000、10,000-1000,000又は100,000-10,000,000倍、低い。

【0296】

ABがMM及びCMにより修飾され、そしてその標的の存在下にあるが、しかし修飾剤(例えば、MMP)の存在下でわないので、ABのその標的への特異的結合は、MM及び

10

20

30

40

50

C Mにより修飾されていないA Bの特異的結合又は親A Bの標的への特異的結合に比べて、低められるか又は阻害される。親A Bの結合、又はMM及びCMにより修飾されていないA Bの標的への結合に比較される場合、MM及びCMにより修飾される場合の標的を結合するA Bの能力は、インビボ又はインビトロアッセイで測定される場合、少なくとも2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84又は96時間、又は5、10、15、30、45、60、90、120、150又は180日、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12か月又はそれ以上で、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%及びさらに100%、低められ得る。

10

【0297】

本明細書において使用される場合、用語、切断された状態とは、少なくとも1つのマトリックス・メタロプロテアーゼによりCMの修飾に続く活性化可能抗体の状態を意味する。用語、切断されていない状態とは、本明細書において使用される場合、MMPによるCMの切断の不在下での活性化可能抗体の状態を意味する。上記で論じられたように、用語「活性化可能抗体(activatable antibodies)」とは、その切断されていない(生来)状態及びその切断された状態の両者での活性化可能抗体を言及するよう、本明細書において使用される。いくつかの実施形態によれば、切断された活性化可能抗体は、プロテアーゼによるCMの切断のために、MMを欠いており、少なくともMMの放出をもたらす(例えば、MMは、共有結合(例えば、システイン残基間のジスルフィド結合)により活性化可能抗体に結合されていない場合)ことは、当業者に明らかであろう。

20

【0298】

活性化可能又はスイッチング可能とは、活性化可能抗体が、阻害された、マスキングされた、又は切断されていない状態下で、標的への結合の第1レベル(第1コンホメーション)、及び阻害されていない、マスキングされていない、及び/又は切断された状態下で、標的への結合の第2レベル(すなわち、第2コンホメーション)を示し、ここで標的結合の第2レベルは、結合の第1レベルよりも大きいことを意味する。一般的に、活性化可能抗体のA Bへの標的のアクセスは、CMを切断できる切断剤の存在下において、そのような切断剤の不在下でよりも高い。従って、活性化可能抗体が切断されていない状態下にある場合、A Bが標的結合から阻害され、そして標的結合からマスキングされ得(すなわち、第1コンホメーションは、A Bが標的を結合できないようなものである)、そして切断された状態下で、A Bは阻害されないか、又は標的結合にマスキングされない。

30

【0299】

活性化可能抗体のCM及びABは、ABが所定の標的のための結合部分を表し、そしてCMが対象における治療部位又は診断部位で標的と共に在されるMMPのための基質を表すよう、選択される。本明細書に開示される活性化可能抗体は、例えば、CMにおける部位を切断できるMMPが、非治療部位の組織においてよりも(例えば、健康組織においてよりも)、治療部位又は診断部位の標的含有組織において、比較的高いレベルで存在する場合、特に有用である。

40

【0300】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、ABがマスキングされないか、又は他方では、その標的の結合から阻害される場合、非治療部位での第1ABの結合に起因する、低められた毒性及び/又は有害な副作用を提供する。

【0301】

一般的に、活性化可能抗体は、目的の第1ABで選択し、そして活性化可能抗体の残りを構築することにより設計され得、結果的に、コンホメーション的に制約される場合、MMはABのマスキング、又はABのその標的への結合の低減を提供する。構築設計基準は、この機能的特徴を提供するよう考慮されるべきである。

【0302】

阻害されていないコンホメーションに対する阻害されたコンホメーションでの標的結合

50

のための所望するダイナミック範囲のスイッチング可能表現型を示す活性化可能抗体が提供される。ダイナミック範囲とは一般的に、(b) 第2組の条件下でのパラメーターの最小検出レベルに対する(a) 第1組の条件下でのパラメーターの最大検出レベルの比率を意味する。例えば、活性化可能抗体の場合、ダイナミック範囲は、(b) プロテアーゼの不在下で活性化可能抗体に結合する標的タンパク質の最小検出レベルに対する(a) 活性化可能抗体のCMを切断できるMMPの存在下で活性化可能抗体に結合する標的タンパク質の最大検出レベルの比率を意味する。活性化可能抗体のダイナミック範囲は、活性化可能抗体切断剤、治療の平衡解離定数に対する、活性化可能抗体切断剤(例えば、酵素)治療の平衡解離定数の比率として計算され得る。活性化可能抗体のダイナミック範囲が大きいほど、活性化可能抗体のスイッチング可能表現型は良好である。比較的高いダイナミック範囲値(例えば、1よりも高い)を有する活性化可能抗体は、活性化可能抗体により結合する標的タンパク質が、切断剤の不在下においてよりも、活性化可能抗体のCMを切断できる切断剤(例えば、酵素)の存在下で、より高い程度に発生する(例えば、主に発生する)ような、より所望のスイッチング表現型を示す。

【0303】

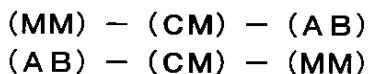
活性化可能抗体は、種々の構造的構成で提供され得る。活性化可能抗体の少なくとも一部についての典型的な式が、下記に提供される。ABのN-からC-末端への順に、MM及びCMが活性化可能抗体内で逆になされ得ることが特に企画される。CM及びMMが、例えばCMがMM内に含まれるよう、アミノ酸配列においてオーバーラップすることができることがまた、特に企画される。

【0304】

例えば、活性化可能抗体の少なくとも一部がアミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、次の式により表され得る:

【0305】

【化62】



【0306】

ここで、MMはマスキング成分であり、CMは切断可能部分であり、そしてABは抗体又はそのフラグメントである。MM及びCMは上記式において異なる成分として示されるが、本明細書において開示されるすべての典型的な実施形態(式を含む)によれば、MM及びCMのアミノ酸配列は、CMがMM内に完全に又は部分的に含まれるよう、オーバーラップできることが企画される。さらに、上記式は、活性化可能抗体要素に対してN末端又はC末端に位置決定され得る追加のアミノ酸配列を提供する。

【0307】

特定の実施形態によれば、MMはABの天然の結合パートナーではない。いくつかの実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーを含まないか又はそのパートナーに対する相同性を含まない。他の実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、せいぜい5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%又は80%しか同一ではない。いくつかの実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、わずか5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%又は80%しか同一ではない。いくつかの実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、わずか50%しか同一ではない。いくつかの実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、わずか25%しか同一ではない。いくつかの実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、わずか20%しか同一では

10

20

30

40

50

ない。いくつかの実施形態によれば、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、わずか10%しか同一ではない。

【0308】

多くの実施形態によれば、1又は2以上のMM-CM接合、CM-AB接合、又は両者で柔軟性を提供するために、活性化可能抗体コンストラクト中に、1又は2以上のリンカー、例えば柔軟リンカーを挿入することが所望される。例えば、AB、MM及び/又はCMは、所望する柔軟性を提供するために、十分な数の残基（例えば、Gly、Ser、Asp、Asn、特にGly及びSer、特にGly）を含むことはできない。そのような活性化可能抗体コンストラクトのスイッチング可能表現型は、柔軟リンカーを提供するために、1又は2以上のアミノ酸の導入から利益を得ることができる。さらに、下記のように、活性化可能抗体がコンホメーション的に制約されたコンストラクトとして提供される場合、柔軟リンカーは、切断されていない活性化可能抗体における環状構造の形成及び維持を促進するために、操作可能的に導入され得る。10

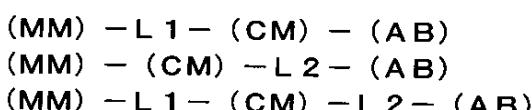
【0309】

例えば、特定の実施形態によれば、活性化可能抗体は、次の式の1つを含む（ここで、下記式は、N-からC-末端方向に、又はC-からN-末端方向に、アミノ酸配列を表す）：

【0310】

【化63】

20



【0311】

ここで、MM、CM及びABは、上記に定義された通りであり；L1及びL2は、それぞれ独立して、及び任意には、存在しても又は不在である良く、少なくとも1つの柔軟アミノ酸（例えば、Gly）を含む同じか又は異なった柔軟リンカーである。さらに、上記式は、活性化可能抗体要素に対してN末端又はC末端に配置され得る追加のアミノ酸配列を提供する。例として、次のものを挙げができるが、但しそれらだけには限定されない：標的化部分（例えば、標的組織に存在する細胞の受容体のためのリガンド）及び血清半減期延長部分（例えば、血清タンパク質、例えば免疫グロブリン（すなわち、IgG）又は血清アルブミン（例えば、ヒト結成アルブミン（HAS））を結合するポリペプチド。30

【0312】

CMは、約0.001 - 1500 × 10⁴ M⁻¹S⁻¹ 又は少なくとも 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2.5、5、7.5、10、15、20、25、50、75、100、125、150、200、250、500、750、1000、1250又は 1500 × 10⁴ M⁻¹S⁻¹ の速度で少なくとも1つのMMPにより特異的に切斷される。40

【0313】

酵素による特異的切斷のためには、酵素とCMとの間の接触が行われる。MM及びCMにカップリングされるABを含む活性化可能抗体が、標的及び十分な酵素活性の存在下にある場合、CMは切斷され得る。十分な酵素活性とは、CMと接触し、そして切斷をもたらす酵素の能力を意味する。酵素はCMの近くにあっても良いが、しかし他の細胞因子又は酵素のタンパク質修飾のために切斷できないことが容易に想定される。

【0314】

本明細書に記載される組成物への使用のために適切なリンカーは一般的に、標的への少なくとも第1ABの結合の阻害を促進するために、修飾されたAB又は活性化可能抗体の柔軟性を提供するリンカーである。適切なリンカーは、容易に選択され、そして何れかの50

適切な異なった長さのものであり得、例えば1個のアミノ酸（例えば、Gly）-20個のアミノ酸、2個のアミノ酸-15個のアミノ酸、3個のアミノ酸-12個のアミノ酸、4個のアミノ酸-10個のアミノ酸、5個のアミノ酸-9個のアミノ酸、6個のアミノ酸-8個のアミノ酸、又は7個のアミノ酸-8個のアミノ酸であり得、そして1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20個の長さのアミノ酸であり得る。

【0315】

典型的な柔軟リンカーは、グリシンポリマー(G_n)、グリシン-セリンポリマー(例えば、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (配列番号1) 及び $(GGGS)_n$ (配列番号2))、ここで n は、少なくとも1の整数である)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び当業界において知られている他の柔軟リンカーを包含する。グリシン及びグリシン-セリンポリマーは、比較的構造化されておらず、そして従って、構成成分間で中立的テサー(neutral tether)として作用することができる。グリシンは、あってもアラニンよりも著しくファイ・ブサイ空間にアクセスし、そしてより長い側鎖を有する残基よりもはるかに低く制限される(Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)を参照のこと)。典型的な柔軟リンカーは、次の配列を含むが、但しそれただけには限定されない: Gly-Gly-Ser-Gly(配列番号3)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(配列番号4)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(配列番号5)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly(配列番号6)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly(配列番号7)、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly(配列番号8)、及び同様のもの。当業者は、活性化可能抗体の企画がすべて又は部分的に柔軟であるリンカーを含むことができ、結果的に、そのリンカーは柔軟リンカー及び所望する多重特異的活性化可能抗体構造を提供するために低い柔軟性の構造を付与する1又は2以上の部分を含むことができることを認識するであろう。

【0316】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に記載される活性化可能抗体はまた、活性化可能抗体に接合される剤も包含する。いくつかの実施形態によれば、接合された剤は、治療剤、例えば抗炎症剤及び/又は抗腫瘍剤である。そのような実施形態によれば、剤は、活性化可能抗体の炭水化物部分に接合され、例えば、いくつかの実施形態によれば、前記炭水化物部分は、抗体の抗原結合領域又は活性化可能抗体における抗原結合フラグメントの外部に位置する。いくつかの実施形態によれば、剤は、抗体のスルフヒドリル基、又は活性化可能抗体における抗原結合フラグメントに接合される。

【0317】

いくつかの実施形態によれば、剤は細胞毒性剤、例えば毒素(例えば、細菌、菌類、植物又は動物起源の酵素的活性毒素、又はそのフラグメント)、又は放射性同位体(すなわち、放射性接合体)である。

【0318】

いくつかの実施形態によれば、剤は、検出可能部分、例えば標識又は他のマーカーである。例えば、剤は、放射性標識されたアミノ酸、マーキングされたアビジン(例えば、光学的又は比色法により検出され得る蛍光マーカー又は酵素活性を含むストレプタビジン)により検出され得る1又は2以上のビオチニル部分、1又は2以上の蛍光標識、1又は2以上の酵素標識、及び/又は1又は2以上の化学蛍光剤により検出され得る。

【0319】

本開示はまた、細胞毒性剤、例えば毒素(例えば、細菌、菌類、植物又は動物起源の酵素的活性毒素、又はそのフラグメント)、又は放射性同位体(すなわち、放射性接合体)に接合される抗体を含む免疫接合体にも関連する。適切な細胞毒性剤は、例えばドラスタチン及びその誘導体(例えば、アウリスタチンE、AFP、MMA D、MMA F、MMA E)を含む。例えば、細胞毒性剤は、モノメチルアウリスタチンE(MMA E)である。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、モノメチルアウリスタチンD(MMA D)である。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、表3に列挙される群から選択された剤である。いくつかの実施形態によれば、剤はドラスタチンである。いくつかの実施形態によれ

10

20

30

40

50

ば、剤はアウリスタチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤は、アウリスタチンE又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤はモノメチルアウリスタチンE(MMAE)である。いくつかの実施形態によれば、剤はモノメチルアウリスタチンD(MMAD)である。いくつかの実施形態によれば、剤はメイタンシノイド又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤はDM1又はDM4である。いくつかの実施形態によれば、剤はデュオカルマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤はカリケアマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤は、ピロロベンゾジアゼピンである。

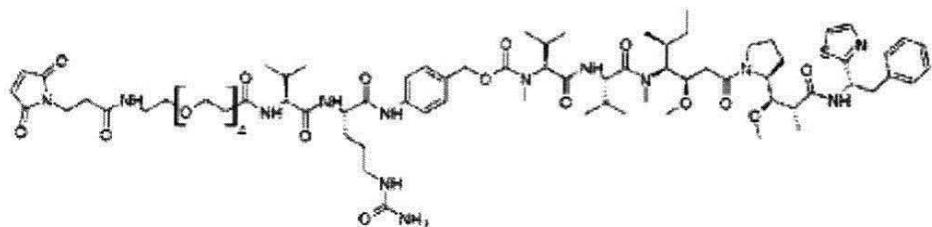
[0 3 2 0]

いくつかの実施形態によれば、剤は、マレイミドカプロイル - シトルリンリンカー又はマレイミドPEG - バリン - シトルリンリンカーを用いて、ABに連結される。いくつかの実施形態によれば、剤は、マレイミドカプロイル - バリン - シトルリンリンカーを用いて、ABに連結される。いくつかの実施形態によれば、剤は、マレイミドPEG - バリン - シトルリンリンカーを用いて、ABに連結される。いくつかの実施形態によれば、剤は、マレイミドPEG - バリン - シトルリン - パラ - アミノベンゾイルオキシカルボニルリンカーを用いて、ABに連結されるモノメチルアウリスタチンD(MMAD)であり、そしてこのリンカーペイロードコンストラクトは、本明細書において、「vc-MMAD」として呼ばれる。いくつかの実施形態によれば、剤は、マレイミドPEG - バリン - シトルリン - パラ - アミノベンゾイルオキシカルボニルリンカーを用いて、ABに連結されるモノメチルアウリスタチンE(MMAE)であり、そしてこのリンカーペイロードコンストラクトは、本明細書において、「vc-MMAE」として呼ばれる。vc-MMAD及びvc-MMAEの構造は、下記に示される：

【 0 3 2 1 】

【化 6 4】

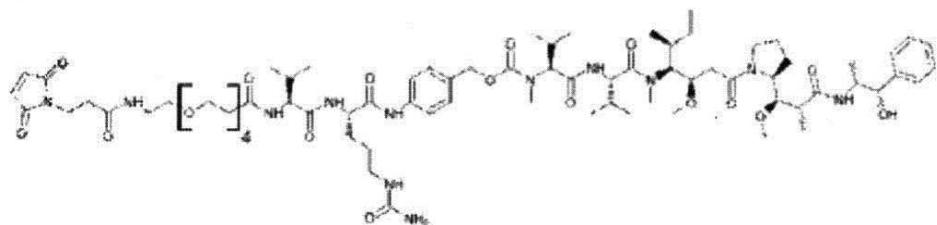
v c -MMA D :



[0 3 2 2]

【化 6 5】

V C - MMAE :



【 0 3 2 3 】

使用され得る酵素的活性毒素及びそのフラグメントは、ジフテリア A鎖、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素 A鎖（綠膿菌からの）、リシン A鎖、アブリン A鎖、モデシン A鎖、- サルシン、シナアブラギリ (*Aleurites fordii*) タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ (*Phytolaca americana*) タンパク質 (PAP I、PAP II 及び PAP-S)、ゴーヤー (*Momordica charantia*) 阻害剤、クルシン、ク

ロトン、サボナリア・オフィシナリス (*Saponaoria officinalis*) 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン (restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテセンを包含する。種々の放射性核種が放射性接合された抗体の生成のために利用できる。例としては、²¹²B i、¹³¹I、¹³¹I n、⁹⁰Y、及び¹⁸⁶R e を挙げることができる。

【0324】

抗体及び細胞毒性剤の接合体は、種々の二官能タンパク質 - カップリング剤、例えば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)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能誘導体 (例えば、ジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル (例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビス - アジド化合物 (例えば、ビス(p - アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トルエン2,6 - ディイソシアネート)、及びビス - 活性フッ素化合物 (例えば、1,5 - デフルオロ - 2,4 - デニトロベンゼン) を用いて製造される。例えば、リシン免疫毒素がVitetta et al., Science 238: 1098 (1987)に記載のようにして調製され得る。¹⁴C - 標識された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五酢酸 (MX-DTPA) は、抗体への放射性核種の接合のための典型的なキレート剤である。(国際公開第94/11026号を参照のこと)。

【0325】

表3は、本明細書に記載される開示に使用され得る典型的な薬剤のいくつかを列挙するが、しかし決して網羅的な列挙を意味するものではない。

【0326】

【表 25】

表3：接合のための典型的な薬剤

細胞毒性剤

アウリスタチン	ツルボスタチン (Turbostatin)	
アウリスタチンE	フェンスタチン (Phenstatins)	
モノメチルアウリスタチンD (MMAD)	ヒドロキシフェンスタチン	
モノメチルアウリスタチン(MMAE)	スponギスタチン5	
デスマチルアウリスタチンE (DMAE)	スponギ스타チン7	10
アウリスタチンF	ハリスタチン1	
モノメチルアウリスタチンF (MMAF)	ハリスタチン2	
デスマチルアウリスタチン F (DMAF)	ハリスタチン3	
アウリスタチン誘導体、例えばそのアミド	修飾されたブリオスタチン	
アウリスタチンチラミン	ヘイロースタチン	
アウリスタチンキノリン	ピロロベンズイミダゾール(PBI)	
ドラスタチン	シブロスタチン6 (Cibrostatin6)	
ドラスタチン誘導体	ドキサリホルム (Doxaliform)	
ドラスタチン 16 DmJ	アントラサイクリン類似体	
ドラスタチン 16 Dpv		
メイタンシノイド、例えば、DM-1; DM-4		20
メイタンシノイド誘導体	セマドチン類似体 (CemCH2-SH)	
デュオカルマイシン	シュードモナス毒素A (PE38) 変異体	
デュオカルマイシン誘導体	シュードモナス毒素A (ZZ-PE38) 変異体	
α -アマニチン	ZJ-101	
アントラサイクリン	OSW-1	
ドキソルビシン	06-ベンジルグアニンの4-ニトロベンジル オキシカルボニル誘導体	
ダウノルビシン	トポイソメラーゼ阻害剤	
ブリオスタチン	ヘミアステルリン (Hemiassterlin)	
カンプトテシン	セファロタキシン	
カンプトテシン誘導体	ホモハーリングトニン	30
7-置換カンプトテシン	ピロロベンゾジアゼピンダイマー (PBDs)	
10, 11-ジフルオロメチレンジオキシカン プロテシン	官能化ピロロベンゾジアゼピン	
コンブレタスタチン	カリケアマイシン	
デブロモアブリシアトキシン	ポドフィロトキシン	
カハラリド-F	タキサン	
ディスコデルモライド	ビンカアルカロイド	
エクチナサイジン		

【0327】

40

【表 2 6】

<u>接合可能な検出試薬</u>	
<u>抗ウイルス薬</u>	フルオレセイン及びその誘導体
アシクロビル	フルオレセインイソチオシアネート (FITC)
<u>放射性医薬</u>	
ビラ A	¹²⁵ I
シンメトレル	¹³¹ I
<u>抗真菌剤</u>	⁸⁹ Zr
ナイスタチン	¹¹¹ In
<u>追加の抗腫瘍薬</u>	
アドリアマイシン	¹²³ I
セルビジン (Cerubidine)	¹³¹ I
ブレオマイシン	^{99m} Tc
アルケラン	²⁰¹ Tl
ベルバン	¹³³ Xe
オンコビン	¹¹ C
フルオロウラシル	⁶² Cu
メトトレキサート	¹⁸ F
チオテバ	⁶⁸ Ga
ビサントレン	¹³ N
ノバントロン	¹⁵ O
チオグアニン	³⁸ K
プロカルバジン	⁸² Rb
シタラビン	^{99m} Tc (テクネチウム)
<u>重金属</u>	
<u>抗菌薬</u>	バリウム
アミノグリコシド	金
ストレプトマイシン	白金
ネオマイシン	
カナマイシン	
アミカシン	
ゲンタマイシン	<u>抗-マイコプラズマ</u>
トブラマイシン	タイロシン
Sストレプトマイシン B	スペクチノマイシン
スペクチノマイシン	
アンピシリン	
スルファニルアミド	
ポリミキシン	
クロラムフェニコール	

【0328】

当業者は、多くの種類の可能性ある部分が、得られる本開示の抗体にカップリングされ得ることを認識するであろう（例えば、“Conjugate Vaccines”, Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989)を参照のこと、この全内容は、引用により本明細書に組込まれる）。

【0329】

カップリングは、抗体及び他の部分がそれらのそれぞれの活性をできるだけ長く保持するよう、2つの分子を結合するであろう任意の化学反応により達成される。この結合は、多くの化学機構、例えば共有結合、親和性結合、インターラーション、配位結合及び錯

体形成を包含することができる。しかしながら、いくつかの実施形態によれば、好ましい結合は共有結合である。共有結合は、既存の側鎖の直接的縮合により又は外部架橋分子の取り組みにより達成され得る。多くの二価又は多価結合剤が、タンパク質分子、例えば本開示の抗体を、他の分子にカップリングすることにおいて有用である。例えば、代表的なカップリング剤は、有機化合物、例えばチオエステル、カルボジイミド、スクシンイミドエステル、ジイソシアネート、グルタルアルデヒド、ジアゾベンゼン及びヘキサメチレンジアミンを包含することができる。この列挙は、当業界において知られている種々の種類のカップリング剤を網羅することを意図するものではなく、むしろ、より一般的なカップリング剤の例である。(Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); 及び Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)を参照のこと)。
10

【0330】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に提供される組成物及び方法の他に、接合された活性化可能抗体はまた、活性化可能抗体配列に挿入されるか、又は他方では、含まれる修飾されたアミノ酸配列を通して、部位特異的接合のために修飾され得る。それらの修飾されたアミノ酸配列は、接合された活性化可能抗体内での接合された剤の制御された置換及び/又は投与を可能にするよう企画される。例えば、活性化可能抗体は、反応性チオール基を提供し、そしてタンパク質の折りたたみ及びアセンブリーに負の影響を与えず、又は抗原結合も変更しない、L及びH鎖上の位置でのシステイン置換を含むよう操作され得る。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、接合のための適切な部位を提供するために、活性化可能抗体体内に1又は2以上の非天然のアミノ酸残基を含むか又は他方では、導入するよう操作され得る。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、その活性化可能抗体配列内に酵素的に活性化可能ペプチド配列を含むか又は他方では、導入するよう操作され得る。
20

【0331】

適切なリンカーは、文献に記載されている。(例えば、MBS(M-マレイイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)の使用を記載する、Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984)を参照のこと)。また、オリゴペプチドリンカーにより抗体にカップリングされる、ハロゲン化されたアセチルヒドラジド誘導体の使用を記載する米国特許第5,030,719号も参照のこと。いくつかの実施形態によれば、適切なリンカーは、次のものを包含する:(i)EDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ-プロピル)カルボジイミド塩酸塩;(ii)SMPt(4-スクシンイミジルオキシカルボニル- - -メチル- - -(2-ピリジル-ジチオ)-トルエン(Pierce Chem. Co., カタログ番号(21558G));(iii)SPDP(スクシンイミジル-6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノエート(Pierce Chem. Co. カタログ番号21651G);(iv)スルホ-LC-SPDP(スルホスクシンイミジル-6-[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]-ヘキサノエート(Pierce Chem. Co. カタログ番号2165-G);及び(v)EDCに接合されるスルホ-NHS(N-ヒドロキシスルホ-スクシンイミドPierce Chem. Co. カタログ番号24510):。追加のリンカーは、SMC、スルホ-SMC、SPDB又はスルホ-SPDBを包含するが、但しそれらだけには限定されない。
30
40

【0332】

上記に記載されるリンカーは、異なった属性を有する成分を含み、従って、異なった物理-化学性質を有する接合体を導く。例えば、アルキルカルボキシレートのスルホ-NHSエステルは、芳香族カルボキシレートのスルホ-NHSエステルよりも、より安定性である。NHS-エステル含有リンカーは、スルホ-NHSエステルよりも低い溶解性である。さらに、リンカー-SMPtは、立体的にヒンダードされたジスルフィド結合を含み、そして高められた安定性を有する接合体を形成することができる。ジスルフィド結合は一般的に、ジスルフィド結合がインビトロで切断され、低い利用可能な接合体をもたらすので、他の結合よりも安定性が低い。特に、スルホ-NHSは、カルボジイミドカップリン
50

グの安定性を増強することができる。カルボジイミドカップリング(例えば、EDC)は、スルホ-NHSと併用して使用される場合、カルボジイミドカップリング反応のみよりも、加水分解に対して、より耐性である。

【0333】

いくつかの実施形態によれば、リンカーは切断可能である。いくつかの実施形態によれば、リンカーは非切断可能である。いくつかの実施形態によれば、複数のリンカーが存在する。それらの複数のリンカーはすべて同じである。例えば切断可能か又は非切断可能であり、又はそれらの複数のリンカーは異なっており、例えば、少なくとも1つは切断可能であり、そして少なくとも1つは非切断可能である。

【0334】

本開示は、次のように、ABに剤を接合するためのいくつかの方法を利用する：(a) ABの炭水化物部分への結合、又は(b) ABのスルフヒドリル基への結合、又は(c) ABのアミノ基への結合、又は(d) ABのカルボキシル基への結合。本開示によれば、ABは、少なくとも2つの反応性基を有する中間リンカーを通して剤に共有結合され得、ここで1つの反応性基はABと反応し、そして1つの基は剤と反応する。任意の適合性有機化合物を含むことができるリンカーは、AB(又は剤)との反応がAB反応性及び選択性に悪影響を及ぼさないよう選択される。さらに、剤へのリンカーの結合は、剤の活性を破壊しない。酸化された抗体又は酸化された抗体フラグメントとの反応のための適切なリンカーは、第1アミン、第2アミン、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、フェニルヒドラジン、セミカルバジド及びチオセミフルバジド基から成る群から選択されたアミンを含むそれらのリンカーである。そのような反応性官能基は、リンカーの構造の一部として存在するか、又はそのような基を含まないリンカーの適切な化学的修飾により導入され得る。

【0335】

本開示によれば、還元されたABへの結合のための適切なリンカーは、還元された抗体又はフラグメントのスルフヒドリル基と反応できる特定の反応性基を有するそれらのリンカーを包含する。そのような反応性基は次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：反応性ハロアルキル基(例えば、ハロアセチル基を包含する)、p-マーキュリー-安息香酸基及びマイケル型付加反応ができる基(例えば、マレイミド、及びMitra and Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110により記載されるタイプの基を包含する)。

【0336】

本開示によれば、酸化も又は還元もされていないABへの結合のための適切なリンカーは、ABにおける修飾されていないリシン残基に存在する第1アミンと反応することができる特定の官能基を有するそれらのリンカーである。そのような反応性基は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：NHSカルボン酸又は炭酸エステル、スルホ-NHSカルボン酸又は炭酸エ斯特ル、4-ニトロフェニルカルボン酸又は炭酸エ斯特ル、ペンクフルオロフェニルカルボン酸又は炭酸エ斯特ル、アシリイミダゾール、イソシアネート及びインチオシアネート。

【0337】

本開示によれば、酸化も、還元もされていないABへの結合のための適切なリンカーは、適切な試薬により活性化された、ABにおけるアスパラギン酸又はグルタミン酸残基に存在するカルボン酸基と反応することができる特定の官能基を有するそれらのリンカーを包含する。適切な活性化試薬は、付加されたNHS又はスルホ-NHSを有するか又は有さないEDC、及びカルボキサミド形成のために利用される他の脱水剤を包含する。それらの場合、適切なリンカーに存在する官能基は、第1及び第2アミン、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン及びヒドラジドを包含する。

【0338】

剤は、リンカーがABに結合される前又は後、リンカーに結合され得る。特定の用途によれば、リンカーが関連する剤を有さないAb-リンカー中間体を、最初に生成すること

10

20

30

40

50

が所望される。特定の用途に依存して、特定の剤がリンカーに共有結合され得る。他の実施形態によれば、A B が、M M、C M 及び関連するリンカーに、まず結合され、そして次に、接合目的のためにリンカーに結合される。

【0339】

分枝状リンカー：特定の実施形態によれば、剤の結合のための複数の部位を有する分枝状リンカーが使用される。複数部位リンカーに関しては、A Bへの単一の共有結合が、多数の部位で剤を結合できる A B - リンカー中間体をもたらす。前記部位は、アルデヒド又はスルフヒドリル基であり得るか、又は剤が結合され得る任意の化学部位であり得る。

【0340】

いくつかの実施形態によれば、より高い比活性（又はA Bに対する剤の高い比率）が、10A B 上の複数の部位での単一の部位リンカーの結合により達成され得る。この複数の部位は、2種の方法の何れかにより A B 中に導入され得る。最初に、1つの方法は、同じ A B に複数のアルデヒド基及び/又はスルフヒドリル基を生成することができる。第2に、1つの方法は、リンカーへの続く結合のために複数の官能部位を有する「分枝状リンカー」を、A B のアルデヒド又はスルフヒドリルに結合することができる。分枝状リンカー又は複数部位リンカーの官能部位は、アルデヒド又はスルフヒドリル基であり得るか、又はリンカーが結合され得る任意の化学部位であり得る。さらに高い比活性がそれらの2種のアプローチを組合すことにより、すなわち A B 上のいくつかの部位で複数部位リンカーを結合することにより得られる。

【0341】

切断可能リンカー：補体系の酵素、例えばウロキナーゼ、組織プラスミノーゲン活性化因子、トリプシン、プラスミン、又はタンパク質分解活性を有する別の酵素（但し、それだけには限定されない）による切断に対して敏感であるペプチドリンカーが、本開示の1つの実施形態に使用され得る。本開示の1つの方法によれば、剤が補体による切断に敏感なリンカーを介して結合される。抗体は、補体を活性化できる種類から選択される。従って、抗体 - 剤接合体は、補体力スケードを活性化し、そして標的部位で剤を開放する。本開示の別の方法によれば、剤は、タンパク質分解活性を有する酵素、例えばウロキナーゼ、組織プラスミノーゲン、活性化因子、プラスミン又はトリプシンによる切断に対して敏感なリンカーを介して結合される。それらの切断可能リンカーは、細胞外毒素、例えば非制限的例によれば、表3に示される細胞外毒性の何れかを含む、接合された活性化可能抗体において有用である。20

【0342】

切断可能リンカー配列の非制限的剤が、表4に提供される。

【0343】

30

30

【表27】

表4：接合のための典型的なリンカー配列

切断可能配列のタイプ	アミノ酸	
<u>プラスミン</u> 切断可能配列		
プローウロキナーゼ	P R F K I I G G (配列番号 127)	
TGF β	P R F R I I G G (配列番号 128)	
プラスミノーゲン	S S R H R R A L D (配列番号 129)	
スタフィロキナーゼ	R K S S I I I R M R D V V L (配列番号 130)	10
	S S S F D K G K Y K K G D D A (配列番号 131)	
	S S S F D K G K Y K R G D D A (配列番号 132)	
<u>Xa因子</u> 切断可能配列		
	I E G R (配列番号 133)	
	I D G R (配列番号 134)	
	G G S I D G R (配列番号 135)	
<u>MMP</u> 切断可能配列		
ゼラチナーゼA	P L G L W A (配列番号 136)	
<u>コラゲナーゼ</u> 切断可能配列		
ウシ皮膚コラーゲン(α 1(I)鎖)	G P Q G I A G Q (配列番号 137)	20
ウシ皮膚コラーゲン(α 2(I)鎖)	G P Q G L L G A (配列番号 138)	
ウシ軟骨コラーゲン(α 1(II)鎖)	G I A G Q (配列番号 139)	
ヒト肝臓コラーゲン(α 1(III)鎖)	G P L G I A G I (配列番号 140)	
ヒト α_2 M	G P E G L R V G (配列番号 141)	
ヒト PZP	Y G A G L G V V (配列番号 142)	
	A G L G V V E R (配列番号 143)	
	A G L G I S S T (配列番号 144)	
ラット α_1 M	E P Q A L A M S (配列番号 145)	
ラット α_2 M	Q A L A M S A I (配列番号 146)	30
ラット α_1 I ₃ (2J)	A A Y H L V S Q (配列番号 147)	
ラット α_1 I ₃ (27J)	M D A F L E S S (配列番号 148)	
ヒト線維芽細胞コラゲナーゼ <u>(自己分解切断)</u>	E S L P V V A V (配列番号 149)	
	S A P A V E S E (配列番号 150)	
	D V A Q F V L T (配列番号 151)	
	V A Q F V L T E (配列番号 152)	
	A Q F V L T E G (配列番号 153)	
	P V Q P I G P Q (配列番号 154)	

【0344】

さらに、剤は、ジスルフィド接合（例えば、システイン残基上のジスルフィド結合）を介してA Bに結合され得る。多くの腫瘍は天然において、高レベルのグルタチオン（還元剤）を放出するので、これがジスルフィド結合を還元し、送達の部位での剤の続く放出を引起す。特定の実施形態によれば、C Mを修飾する還元剤はまた、接合された活性化可能抗体のリンカーを修飾するであろう。

【0345】

スペーサー及び切断可能要素：さらに別の実施形態によれば、剤と、活性可能抗体のA Bとの間の空間を最適化するような手段でリンカーを構成する必要がある。これは、下記一般構造のリンカーの使用により達成され得る：

【0346】

【化66】

$W - (CH_2)_n - Q$

【0347】

ここで、Wは、-N-CH₂-又は-CH₂-のいずれかであり；Qは、アミノ酸、ペプチドであり；そしてnは、0-20の整数である。

【0348】

いくつかの実施形態によれば、リンカーはスペーサー要素及び切断可能要素を含むことができる。スペーサー要素は、切断可能要素が切断を担当する酵素により接近できるようABのコアーから離れて、切断可能要素を位置決定するよう作用する。上記に記載される特定の分枝リンカーが、スペーサー要素として作用することができる。

【0349】

この議論を通して、剤へのリンカーの結合（又は切断可能要素へのスペーサー要素の、又は剤への切断可能要素の結合）は、結合又は反応の特定のモードである必要はないことが理解されるべきである。適切な安定性及び生物学的適合性の生成物を提供する任意の反応が許容できる。

【0350】

血清補体及びリンカーの選択：本開示の1つの方法によれば、剤の放出が所望される場合、補体を活性化できる種類の抗体であるABが使用される。その得られる接合体は、抗原を接合し、そしてカスケードを活性化する両能力を保持する。従って、本開示のこの実施形態によれば、剤は、切断可能リンカー又は切断可能要素の一端に連結され、そしてリンカー基の他端がAB上の特異的部位に結合される。例えば、剤がヒドロキシ基又はアミノ基を有する場合、それは、ペプチド、アミノ酸又は他の適切に選択されたリンカーのカルボキシ末端に、それぞれ、エステル又はアミド結合を介して結合され得る。例えば、そのような剤は、カルボジイミド反応を介してリンカーペプチドに結合され得る。剤が、リンカーへの結合を妨げる官能基を含む場合、それらの妨害官能基は、結合の前、ブロックされ、そして生成物の接合体又は中間体が製造されるとすぐに、脱ブロックされる。次に、リンカーの反対又はアミノ末端が、直接、又は補体を活性化できるABへの結合のために、さらなる修飾の後、使用される。

【0351】

リンカー（又はリンカーのスペーサー要素）は何れかの所望する長さのものであり、その一端は、活性化可能抗体のAB上の特異的部位に共有結合される。リンカー又はスペーサー要素の他の末端は、アミノ酸又はペプチドリンカーに結合され得る。

【0352】

従って、それらの接合体が補体の存在下で抗原に結合する場合、剤をリンカーに結合するアミド又はエステル結合が切断され、その活性形での剤の放出がもたらされる。それらの接合体は、対象に投与される場合、標的部位での剤の送達又は放出を達成し、そして表3のそれら（但し、それらに制限されない）に提示されるように、薬剤、抗生物質、代謝拮抗剤、抗増殖剤及び同様のもののインピボ送達のために特に効果的である。

【0353】

補体活性化なしでの放出のためのリンカー：標的化された送達のさらなる別の用途によれば、補体活性化なしでの剤の放出は、補体カスケードの活性化が最終的には、標的細胞を溶解するので、所望される。従って、このアプローチは、剤の送達及び放出が標的細胞を死滅しないで、達成されるべきである場合、有用である。細胞メディエーター、例えばホルモン、酵素、コルチコステロイド、神経伝達物質、遺伝子又は酵素の標的細胞への送達が所望される場合、そのようなことが目的である。それらの接合体は、血清プロテアーゼによる切断に対して軽度に敏感であるリンカーを介して、補体を活性化できないABに

10

20

30

40

50

剤を結合することにより調製され得る。この接合体が個人に投与される場合、抗原 - 抗体補体がすばやく形成するが、ところが剤の切断はゆっくり生じ、従って、標的部位での化合物の放出がもたらされる。

【 0 3 5 4 】

生化学架橋剤：他の実施形態によれば、活性化可能抗体は、特定の生化学的架橋剤を用いて、1又は2以上の治療剤に接合され得る。架橋試薬は、2種の異なった分子の官能基を一緒に結合する分子橋を形成する。段階的に2つの異なったタンパク質を連結するためには、所望しないホモポリマー形成を排除するヘテロ - 二官能性架橋剤が使用され得る。

【 0 3 5 5 】

リソソームプロテアーゼにより切断可能なペプチジルリンカー、例えばV a l - C i t¹⁰、V a l - A l a 又は他のジペプチドがまた有用である。さらに、リソソームの低pH環境下で切断可能な酸 - 不安定性リンカー、例えばビス - シアリルエーテルが使用され得る。他の適切なリンカーは、カテプシン - 不安定性基質、特に酸性pHで最適な機能を示すそれらを包含する。

【 0 3 5 6 】

典型的なヘテロ - 二官能性架橋剤が表5に参照される。

【 0 3 5 7 】

【表28】

表5：典型的なヘテロ二官能性架橋剤

ヘテロ二官能性架橋剤				
リンカー	に対して反応性	利点及び用途	架橋結合後のスペーサーアームの長さ(Å)	
SMPT	第一アミン スルフヒドリル	高い安定性	11.2 Å	10
SPDP	第一アミン スルフヒドリル	チオール化 切断可能な架橋	6.8 Å	
LC-SPDP	第一アミン スルフヒドリル	拡張スペーサーアーム	15.6 Å	
スルホ-LC-SPDP	第一アミン スルフヒドリル	エキステンダースペーサーアーム 水溶性	15.6 Å	
SMCC	第一アミン スルフヒドリル	安定したマレイミド反応基 酵素 - 抗体接合	11.6 Å	
スルホ-SMCC	第一アミン スルフヒドリル	ハプテン - キャリアタンパク質接合 安定したマレイミド反応基 水溶性	11.6 Å	20
MBS	第一アミン スルフヒドリル	酵素 - 抗体接合 酵素 - 抗体接合	9.9 Å	
スルホ-MBS	第一アミン スルフヒドリル	ハプテン - キャリアタンパク質接合 水溶性	9.9 Å	
SIAB	第一アミン スルフヒドリル	酵素 - 抗体接合	10.6 Å	
スルホ-SIAB	第一アミン スルフヒドリル	水溶性	10.6 Å	
SMPB	第一アミン スルフヒドリル	拡張スペーサーアーム 酵素 - 抗体接合	14.5 Å	30
スルホ-SMPB	第一アミン スルフヒドリル	拡張スペーサーアーム 水溶性	14.5 Å	
EDE/スルホ-NHS	第一アミン カルボキシル基	ハプテン - キャリア接合	0	
ABH	炭水化物 非選択性	糖基と反応する	11.9 Å	

【0358】

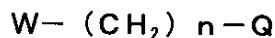
非切斷可能リンカー又は直接的結合：本開示のさらに他の実施形態によれば、接合体は、剤が標的に送達されるが、しかし放出されないよう企画され得る。これは、A Bに剤を、直接的に又は非切斷可能リンカーを介して結合することにより達成され得る。

【0359】

それらの非切斷リンカーは、続いて、本明細書に記載される方法により A Bへの結合に利用され得る官能基を含むよう修飾され得る、アミノ酸、ペプチド、D - アミノ酸又は他の有機化合物を含むことができる。そのような有機リンカーのための一般式は、下記式であり得る：

【0360】

【化67】



【0361】

ここで、Wは、-N-CH₂-又は-CH₂-のいずれかであり；Qは、アミノ酸、ペプチドであり；そしてnは、0-20の整数である。

【0362】

非切断可能接合体：いくつかの実施形態によれば、化合物は、補体を活性化できないA Bに結合され得る。補体活性化することができないA Bを用いる場合、この結合は、活性化された補体による切断に敏感であるリンカーを用いて、又は活性化された補体による切断に敏感ではないリリンカーを用いて、達成され得る。

10

【0363】

本明細書に開示される抗体はまた、免疫リポソームとして製剤化され得る。抗体を含むリポソームは、当業界において知られている方法、例えばEpstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び米国特許第4,544,545号に記載される方法により調製される。向上された循環時間を有するリポソームが、米国特許第5,013,556号に開示されている。

20

【0364】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及びPEG-誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いて、逆相蒸発方法により生成され得る。リポソームは、所望する直径を有するリポソームを生成するために、定義された孔サイズのフィルターを通して押出される。本開示の抗体のFabフラグメントは、ジスルフィド-交換反応を介して、Martin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982)に記載されるリポソームに結合され得る。

【0365】

定義

特にことわらない限り、本開示に関連して使用される科学技術用語は、当業者により通常、理解される意味を有するであろう。用語「a」実体又は「an」実体とは、1又は2以上のその実体を意味する。たとえば、1つの化合物とは、1又は2以上の化合物を言及する。従って、用語「a」、「an」、「1又は2以上(one or more)」及び「少なくとも1つ(at least one)」とは、交換可能的に使用され得る。さらに、文脈により必要とされない限り、単数形の用語は、複数形も含み、そして複数形の用語は単数形も含むであろう。一般的に、本明細書に記載される細胞及び組織培養、分子生物学、及びタンパク質及びオリゴ-又はポリヌクレオチド化学及びハイブリダイゼーションに関連して及びそれらの技法に関連して使用される命名法は、当業界において良く知られており、そして通常使用されるものである。組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、及び組織培養及び形質転換(例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション)に関しては、標準技法が使用される。酵素反応及び精製技法は、製造業者の仕様に従って、又は当核技術分野において通常に達成されるようにして、又は本明細書に記載されるようにして、実施される。前述の技法及び手順は、一般的に、当業界において良く知られている従来の技法に従って、及び本明細書を通して引用され、そして議論される種々の一般的な及びより具体的な参考文献に記載されるようにして実施される。例えば、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))を参照のこと。本明細書に記載される、分析化学、合成有機化学、及び医薬品及び製薬化学に関連して使用される命名法、及びそれらの実験手順及び技法は、良く知られており、そして一般的に当業界において使用される。化学合成、化学分析

30

40

50

、医薬製剤、製剤化及び送達、及び患者の治療についての標準技法が用いられる。

【0366】

本開示に従って使用される場合、次の用語は、特にことわらない限り、次の意味を有することが理解されるであろう。

【0367】

本明細書において使用される場合、用語「抗体（antibody）」とは、免疫グロブリン分子、及び免疫グロブリン（Ig）分子の免疫学的活性部分、すなわち抗原を特異的に結合する（抗原と免疫反応する）抗原結合部位を含む分子を意味する。「特異的に結合する（specifically bind）」又は「～と免疫反応する（immunoreacts with）」、又は「免疫特異的に結合する（immunospecifically bind）」とは、抗体が所望の抗原の1又は2以上の抗原決定基と反応し、そして他のポリペプチドとは反応しないか、又はより低い親和性（ $K_d > 10^{-6}$ ）で結合することを意味する。抗体とは、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、ドメイン抗体、一本鎖、Fab及びF(ab)₂フラグメント、scFv及びFab発現ライブラリーを包含するが、但しそれらだけには限定されない。10

【0368】

基本的抗体構造単位は、テトラマーを含むことが知られている。各テトラマーは、2つの同一対のポリペプチド鎖から構成され、各対は1つの「L鎖」（約25kDa）及び1つの「H鎖」（約50-70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識を主に担当する約100-110又はそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシル末端部分は、エフェクター機能を主に担当する不变領域を定義する。一般的に、ヒトから得られる抗体分子は、クラスIgG、IgM、IgA、IgE及びIgDのいずれかに関し、それらは分子に存在するH鎖の性質によりお互い異なる。特定のクラスは、サブクラス、例えばIgG₁、IgG₂、及び他のものを有する。さらに、ヒトにおいては、L鎖は、鎖又は鎖であり得る。20

【0369】

用語「モノクローナル抗体（monoclonal antibody）」（mAb）又は「モノクローナル抗体組成物（monoclonal antibody composition）」とは、本明細書において使用される場合、ユニークL鎖遺伝子生成物及びユニークH鎖遺伝子生成物から成る抗体分子の1つの分子種のみを含み抗体分子集団を言及する。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域（CDR）は、前記集団の分子全てにおいて同一である。Mabは、それに対するユニーク結合親和性により特徴づけられる抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位を含む。30

【0370】

用語「抗原-結合部位（antigen-binding site）」又は「結合部分（binding portion）」とは、抗原結合に関する免疫グロブリン分子の一部を言及する。抗原結合部位は、H鎖（H）及びL鎖（L）のN-末端可変（V）領域のアミノ酸残基により形成される。「超可変領域（hypervariable regions）」として言及される、H及びL鎖のV領域内の3つの高度に分岐したストレッチが、「骨格領域（framework regions）」又はFRとして知られている、より保存されたフランкиングストレッチ間に介在する。従って、用語「FR」とは、免疫グロブリンにおける超可変領域間に天然において見出され、そしてその領域に隣接して存在するアミノ酸配列を言及する。抗体分子においては、L鎖の3つの超可変領域及びH鎖の3つの超可変領域が、抗原-結合表面を形成するために、立体空間でお互いに対し配置される。抗原結合表面は、結合される抗原の立体表面に相補的であり、そしてH鎖及びL鎖の個々の3つの超可変領域は、「相補性-決定領域（Complementarity-determining regions）」又は「CDR」として言及される。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))又はChothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989)の定義に従う。40

【0371】

本明細書において使用される場合、用語「エピトープ（epitope）」は、免疫グロブリ50

ン、*s c F v* 又は *T* - 細胞受容体に対して特異的結合できる任意のタンパク質決定因子を包含する。用語「エピトープ」は、免疫グロブリン又は *T* - 細胞受容体に対して特異的結合できる任意のタンパク質決定因子を包含する。エピトープ決定因子は通常、分子、例えばアミノ酸又は糖側鎖の化学的活性表面基から成り、そして通常、特異的立体構造特性、及び特異的電荷特性を有する。例えば、抗体は、ポリペプチドの *N* - 末端又は *C* - 末端ペプチドに対して高められる。抗体は、解離定数が $1 \mu M$ である場合、例えば、いくつかの実施形態によれば、 $100 nM$ 、及びいくつかの実施形態によれば、 $10 nM$ である場合、抗原を特異的に結合すると言われる。

【0372】

本明細書において使用される場合、用語「特異的結合 (specific binding)」、「免疫学的結合 (immunological binding)」及び「免疫学的結合性質 (immunological binding properties)」とは、免疫グロブリン分子と、免疫グロブリンが特異的である抗原との間で生じるタイプの非共有相互作用を言及する。免疫学的結合相互作用の強度又は親和性は、相互作用の解離定数 (K_d) で表され得、ここでより小さな K_d がより高い親和性を表す。選択されたポリペプチドの免疫学的結合性質は、当業界において良く知られている方法を用いて定量化され得る。1つのそのような方法は、抗原結合部位 / 抗原複合体形成及び解離の速度の測定を必要とし、ここでそれらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性及び両方向にその速度に等しく影響を及ぼす幾何学的パラメーターに依存する。従って、「オン速度定数 (on rate constant)」 (K_{on}) 及び「オフ速度定数 (off rate constant)」 (K_{off}) の両者は、濃度、及び会合及び解離の実際の速度の計算により決定され得る。*(Nature 361:186-87 (1993) を参照のこと)*。 K_{off} / K_{on} の比率は、親和性に関係しないすべてのパラメーターの取り消しを可能にし、そして解離定数 K_d に等しい。*(一般的に、Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473 を参照のこと)*。本開示の抗体は、当業者に知られているアッセイ、例えば放射性リガンド結合アッセイ又は類似するアッセイにより測定される場合、平衡結合定数 (K_d) が、 $1 \mu M$ 、例えば、いくつかの実施形態によれば、 $100 nM$ 、いくつかの実施形態によれば、 $10 nM$ 、及びいくつかの実施形態によれば、 $100 pM$ - 約 $1 pM$ である場合、EGFR に対して特異的に結合すると言われる。

【0373】

用語「単離されたポリヌクレオチド (isolated polynucleotide)」とは、本明細書において使用される場合、ゲノム、cDNA 又は合成起源、又はそれらのいくつかの組合せのポリヌクレオチドを意味し、その起源により、「単離されたポリヌクレオチド」は、(1) 「単離されたポリヌクレオチド」が天然で見出される、ポリヌクレオチドのすべて又は一部に関連せず、(2) それが天然において連結されないポリヌクレオチドに操作可能な連結されるか、又は(3) 大きな配列の一部として、天然において存在しない。本開示のポリヌクレオチドは、本明細書に示される H鎖免疫グロブリン分子をコードする核酸分子、及び本明細書に示される L鎖免疫グロブリン分子をコードする核酸分子を含む。

【0374】

本明細書において言及される用語「単離されたタンパク質 (isolated protein)」とは、cDNA、組換えRNA、又は合成起源又はそれらのいくつかの組合せのタンパク質を意味し、その起源又は誘導源により、「単離されたタンパク質」は、(1) 天然において見出されるタンパク質とは関連せず、(2) 同じ源からの他のタンパク質、例えばネズミタンパク質を有さず、(3) 異なった種からの細胞により発現されるか、又は(4) 天然において存在しない。

【0375】

用語「ポリペプチド (polypeptide)」とは、天然タンパク質フラグメント又はポリペプチドの配列の類似体を言及するための遺伝子用語として、本明細書において使用される。従って、天然タンパク質フラグメント及び類似体は、ポリペプチド属の種である。本開示のポリペプチドは、本明細書に示される H鎖免疫グロブリン分子、及び本明細書に示される L鎖免疫グロブリン分子、並びに、L鎖免疫グロブリン分子、例えばカッパ L鎖免疫

10

20

30

40

50

グロブリンと共に、H鎖免疫グロブリン分子を含む組合せにより形成される抗体分子を含み、そして逆もまた同様に、及びそれらのフラグメント及び類似体も含む。

【0376】

本明細書において使用される、用語「天然に存在する (naturally-occurring)」とは、目的に適用される場合、目的が天然において見出され得る事実を意味する。例えば、天然源から単離され得る生物（ウィルスを含む）に存在し、そして実験室においてヒトにより意図的に修飾されておらず、又は他方では、天然に存在するポリペプチド又はポリヌクレオチド配列を挙げることができる。

【0377】

用語「操作可能的に連結される (operably linked)」とは、本明細書において使用される場合、そのように記載される成分の位置が、それらの意図される様式で機能することを可能にする関係にあることを意味する。コード配列に「操作可能的に連結される」制御配列は、そのコード配列の発現が制御配列と適合できる条件下で達成されるような手段で連結される。

10

【0378】

用語「制御配列 (control sequence)」とは、本明細書において使用される場合、連結されるコード配列の発現及びプロセッシングに影響を及ぼすのに必要であるポリヌクレオチド配列を意味する。そのような制御配列の性質は、原核生物における宿主生物に依存して異なり、そのような制御配列は一般的に、真核生物では、プロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結配列を含み、一般的に、そのような制御配列はプロモーター及び転写終結配列を含む。用語「制御配列」は、その存在が発現及びプロセッシングのために必須であるすべての成分を、少なくとも含むよう意図され、そしてまた、その存在が好都合である追加の成分、例えばリーダー配列及び融合パートナー配列を含むことができる。用語「ポリヌクレオチド (polynucleotide)」とは、本明細書において使用される場合、少なくとも10個の長さの塩基のヌクレオチド、リボヌクレオチド又はデオキシヌクレオチド、又は何れかのタイプのヌクレオチドの修飾形を意味する。この用語は、単鎖及び二本鎖形のDNAを包含する。

20

【0379】

本明細書において言及される用語、ポリヌクレオチドは、天然に存在し、そして天然に存在しないオリゴヌクレオチド結合により一緒に連結される、天然に存在し、そして修飾されたヌクレオチドを包含する。オリゴヌクレオチドは、200個又はそれよりも少ない長さの塩基を一般的に含むポリヌクレオチドポリヌクレオチドサブセットである。いくつかの実施形態によれば、オリゴヌクレオチドは、10 - 60個の長さの塩基、及び、いくつかの実施形態によれば、12、13、14、15、16、17、18、19又は20 - 40個の長さの塩基である。オリゴヌクレオチドは通常、プローブについては一本鎖であるが、但しオリゴヌクレオチドは、遺伝子変異体の構成への使用に関しては、二本鎖であり得る。本開示のオリゴヌクレオチドは、センス又はアンチセンスの何れかのオリゴヌクレオチドである。

30

【0380】

本明細書において言及される用語「天然に存在するヌクレオチド (naturally occurring nucleotides)」は、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを包含する。本明細書において言及される用語「修飾されたヌクレオチド (modified nucleotides)」は、修飾されたか又は置換された糖基等を有するヌクレオチドを含む。本明細書において言及される用語「オリゴヌクレオチド結合 (oligonucleotide linkages)」は、オリゴヌクレオチド結合、例えばホスホロチオエート、ホスホジチオエート、ホスホセレノエート、ホスホジセレノエート、ホスホアニロチオエート、ホスホラニラデート、ホスホンミデート及び同様のものを包含する。例えば、LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al. Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Ec

40

50

kstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. U.S. Patent No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990)を参照のこと。オリゴヌクレオチドは、所望には、検出のための標識を含むことができる。

【0381】

本明細書において使用される場合、20種の従来のアミノ酸及びそれらの略語は、慣用的用法に従う。Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland Mass. (1991))を参照のこと。20種の従来のアミノ酸、非天然アミノ酸、例えば - 置換されたアミノ酸、N - アルキルアミノ酸、乳酸及び他の非従来型アミノ酸の立体異性体(例えば、D - アミノ酸)もまた、本開示のポリペプチドのための適切な成分であり得る。非従来型アミノ酸の例は、次のものを包含する : 4 - ヒドロキシプロリン、 - カルボキシグルタミン酸、 - N、N、N、N - トリメチルリジン、 - N - アセチルリジン、O - ホスホセリン、N - アセチルセリン、N - ホルミルメチオニン、3 - メチルヒスチジン、5 - ヒドロキシリジン、 - N - メチルアルギニン及び他の類似するアミノ酸、及びイミノ酸(例えば、4 - ヒドロキシプロリン)。本明細書において使用されるポリペプチド表記においては標準の使用法及び慣習によれば、左方向はアミノ末端方向であり、そして右方向はカルボキシ末端方向である。

【0382】

同様に、特にことわらない限り、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左側端は、5末端であり、そして二本鎖ポリヌクレオチド配列の左側方向は、5方向として言及される。新生RNA転写体の5から3への付加の方向は、RNAと同じ配列を有するDNA鎖との転写方向配列と称され、そしてRNA転写体の5から5末端への方向は、「上流配列(upstream sequences)」、すなわちRNAと同じ配列を有するDNA鎖上の配列領域と称され、そしてRNA転写体の3から3末端への方向は、「下流配列(downstream sequences)」と称される。

【0383】

ポリペプチドに適用される場合、用語「実質的な同一性(substantial identity)」とは、2種のペプチド配列が、デフォルトギャップウェイト(default gap weights)を用いてプログラムGAP又はBESTFITにより最適に整列される場合、少なくとも80%の配列同一性、例えば、いくつかの実施形態によれば、少なくとも90%の配列同一性、いくつかの実施形態によれば、少なくとも95%の配列同一性、及びいくつかの実施形態によれば、少なくとも99%の配列同一性を共有することを意味する。

【0384】

いくつかの実施形態によれば、同一でない残基位置は、保存性アミノ酸置換により異なる。

【0385】

本明細書において論じられる場合、抗体又は免疫グロブリン分子のアミノ酸配列における小さな変動が、本開示により包含されるよう意図され、但しアミノ酸配列における変動が少なくとも75%、例えば、いくつかの実施形態によれば、少なくとも80%、90%、95%、及びいくつかの実施形態によれば、99%、維持されるべきである。特に、保存性アミノ酸置換が意図される。保存性置換は、それらの側鎖に関連するアミノ酸ファミリー内で生じるものである。遺伝子的にコードされるアミノ酸は一般的に、次のファミリーに分けられる：(1)酸性アミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸であり；(2)塩基性アミノ酸は、リシン、アルギニンヒスチジンであり；(3)非極性アミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンであり；そして(4)非荷電極性アミノ酸は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシンである。親水性アミノ酸は、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、リシン、セリン及びトレオニンを包含する。疎水性アミノ酸は、アラニン、システイン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン及びバリンを包含する。アミノ酸の他のファミリーは、次のものを包含する：(i

10

20

30

40

50

) 脂肪族 - ヒドロキシファミリーである、セリン及びトレオニン；(ii) アミド含有ファミリーである、アスパラギン及びグルタミン；(iii) 脂肪族ファミリーである、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；及び(iv) 芳香族ファミリーである、フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン、例えば、イソロイシン又はバリンによるロイシンの単離された置換、グルタミン酸によるアスパラギン酸、セリンによるトレオニン、又は構造的に関連するアミノ酸によるアミノ酸の類似する置換が、特に、その置換が骨格部位内にアミノ酸を含まない場合、その得られる分子の結合又は性質に対して主要な影響を与えないであろうことを予測するのは合理的である。アミノ酸変化が機能的ペプチドをもたらすかどうかは、ポリペプチド誘導体の比活性をアッセイすることにより、容易に決定され得る。アッセイは、本明細書において詳細に記載されている。抗体又は免疫グロブリン分子のフラグメント又は類似体は、当業者により容易に調製され得る。フラグメント又は類似体の適切なアミノ - 及びカルボキシ - 末端は、機能的ドメインの境界近くに存在する。構造及び機能ドメインは、公的又は独自の配列データベースに、ヌクレオチド及び / 又はアミノ酸配列を比較することにより、同定され得る。いくつかの実施形態によれば、コンピューター化された比較方法が、既知構造及び / 又は機能の他のタンパク質に存在する配列モチーフ又は予測されるタンパク質立体構造ドメインを同定するために使用され得る。既知の三次元構造に折りたたむタンパク質を同定する方法は知られている (Bowie et al. Science 253:164 (1991))。従って、前述の例は、当業者が本開示に従って構造的及び機能的ドメインを定義するために使用され得る配列モチーフ及び構造コンホメーションを認識できることを示す。

10

20

【0386】

適切なアミノ酸置換は、(1) タンパク質分解に対する感受性を低め、(2) 酸化に対する感受性を低め、(3) タンパク質複合体を形成するために結合親和性を変更し、(4) 結合親和性を変更し、そして(5) そのような類似体の他の物理化学的マタハ機能的性質を付与するか、又は修飾するそれらの置換である。類似体は、天然に存在するペプチド配列以外の配列の種々のムテインを含むことができる。例えば、单一又は複数のアミノ酸置換（例えば、保存性アミノ酸置換）が、天然に存在する配列において（分子間接触を形成するドメイン外のポリペプチドの部分において）、行われ得る。保存性アミノ酸置換は、親配列の構造特性を実質的に変えるべきではない（例えば、アミノ酸置換は、親配列に存在するヘリックスを破壊するか又は親配列を特徴づける他のタイプの二次構造を分裂する傾向があるべきではない）。当技術分野で認識されるポリペプチドの二次及び三次構造の例は、タンパク質、構造及び分子の原則 (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984))；タンパク質構造の紹介 (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991))；及び Thornton et al. Nature 354:105 (1991) に記載されている。

30

【0387】

用語「ポリペプチドフラグメント (polypeptide fragment)」とは、本明細書において使用される場合、アミノ末端及び / 又はカルボキシ末端欠失及び / 又は 1 又は 2 以上の内部欠失を有するが、しかし残るアミノ酸配列が、例えば完全な長さの cDNA 配列から推定される天然に存在する配列におけるその対応する位置と同一である、ポリペプチドを意味する。フラグメントは典型的には、少なくとも 5、6、8 又は 10 個の長さのアミノ酸、例えば、いくつかの実施形態によれば、少なくとも 14 個の長さのアミノ酸、いくつかの実施形態によれば、少なくとも 20 個の長さのアミノ酸、通常、少なくとも 50 個の長さのアミノ酸、及びいくつかの実施形態によれば、70 個の長さのアミノ酸である。用語「類似体 (analog)」とは、本明細書において使用される場合、推定されるアミノ酸配列の一部に対して実質的な同一性を有し、そして適切な結合条件下で標的に対する特異的結合を有する、少なくとも 25 個のアミノ酸のセグメントから構成されるポリペプチドを意味する。典型的には、ポリペプチド類似体は、天然に存在する配列に対して保存性アミノ酸置換（又は付加又は欠失）を含む。類似体は、典型的には、少なくとも 20 個の長さのアミノ酸、例えば、いくつかの実施形態によれば、少なくとも 50 個又はそれ以上の長さ

40

50

のアミノ酸であり、そしてしばしば、完全な長さの天然に存在するポリペプチドと同じ長さであり得る。

【0388】

用語「剤 (agent)」は、化合物、化合物の混合物、生体高分子、又は生体材料から製造される抽出物を示すために、本明細書において使用される。

【0389】

本明細書において使用される場合、用語「標識 (label)」又は「標識された (labeled)」とは、例えば放射性標識されたアミノ酸の組込み、又はマーキングされたアビジン（例えば、光学的又は比色法により検出され得る蛍光マーカー又は酵素活性を含むストレプタビジン）により検出され得るビオチニル部分のポリペプチドへの結合による、検出可能マーカーの組込みを意味する。ポリペプチド及び糖タンパク質を標識する種々の方法が当業界において知られており、そして使用され得る。ポリペプチドのための標識の例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：放射性同位体又は放射性核種（例えば、³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I）、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光、ビオチニル基、二次レポーターにより認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体のための結合部位、金属結合ドメイン、エピトープ標識）。いくつかの実施形態によれば、標識は、潜在的な立体障害を低めるために、種々の長さのスペーサーアームにより結合される。用語「薬剤又は薬物 (pharmaceutical agent or drug)」とは、本明細書において使用される場合、患者に正しく投与される場合、所望の治療効果を誘発できる化合物又は組成物を意味する。10

【0390】

本明細書における他の化学用語は、The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))により例示されるように、当業界における従来の用法に従って使用される。

【0391】

本明細書において使用される場合、「実質的に純粋な (substantially pure)」とは、目的種が存在する主要種であり（すなわち、モル基準で、組成物中のいずれか他の個々の種よりも豊富である）、そしていくつかの実施形態によれば、実質的に精製された画分が組成物であり、ここで、目的種が存在するすべての高分子種の少なくとも約 50%（モル基準で）を占めることを意味する。30

【0392】

一般的に、実質的に純粋な組成物は、組成物の存在するすべての高分子種の約 80% 以上、いくつかの実施形態によれば、約 85%、90%、95% 及び 99% 以上を占めるであろう。いくつかの実施形態によれば、目的種は、本質的に均質に精製され（組成物中の汚染種は、従来の検出法によっては検出され得ない）、ここで組成物は単一の高分子種から本質的に成る。

【0393】

用語「患者 (patient)」とは、ヒト及び獣医学的対象を含む。

40

【0394】

本開示の活性化可能抗体は、所定の標的、例えばヒト標的タンパク質を、特異的に結合する。本明細書に記載される活性化可能抗体と同じエピトープに結合する活性化可能抗体もまた、本開示に結合される。

【0395】

当業者は、モノクローナル抗体（例えば、ネズミモノクローナル又はヒト化抗体）が、前者が後者の標的への結合を妨げるかどうかを確かめることにより、本明細書に記載される方法に使用されるモノクローナル抗体と同じ特異性を有するかどうかを、過度の実験を行わないで、決定することが可能であることを認識するであろう。試験されるモノクローナル抗体が、本開示のモノクローナル抗体による結合の低下により示されるように、本開50

示のモノクローナル抗体と競争する場合、それらの2種のモノクローナル抗体は、同じか又は密接に関連するエピトープに結合する。モノクローナル抗体が本開示のモノクローナル抗体の特異性を有するかどうかを決定するための方法は、標的と共に、本開示のモノクローナル抗体とをプレインキュベートし、そして次に、試験されるモノクローナル抗体を添加し、試験されるモノクローナル抗体が標的を結合するその能力を阻害するかどうかを決定することである。試験されるモノクローナル抗体が阻害される場合、ほぼ確実に、それは本開示のモノクローナル抗体と同じか、又は機能的に同等のエピトープ特異性を有する。

【0396】

多重特異的活性化可能抗体

10

本開示はまた、多重特異的活性化可能抗体を提供する。本明細書において提供される多重特異的活性化可能抗体は、複数の抗原又はエピトープを認識し、そして多重特異的抗体の少なくとも1つの抗原 - 又はエピトープ結合ドメインに連結される少なくとも1つのマスキング部分 (MM) を含む多重特異的抗体であり、結果的に、MMのカッティングが、抗原 - 又はエピトープ - 結合ドメインのその標的を結合する能力を低める。いくつかの実施形態によれば、MMは、少なくとも1つのMMPプロテアーゼのための基質として機能する切断可能部分 (CM) を介して、多重特異的抗体の抗原 - 又はエピトープ - 結合ドメインにカッティングされる。本明細書において提供される多重特異的活性化可能抗体は、循環において安定し、治療及び / 又は診断の意図される部位で活性化されるが、しかし正常な、すなわち健康な組織においては活性化されず、そして活性化される場合、その対応する、修飾されていない多重特異的抗体に、少なくとも匹敵する標的への結合を示す。

20

【0397】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、また本明細書において免疫エフェクター係合多重特異的活性化可能抗体としても言及される免疫エフェクター細胞を係合するよう企画される。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、また白血病係合多重特異的活性化可能抗体として本明細書において言及される、白血球を係合するよう企画される。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、またT - 細胞係合多重特異的活性化可能抗体として本明細書において言及される、T - 細胞を係合するよう企画される。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、白血球、例えばT細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、骨髄単核細胞、マクロファージ、及び / 又は別の免疫エフェクター細胞上の表面抗原を係合する。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞は、白血球である。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞は、NK細胞である。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞は、単核細胞、例えば骨髄単核細胞である。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、多抗原標的活性化可能抗体としても本明細書において言及される、複数の標的及び / 又は複数のエピトープを結合するか、又は他方では、それと反応するよう企画される。本明細書において使用される場合、用語「標的 (target)」及び「抗原 (antigen)」とは、交換可能的に使用される。

30

【0398】

いくつかの実施形態によれば、本開示の免疫エフェクター細胞係合多重特異的活性化可能抗体は、標的化抗体又はその抗原結合フラグメント、及び免疫エフェクター細胞係合抗体又はその抗原結合部分を含み、ここで標的化抗体又はその抗原結合フラグメント、及び / 又は免疫エフェクター細胞係合抗体又はその抗原結合部分の少なくとも1つはマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞係合抗体又はその抗原結合フラグメントは、第1免疫エフェクター細胞係合標的を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント (AB1) を含み、ここで前記AB1はマスキング部分 (MM1) に結合され、結果的に、前記MM1のカッティングは、前記第1標的を結合するAB1の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント (AB2) を含み、

40

50

ここで前記 A B 2 はマスキング部分 (M M 2) に結合され、結果的に、 M M 2 のカップリングは、第 2 標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞係合抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 1 免疫エフェクター細胞係合標的を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に、前記 M M 1 のカップリングは、前記第 1 標的を結合する A B 1 の能力を低め、そして標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 2) を含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 (M M 2) に結合され、結果的に、 M M 2 のカップリングは、第 2 標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞係合抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 1 免疫エフェクター細胞係合標的を結合する、第 1 抗体又はその抗原フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に M M 1 のカップリングは、第 1 標的を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 標的を結合する、第 2 抗体又は抗原結合フラグメント (A B 2) を含み、ここで前記 A B 2 は、マスキング成分 (M M 2) に結合され、結果的に、 M M 2 のカップリングは、第 2 標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、非免疫エフェクター細胞係合抗体は、癌標的化抗体である。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞係合抗体は、 s c F v である。いくつかの実施形態によれば、標的化抗体（例えば、非免疫細胞エフェクター抗体）は、 I g G であり、そして免疫エフェクター細胞係合抗体は s c F v である。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞は白血球である。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞は、 T 細胞である。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞は、 N K 細胞である。いくつかの実施形態によれば、免疫エフェクター細胞は骨髄单核細胞である。

【 0 3 9 9 】

いくつかの実施形態によれば、本開示の T - 細胞係合多重特異的活性化可能抗体は、標的化抗体又はその抗原結合フラグメント、及び T - 細胞係合抗体又はその抗原結合部分を含み、ここで標的化抗体又はその抗原結合フラグメント、及び/又は T - 細胞係合抗体又はその抗原結合部分の少なくとも 1 つはマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、 T - 細胞係合抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 1 T - 細胞係合標的を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に、前記 M M 1 のカップリングは、前記第 1 標的を結合する A B 1 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 2) を含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 (M M 2) に結合され、結果的に、 M M 2 のカップリングは、第 2 標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、 T - 細胞係合抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 1 T - 細胞係合標的を結合する、第 1 抗体又はその抗原フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に M M 1 のカップリングは、第 1 標的を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 標的を結合する、第 2 抗体又は抗原結合フラグメント (A B 2) を含み、ここで前記 A B 2 は、マスキング成分 (M M 2) に結合され、結果的に、 M M 2 のカップリングは、第 2 標的を結合する A B 2 の能力を低める。

【 0 4 0 0 】

いくつかの実施形態によれば、 T - 細胞係合多重特異的活性化可能抗体は、癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメント、及び T - 細胞係合抗体又はその抗原結合部分を含み、ここで癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメント、及び/又は T - 細胞係合抗体又はその抗原結合部分の少なくとも 1 つはマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、 T - 細胞係合抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 1 T - 細胞係合標的を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に、前記 M M 1 のカップリングは、前記第 1 標的

を結合する A B 1 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 2) を含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 (M M 2) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングは、第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、T - 細胞係合抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 1 T - 細胞係合標的を結合する、第 1 抗体又はその抗原フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に M M 1 のカップリングは、第 1 標的を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 癌関連標的を結合する、第 2 抗体又は抗原結合フラグメント (A B 2) を含み、ここで前記 A B 2 は、マスキング成分 (M M 2) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングは、第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。

【 0 4 0 1 】

いくつかの実施形態によれば、T - 細胞係合多重特異的活性化可能抗体は、癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメント、及び T - 細胞係合 s c F v を含み、ここで癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメント、及び / 又は T - 細胞係合抗体又はその抗原結合部分の少なくとも 1 つはマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、T - 細胞係合抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 1 T - 細胞係合標的を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に、前記 M M 1 のカップリングは、前記第 1 標的を結合する A B 1 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 2) を含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 (M M 2) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングは、第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、T - 細胞係合抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 1 T - 細胞係合標的を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に M M 1 のカップリングは、第 1 標的を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 癌関連標的を結合する、第 2 抗体又は抗原結合フラグメント (A B 2) を含み、ここで前記 A B 2 は、マスキング成分 (M M 2) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングは、第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。

【 0 4 0 2 】

免疫エフェクター係合多重特異的活性化可能抗体のいくつかの実施形態によれば、1 つの抗原は典型的には、腫瘍細胞、又は疾患に関連する他の細胞型の表面上に存在する抗原、例えば、表 1 に列挙されるに任意の標的、例えば E G G R 、 e r b B 2 、 E p C A M 、 J a g g e d 、 P D - L 1 、 B 7 H 3 又は C D 7 1 (トランスフェリン受容体) であるが、但しそれらだけには限定されず、そして別の抗原は典型的には、T 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、骨髄单核細胞、マクロファージ、及び / 又は他の免疫エフェクター細胞の表面上に存在する刺激又は阻害受容体、例えば B 7 - H 4 、 B T L A 、 C D 3 、 C D 4 、 C D 8 、 C D 1 6 a 、 C D 2 5 、 C D 2 7 、 C D 2 8 、 C D 3 2 、 C D 5 6 、 C D 1 3 7 、 C T L A - 4 、 G I T R 、 H V E M 、 I C O S 、 L A G 3 、 N K G 2 D 、 O X 4 0 、 P D - 1 、 T I G I T 、 T I M 3 、又は V I S T A であるが、但しそれらだけには限定されない。いくつかの実施形態によれば、抗原は、T 細胞又は N K 細胞の表面上に存在する刺激受容体であり；そのような刺激受容体の例は、C D 3 、 C D 2 7 、 C D 2 8 、 C D 1 3 7 (又は 4 - 1 B B としても言及される) 、 G I T R 、 H V E M 、 I C O S 、 N K G 2 D 、及び O X 4 0 を包含するが、但しそれらだけには制限されない。いくつかの実施形態によれば、抗原は、T - 細胞の表面上に存在する阻害受容体であり；そのような阻害受容体の例は、B T L A 、 C T L A - 4 、 L A G 3 、 P D - 1 、 T I G I T 、 T I M 3 及び N K - 発現 K I R を包含するが、但しそれらだけには限定されない。T - 細胞表面抗原に対して特異性を与える抗体エフェクター細胞受容体、例えば B 7 - 1 、 B 7 - 2 、 B 7 H 3 、 P D - L 1 、 P D - L 2 又は T N F S F 9 (但し、それらだけには限定されない

10

20

30

40

50

)に結合する、リガンド又はリガンドドメインにより置換され得る。

【0403】

本開示の1つの実施形態は、癌微小環境において活性化でき、そして抗体、例えば腫瘍標的及びアゴニスト抗体に向けられるIgG又はscFv、例えば活性化されたT細胞又はNK細胞の表面上で発現される共刺激受容体に向けられるIgG又はscFvを含む多重特異的活性化可能抗体であり、ここで前記癌標的抗体及び/又はアゴニスト抗体の少なくとも1つはマスキングされている。共刺激受容体の例は、CD27、CD137、GITR、HVEM、NKG2D及びOX40を包含するが、但しそれらだけには限定されない。この実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、腫瘍関連プロテーゼにより活性化されると、任意の腫瘍抗原に応答するT細胞の活性を、それらの内因性T細胞抗原又はNK-活性化受容体を介して増強するために、腫瘍依存性態様でT細胞又はNK細胞発現共刺激受容体を効果的に架橋し、そして活性化するであろう。これらのT細胞又はNK細胞共刺激受容体の活性化-依存性質は、それらの抗原特異性に関係なく、すべてのT細胞を活性化しないで、腫瘍特異的T細胞に、活性化された多重特異的活性化可能抗体の活性の焦点を当てている。1つの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体の少なくとも共刺激受容体抗体、多重特異的活性化可能抗体において腫瘍標的指向抗体により認識される抗原をまた発現する組織に存在することができる自己反応性T細胞の活性化を防止するために、マスキングされているが、しかしそれらの活性は、共受容体の係合の欠如により制限されている。

【0404】

本開示の1つの実施形態は、T細胞過剰刺激により特徴づけられる疾患、例えば自己免疫疾患又は炎症性疾患の微小環境(但し、それらだけには限定されない)において活性化できる多重特異的活性化可能抗体である。そのような多重特異的活性化可能抗体は、抗体、例えば自己免疫炎症性疾患においてT細胞により標的化される組織において発現される表面抗原を含む標的に向けられたIgG又はscFv、及び抗体、例えばT細胞又はNK細胞の表面上に発現される阻害受容体に向けられるIgG又はscFvを含み、ここで疾患組織標的抗体及び/又はT細胞受容体抗体の少なくとも1つはマスキングされている。阻害受容体の例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない: CTLA、CTLA-4、LAG3、PD-1、TIM1、TIM3及びNK-発現KIR。自己免疫疾患におけるT細胞により標的化される組織抗原の例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには制限されない:多発性硬化症におけるミエリン又は神経細胞上に発現される表面抗原、又は1型糖尿病における膵島細胞上に発現される表面抗原。この実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、自己免疫攻撃又は炎症下で組織に局在化される場合、活性化され、そして任意の疾患組織組織-標的化抗原に応答する自己反応性T細胞の活性を抑制するために、T細胞又はNK細胞阻害受容体を、それらの内因性TCR又は活性化受容体を介して共同係合する。1つの実施形態によれば、少なくとも1つの又は複数の抗体が、標的抗原がまた発現され得る非疾患組織における所望のT細胞応答の抑制を防ぐために、マスキングされる。

【0405】

いくつかの実施形態によれば、T-細胞係合多重特異的活性化可能抗体は、抗-CD3イプシロン(CD3e、またCD3e及びCD3eとしても本明細書において言及される)scFv及び標的化抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで抗-CD3 scFv及び/又は標的化抗体又はその抗原結合フラグメントの少なくとも1つはマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、前記CD3 scFvは、CD3eを結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)を含み、ここで前記AB1はマスキング部分(MM1)に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CD3eを結合するAB1の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(AB2)を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分(MM2)に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2標的を結合する

A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記 C D 3 s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 2) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 (M M 2) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 標的を結合する A B 2 の能力を低める。

【 0 4 0 6 】

いくつかの実施形態によれば、T - 細胞係合多重特異的活性化可能抗体は、抗 - C D 3 s c F v 及び癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで抗 - C D 3 s c F v 及び / 又は癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントの少なくとも 1 つはマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、前記 C D 3 s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 の癌関連標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 2) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 (M M 2) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記 C D 3 s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 癌関連標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 2) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 (M M 2) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。

【 0 4 0 7 】

いくつかの実施形態によれば、T - 細胞係合多重特異的活性化可能抗体は、抗 - C D 3 s c F v 及び癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで抗 - C D 3 s c F v 及び / 又は癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントの少なくとも 1 つはマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、前記 C D 3 s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 の癌関連標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 2) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 (M M 2) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記 C D 3 s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 1) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 (M M 1) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 癌関連標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント (A B 2) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 (M M 2) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。

【 0 4 0 8 】

いくつかの実施形態によれば T - 細胞係合多重特異的活性化可能抗体は、O K T 3 由來の抗 - C D 3 イプシロン (C D 3) s c F v を含み、ここで標的抗体又はその抗原結合フラグメント及び / 又は O K T 3 s c F v 又は O K T 3 - 由來の s c F v の少なくとも

10

20

30

40

50

1つがマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、前記OKT3-scFv又はOKT3-由来のscFvは、CD3を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)を含み、ここで前記AB1はマスキング部分(MM1)に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CD3を結合するAB1の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(AB2)を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分(MM2)に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2標的を結合するAB2の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記OKT3-scFv又はOKT3-由来のscFvは、CD3を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)を含み、ここで前記AB1はマスキング部分(MM1)に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CD3を結合するAB1の能力を低め、そして前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(AB2)を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分(MM2)に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2標的を結合するAB2の能力を低める。

【0409】

いくつかの実施形態によれば、T-細胞係合多重特異的活性化可能抗体は、OKT3-scFv又はOKT3-由来のscFv及び癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここでOKT3-scFv又はOKT3-由来のscFv及び/又は癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントの少なくとも1つはマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、前記OKT3-scFv又はOKT3-由来のscFvは、CD3を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)を含み、ここで前記AB1はマスキング部分(MM1)に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CD3を結合するAB1の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2の癌関連標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(AB2)を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分(MM2)に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2癌関連標的を結合するAB2の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記OKT3-scFv又はOKT3-由来のscFvは、CD3を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)を含み、ここで前記AB1はマスキング部分(MM1)に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CD3を結合するAB1の能力を低め、そして前記癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2癌関連標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(AB2)を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分(MM2)に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2癌関連標的を結合するAB2の能力を低める。

【0410】

いくつかの実施形態によれば、T-細胞係合多重特異的活性化可能抗体は、OKT3-scFv又はOKT3-由来のscFv及び癌標的化IgG抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここでOKT3-scFv又はOKT3-由来のscFv及び/又は癌標的化IgG抗体又はその抗原結合フラグメントの少なくとも1つはマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、前記OKT3-scFv又はOKT3-由来のscFvは、CD3を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)を含み、ここで前記AB1はマスキング部分(MM1)に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CD3を結合するAB1の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記癌標的化IgG抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2の癌関連標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(AB2)を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分(MM2)に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2癌関連標的を結合するAB2の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記OKT3-scFv又はOKT3-由来のscFvは、CD3を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)を含み、ここで前記AB1はマス

10

20

30

40

50

キング部分（MM1）に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CD3を結合するAB1の能力を低め、そして前記癌標的化IgG抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2癌関連標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント（AB2）を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分（MM2）に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2癌関連標的を結合するAB2の能力を低める。

【0411】

いくつかの実施形態によればT-細胞係合多重特異的活性化可能抗体は、抗-CTLA-4 scFvを含み、ここで標的抗体又はその抗原結合フラグメント及び/又は抗-CTLA-4 scFvの少なくとも1つがマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、前記抗-CTLA-4 scFvは、CTLA-4を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント（AB1）を含み、ここで前記AB1はマスキング部分（MM1）に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CTLA-4を結合するAB1の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント（AB2）を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分（MM2）に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2標的を結合するAB2の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記抗-CTLA-4 scFvは、CTLA-4を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント（AB1）を含み、ここで前記AB1はマスキング部分（MM1）に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CTLA-4を結合するAB1の能力を低め、そして前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント（AB2）を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分（MM2）に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2標的を結合するAB2の能力を低める。

【0412】

いくつかの実施形態によれば、T-細胞係合多重特異的活性化可能抗体は、抗-CTLA-4 scFv、及び標的化IgG抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで抗-CTLA-4 scFv及び/又は標的IgG抗体又はその抗原結合部分の少なく1つはマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、前記抗-CTLA-4 scFvは、CTLA-4を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント（AB1）を含み、ここで前記AB1はマスキング部分（MM1）に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CTLA-4を結合するAB1の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記標的化IgG抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント（AB2）を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分（MM2）に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2標的を結合するAB2の能力を低める。いくつかの実施形態によれば、前記抗-CTLA-4 scFvは、CTLA-4を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント（AB1）を含み、ここで前記AB1はマスキング部分（MM1）に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CTLA-4を結合するAB1の能力を低め、そして前記標的化IgG抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント（AB2）を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分（MM2）に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2標的を結合するAB2の能力を低める。

【0413】

いくつかの実施形態によれば、多重抗原標的化抗体及び/又は多重抗原標的化活性化可能抗体は、第1標的及び/又は第1エピトープを結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント、及び第2標的及び/又は第2エピトープを結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメントを少なくとも含む。いくつかの実施形態によれば、多重抗原標的化抗体及び/又は多重抗原標的化活性化可能抗体は、複数の異なる標的を結合する。いくつか

の実施形態によれば、多重抗原標的化抗体及び／又は多重抗原標的化活性化可能抗体は、同じ標的上の複数の異なったエピトープを結合する。いくつかの実施形態によれば、多重抗原標的化抗体及び／又は多重抗原標的化活性化可能抗体は、複数の異なった標的及び同じ標的上の複数の異なったエピトープの組合せを結合する。

【0414】

いくつかの実施形態によれば、IgGを含む多重特異的活性化可能抗体は、マスキングされたIgG可能ドメインを有する。いくつかの実施形態によれば、scFvを含む多重特異的活性化可能抗体は、マスキングされたscFvドメインを有する。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、IgG可変ドメイン及びscFvドメインの両者を有し、ここでIgG可変ドメインの少なくとも1つは、マスキングのブ部にカップリングされる。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、IgG可変ドメイン及びscFvドメインの両者を有し、ここでscFvドメインの少なくとも1つはマスキング部分にカップリングされる。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、IgG可変ドメイン及びscFvドメインの両者を有し、ここでIgG可変ドメインの少なくとも1つは、マスキング部分にカップリングされ、そしてscFvドメインの少なくとも1つはマスキング部分にカップリングされる。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、IgG可変ドメイン及びscFvドメインの両者を有し、ここでIgG可変ドメイン及びscFvドメインの個々は、それ自体のマスキング部分にカップリングされる。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体の1つの抗体ドメインは、標的抗原に対する特異性を有し、そして別の抗体ドメインは、T-細胞表面抗原に対する特異性を有する。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体の1つの抗体ドメインは、標的抗原に対する特異性を有し、そして別の抗体ドメインは、別の標的抗原に対する特異性を有する。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体の1つの抗体ドメインは、標的抗原のエピトープに対する特異性を有し、そして別の抗体ドメインは、標的抗原の別のエピトープに対する特異性を有する。

【0415】

多重特異的活性化可能抗体においては、scFvは、IgG活性可能抗体のH鎖のカルボキシル末端に、IgG活性化可能抗体のL鎖のカルボキシル末端、又はIgG活性化可能抗体のH鎖及びL鎖の両鎖のカルボキシル末端に融合され得る。多重特異的活性化可能抗体においては、scFvは、IgG活性化可能抗体のH鎖のアミノ末端に、IgG活性化可能抗体のL鎖のアミノ末端に、又はIgG活性化可能抗体のH鎖及びL鎖の両鎖のアミノ末端に融合され得る。多重特異的活性化可能抗体においては、scFvは、IgG活性可能抗体の1又は2以上のカルボキシル末端及び1又は2以上のアミノ末端の何れかの組合せに融合され得る。いくつかの実施形態によれば、切断可能部分(CM)に連結されるマスキング部分(MM)は、IgGの抗原結合ドメインに結合され、そしてそのドメインをマスキングする。いくつかの実施形態によれば、切断可能部分(CM)に連結されるマスキング部分(MM)は、少なくとも1つのscFvの抗原結合ドメインに結合され、そしてそのドメインをマスキングする。いくつかの実施形態によれば、切断可能部分(CM)に連結されるマスキング部分(MM)は、IgGの抗原結合ドメインに連結され、そしてそのドメインをマスキングし、そして切断可能部分(CM)に連結されるマスキング部分(MM)は、少なくとも1つのscFvの抗原結合ドメインに結合され、そしてそのドメインをマスキングする。

【0416】

本開示は、以下のもの（但し、それらだけには限定されない）を含む多重特異的活性化可能抗体構造の例を提供し：

(VL - CL)₂ : (VH - CH₁ - CH₂ - CH₃ - L₄ - VH^{*} - L₃ - VL^{*} - L₂ - CM - L₁ - MM)₂; (VL - CL)₂ : (VH - CH₁ - CH₂ - CH₃ - L₄ - VL^{*} - L₃ - VH^{*} - L₂ - CM - L₁ - MM)₂; (MM - L₁ - CM - L₂ - VL - CL)₂ : (VH - CH₁ - CH₂ - CH₃ - L₄ - VH^{*} - L₃ - VL^{*})₂; (MM - L₁

10

20

30

40

50

- C M - L 2 - V L - C L)₂: (V H - C H 1 - C H 2 - C H 3 - L 4 - V L * - L 3 - V H *)₂; (V L - C L)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V L * - L 3 - V H * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V L - C L)₂: (V L * - L 3 - V H * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (M M - L 1 - C M - L 2 - V L - C L)₂: (V H * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V H * - L 3 - V L * - L 2 - C M - L 1 - M M)₂: (V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V L * - L 3 - V H * - L 2 - C M - L 1 - M M)₂: (V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (M M - L 1 - C M - L 2 - V L * - L 3 - V H * - L 4 - V L - C L)₂: (V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V H * - L 3 - V L * - L 2 - C M - L 1 - M M)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V L * - L 3 - V H * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V H * - L 3 - V L * - L 2 - C M - L 1 - M M)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V H * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V L * - L 3 - V H * - L 2 - C M - L 1 - M M)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V L * - L 3 - V H * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V L * - L 3 - V H * - L 2 - C M - L 1 - M M)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V H * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V H * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V H * - L 3 - V L *)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V L * - L 3 - V H * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V H * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V L * - L 3 - V H *)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V L * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V L * - L 3 - V H *)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V L * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V H * - L 3 - V L * - L 2 - C M - L 1 - M M)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V H * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V H * - L 3 - V L * - L 2 - C M - L 1 - M M)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V H * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V H * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V H * - L 3 - V L *)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V H * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V H * - L 3 - V L * - L 2 - C M - L 1 - M M)₂: (V L * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V H * - L 3 - V L * - L 2 - C M - L 1 - M M)₂: (V L * - L 3 - V H * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; (V L - C L - L 4 - V L * - L 3 - V H *)₂: (M M - L 1 - C M - L 2 - V H * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂; 又は (V L - C L - L 4 - V L * - L 3 - V H * - L 2 - C M - L 1 - M M)₂: (V H * - L 3 - V L * - L 4 - V H - C H 1 - C H 2 - C H 3)₂、ここで V L 及び V H は、IgGに含まれる、第1特異性のL及びH可変ドメインを表し；V L * 及び V H * は、scFvに含まれる、第2特異性の可変ドメインを表し；L 1 は、マスキング部分(MM)及び切断可能部分(CM)を連結するリンカーペプチドであり；L 2 は、切断可能部分(CM)及び抗体を連結するリンカーペプチドであり；L 3 は、scFvの可変ドメインを連結するリンカーペプチドであり；C L は、L鎖不变ドメインであり；そして C H 1 、C H 2 、C H 3 は、H鎖不变ドメインである。前記第1及び第2特異性は、何れかの抗原又はエピトープに対して存在することができる。

【 0 4 1 7 】

T - 細胞係合多重特異的活性化可能抗体のいくつかの実施形態によれば、1つの抗原は典型的には、腫瘍細胞又は疾患に関連する他の細胞型の表面上に存在する抗原、例えば表1に列挙される何れかの標的（但し、それらだけには限定されない）、例えばEGFR、erbB2、EpCAM、Jagged、PD-L1、B7H3又はCD71（トランスフェリン受容体）（但し、それらだけには制限されない）であり、そして別の抗原は典型的には、T-細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、骨髓单核細胞、マクロファージ及び/又は他の免疫エフェクター細胞の表面上に存在する刺激（また、本明細書においては、活性化として言及される）又は阻害受容体、たとえばB7-H4、BTLA、CD3、CD4、CD8、CD16a、CD25、CD27、CD28、CD32、CD56、C

D 1 3 7 (または、TNFRSF9としても言及される)、C T L A - 4、G I T R、H V E M、I C O S、L A G 3、N K G 2 D、O X 4 0、P D - 1、T I G I T、T I M 3、又はV I S T A (但し、それだけには制限されない)である。T - 細胞表面抗原に対して特異性を提供する抗体ドメインはまた、T - 細胞受容体、N K - 細胞受容体、マクロファージ受容体及び/又は他の免疫エフェクター細胞受容体、例えばB 7 - 1、B 7 - 2、B 7 H 3、P D - L 1、P D - L 2又はT N F S F 9 (但し、それだけには制限されない)に結合するリガンド又はリガンドドメインにより置換され得る。多重抗原標的化活性化可能抗原のいくつかの実施形態によれば、1つの抗原は、表1に列挙される標的群から選択され、そして別の抗原は、表1に列挙される標的群から選択される。

【0418】

10

いくつかの実施形態によれば、標的化抗体は、抗-E G F R抗体である。いくつかの実施形態によれば、標的化抗体は、E G F Rへの結合に対して特異的であるC 2 2 5 v 5である。いくつかの実施形態によれば、標的化抗体は、E G F Rへの結合に対して特異的であるC 2 2 5である。いくつかの実施形態によれば、標的化抗体は、E G F Rへの結合に対して特異的であるC 2 2 5 v 4である。いくつかの実施形態によれば、標的化抗体は、E G F Rへの結合に対して特異的であるC 2 2 5 v 6である。いくつかの実施形態によれば、標的化抗体は、抗-J a g g e d抗体である。いくつかの実施形態によれば、標的化抗体は、ヒト及びマウスJ a g g e d 1及びJ a g g e d 2への結合に対して特異的である4 D 1 1である。いくつかの実施形態によれば、標的化抗体は、ヒト及びマウスJ a g g e d 1及びJ a g g e d 2への結合に対して特異的である4 D 1 1 v 2である。

【0419】

20

いくつかの実施形態によれば、標的化抗体は、活性化可能抗体の形で存在することができる。いくつかの実施形態によれば、s c F vは、プロ-s c F vの形で存在することができる(例えば、国際公開第2009/025846号、国際公開第2010/081173号を参照のこと)。

【0420】

30

いくつかの実施形態によれば、s c F vは、C D 3 の結合に対して特異的であり、そしてC D 3 、例えばC H 2 5 2 7、F N 1 8、H 2 C、O K T 3、2 C 1 1、U C H T 1又はV 9を結合する、抗体又はそのフラグメントであるか、又はそれに由来する。いくつかの実施形態によれば、s c F vは、C T L A - 4(また、本明細書においては、C T L A及びC T L A 4としても言及される)の結合に対して特異的である。

【0421】

いくつかの実施形態によれば、抗-C T L A - 4 s c F vは、下記アミノ酸配列を含む:

G G G S G G G G S G S G G G S G G G S G G G E I V L T Q S P G T L S L S P G E
R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T
G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P L
T F G G G T K V E I K R S G G S T I T S Y N V Y Y T K L S S S G T Q V Q L V Q T
G G G W Q P G R S L R L S C A A S G S T F S S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V
S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A
E D T A V Y Y C A T N S L Y W Y F D L W G R G T L V T V S S A S (配列番号510)
)

40

【0422】

いくつかの実施形態によれば、抗-C T L A - 4 s c F vは、配列番号510のアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上、同一であるアミノ酸配列を含む。

【0423】

いくつかの実施形態によれば、抗-C D 3 s c F vは、下記アミノ酸配列を含む:

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

50

T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A
 R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S S G G G S G G G G S G G G G S Q I V
 L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P
 K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A
 T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R (配列番号 511)

【0424】

いくつかの実施形態によれば、抗 - CD3 scFv は、配列番号 511 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上、同一であるアミノ酸配列を含む。

【0425】

いくつかの実施形態によれば、scFv は、1 又は 2 以上の T - 細胞、1 又は 2 以上の NK 細胞及び / 又は 1 又は 2 以上のマクロファージを結合することに対して特異的である。いくつかの実施形態によれば、scFv は、B7-H4、BTLA、CD3、CD4、CD8、CD16a、CD25、CD27、CD28、CD32、CD56、CD137、CTLA-4、GITR、HVEM、ICOS、LAG3、NKG2D、OX40、PD-1、TIGIT、TIM3、又は VISTA から成る群から選択された標的を結合することに対して特異的である。

【0426】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体はまた、AB に接合される剤も含む。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、抗腫瘍である。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、トキシン又はそのフラグメントである。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、リンカーを介して多重特異的活性化可能抗体に接合される。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、切断可能リンカーを介して AB に接合される。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、少なくとも 1 つの MMP - 切断可能基質配列を含むリンカーを介して AB に接合される。いくつかの実施形態によれば、前記リンカーは、非切断性リンカーである。いくつかの実施形態によれば、前記剤は微小管阻害剤である。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、核酸損傷剤、例えば DNA アルキル化剤、又は DNA インターカレーター、又は他の DNA 損傷剤である。いくつかの実施形態によれば、前記リンカーは、切断可能リンカーである。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、表 4 に列挙される群から選択される剤である。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、トラスタチンである。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、アウリスタチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、アウリスタチン E 又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、モノメチルアウリスタチン E (MMAE) である。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、モノメチルアウリスタチン D (MMAD) である。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、メイタンシノイド又はマイタンシノイド誘導体である。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、DM1 又は DM4 である。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、デュオカルマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、前記剤は、カリケアマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば前記剤は、ピロロベンゾジアゼピンである。

【0427】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体はまた、検出可能部分も含むことができる。いくつかの実施形態によれば、前記検出可能部分は、診断剤である。

【0428】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、天然において、1 又は 2 以上のジスルフィド結合を含む。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、1 又は 2 以上のジスルフィド結合を含むよう操作され得る。

【0429】

本開示はまた、本明細書に記載される多重特異的活性化可能抗体をコードする単離核酸分子、及びそれらの単離核酸配列を含むベクターを提供する。本開示は、活性化可能抗体の発現を導く条件下で、そのような核酸分子を含む細胞を培養することによる、多重特異的

10

20

30

40

50

抗体の生成方法を提供する。いくつかの実施形態によれば、前記細胞は、そのようなベクターを含む。

【 0 4 3 0 】

本開示はまた、(a) 多重特異的活性化可能抗体をコードする核酸コンストラクトを含む細胞を、多重特異的活性化可能抗体の発現を導く条件下で培養し、そして(b) 多重特異的活性化可能抗体を回収することによる、本開示の多重特異的活性化可能抗体の製造方法も提供する。

【 0 4 3 1 】

本開示はまた、第1標的又は第1エピトープを特異的に結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(A B 1)、及び第2標的又は第2エピトープを結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(A B 2)を少なくとも含む多重特異的抗体及び/又は多重特異的活性化可能抗体組成物も提供し、ここで少なくともA B 1がマスキング部分(M M 1)にカップリングされるか、又は他方では、結合され、結果的に、M M 1のカップリングが、A B 1のその標的を結合する能力を低める。いくつかの実施形態によれば、M M 1は、プロテアーゼ、例えば対象における治療部位又は診断部位でA B 1の標的と共に在されるプロテアーゼのための基質を含む第1切断可能部分(C M 1)配列を介してA B 1にカップリングされる。本明細書において提供される多重特異的活性化可能抗体は、循環において安定し、治療及び/又は診断の意図される部位で活性化されるが、しかし正常、すなわち健康組織において活性化されず、そして活性化される場合、その対応する修飾されていない多重特異的抗体に少なくとも匹敵するA B 1の標的への結合を示す。

10

【 0 4 3 2 】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、M M 1とC M 1との間に連結ペプチドを含む。

【 0 4 3 3 】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、C M 1とA B 1との間に連結ペプチドを含む。

【 0 4 3 4 】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、第1連結ペプチド(L P 1)及び第2連結ペプチド(L P 2)を含み、そして多重特異的活性化可能抗体の少なくとも一部が、切断されていない状態で次のようなN-末端からC-末端への構造配置を有する：M M 1-L P 1-C M 1-L P 2-A B 1又はA B 1-L P 2-C M 1-L P 1-M M 1。いくつかの実施形態によれば、前記2つの連結ペプチドはお互い同一である必要はない。

30

【 0 4 3 5 】

いくつかの実施形態によれば、L P 1又はL P 2の少なくとも1つは、(G S)_n、(G G S)_n、(G S G G S)_n(配列番号1)及び(G G G S)_n(配列番号2)(nは少なくとも1つの整数である)から成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によれば、L P 1又はL P 2の少なくとも1つは、G G S G(配列番号3)、G G S G G(配列番号4)、G S G S G(配列番号5)、G S G G G(配列番号6)、G G G S G(配列番号7)、及びG S S S G(配列番号8)から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

40

【 0 4 3 6 】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、第1標的又は第1エピトープを特異的に結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(A B 1)、及び第2標的又は第2エピトープを特異的に結合する、第2抗体又はその抗体結合フラグメント(A B 2)を少なくとも含む。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各A Bは、モノクローナル抗体、ドメイン、抗体、一本鎖、F ab フラグメント、F(ab')₂フラグメント、s c F v、s c A b, d A b、單一ドメインH鎖抗体、及び單一ドメインL鎖抗体から成る群から独立して選択される。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各A Bは、齧歯類(例えば、マウス又はラット)、キメラ性、ヒト化又は完全ヒトモノクローナル抗体である。

50

【 0 4 3 7 】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各 A B は、その対応する標的又はエピトープに結合するために、約 1 0 0 n M 又はそれ以下の平衡解離定数を有する。

【 0 4 3 8 】

いくつかの実施形態によれば、MM 1 は、A B のその対応する標的又はエピトープへの結合のための平衡解離定数よりも高い、その対応する A B への結合のための平衡解離定数を有する。

【 0 4 3 9 】

いくつかの実施形態によれば、MM 1 は、A B のその対応する標的又はエピトープへの結合のための平衡解離定数に過ぎない、その対応する A B への結合のための平衡解離定数を有する。 10

【 0 4 4 0 】

いくつかの実施形態によれば、MM 1 は、多重特異的活性化可能抗体が切断された状態で存在する場合、その対応する標的又はエピトープに結合するために、その対応する A B を阻止しないか、又はそれと競争しない。

【 0 4 4 1 】

いくつかの実施形態によれば、MM 1 は、約 2 - 4 0 個の長さのアミノ酸のポリペプチドである。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各 MM は、4 0 個以下の長さのアミノ酸のポリペプチドである。 20

【 0 4 4 2 】

いくつかの実施形態によれば、MM 1 は、その対応する A B の標的の配列とは異なるポリペプチド配列を有する。

【 0 4 4 3 】

いくつかの実施形態によれば、MM 1 は、その対応する A B の任意の天然結合パートナーに対して 5 0 % 以下、同一であるポリペプチド配列を有する。いくつかの実施形態によれば、MM 1 は、その対応する A B の任意の天然結合パートナーに対して 2 5 % 以下、同一であるポリペプチド配列を有する。いくつかの実施形態によれば、MM 1 は、その対応する A B の任意の天然結合パートナーに対して 1 0 % 以下、同一であるポリペプチド配列を有する。 30

【 0 4 4 4 】

いくつかの実施形態によれば、MM 1 のカップリングは、その対応する A B のその標的又はエピトープへの結合の能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かって MM 1 にカップリングされる場合、A B の解離定数 (K_d) は、その対応する標的又はエピトープに向かって MM 1 にカップリングされない場合の A B の K_d よりも少なくとも 2 0 倍、高い。

【 0 4 4 5 】

いくつかの実施形態によれば、MM 1 のカップリングは、その対応する A B のその標的又はエピトープへの結合の能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かって MM 1 にカップリングされる場合、A B の解離定数 (K_d) は、その対応する標的又はエピトープに向かって MM 1 にカップリングされない場合の A B の K_d よりも少なくとも 4 0 倍、高い。 40

【 0 4 4 6 】

いくつかの実施形態によれば、MM 1 のカップリングは、その対応する A B のその標的又はエピトープへの結合の能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かって MM 1 にカップリングされる場合、A B の解離定数 (K_d) は、その対応する標的又はエピトープに向かって MM 1 にカップリングされない場合の A B の K_d よりも少なくとも 1 0 0 倍、高い。

【 0 4 4 7 】

いくつかの実施形態によれば、MM 1 のカップリングは、その対応する A B のその標的 50

又はエピトープへの結合の能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かって MM 1 にカップリングされる場合、AB の解離定数 (K_d) は、その対応する標的又はエピトープに向かって MM 1 にカップリングされない場合の AB の K_d よりも少なくとも 1000 倍、高い。

【0448】

いくつかの実施形態によれば、MM 1 のカップリングは、その対応する AB のその標的又はエピトープへの結合の能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かって MM 1 にカップリングされる場合、AB の解離定数 (K_d) は、その対応する標的又はエピトープに向かって MM 1 にカップリングされない場合の AB の K_d よりも少なくとも 10,000 倍、高い。

10

【0449】

いくつかの実施形態によれば、MM 1 は、本明細書に提供される実施例に示される MM から選択されるアミノ酸配列である。

【0450】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、その多重特異的活性化可能抗体が切断されていない状態にある場合、AB 2 のその標的への結合を阻害する、第 2 マスキング部分 (MM 2)、及び第 2 プロテアーゼのための基質として機能する、AB 2 にカップリングされる第 2 切断可能部分 (CM 2) を少なくとも含む。いくつかの実施形態によれば、CM 2 は、15 個以下の長さのアミノ酸のポリペプチドである。いくつかの実施形態によれば、前記第 2 プロテアーゼは、組織において第 2 標的又はエピトープと共に局在化され、そして第 2 プロテアーゼは、多重特異的活性化可能抗体が第 2 プロテアーゼに暴露される場合、多重特異的活性化可能抗体における CM 2 を切断する。いくつかの実施形態によれば、第 1 プロテアーゼ及び第 2 プロテアーゼは、組織において、第 1 標的又はエピトープ及び第 2 標的又はエピトープと共に局在化される。いくつかの実施形態によれば、第 1 プロテアーゼ及び第 2 プロテアーゼは、同じプロテアーゼである。いくつかの実施形態によれば、CM 1 及び CM 2 は、同じプロテアーゼのための異なった基質である。いくつかの実施形態によれば、プロテアーゼは、表 7 に示されるそれらから成る群から選択される。いくつかの実施形態によれば、第 1 プロテアーゼ及び第 2 プロテアーゼは、異なったプロテアーゼである。いくつかの実施形態によれば、第 1 プロテアーゼ及び第 2 プロテアーゼは、表 7 に示されるそれらから成る群から選択される異なったプロテアーゼである。

20

【0451】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各 MM、例えば MM 1 及び少なくとも MM 2 は、AB のその対応する標的又はエピトープに結合するための平衡解離定数よりも高い、その対応する AB に結合するための平衡解離定数を有する。

【0452】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各 MM、例えば MM 1 及び少なくとも MM 2 は、AB のその対応する標的又はエピトープに結合するための平衡解離定数以下である、その対応する AB に結合するための平衡解離定数を有する。

【0453】

30

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各 MM は、多重特異的活性化可能抗体が切断された状態にある場合、対応する標的又はエピトープに結合するためにその対応する AB を妨げないか、又はそれと競争しない。

【0454】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各 MM は、約 2 - 40 個の長さのアミノ酸のポリペプチドである。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各 MM は 40 個以下の長さのアミノ酸のポリペプチドである。

【0455】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各 MM は、対応する AB の標的の配列とは異なるポリペプチド配列を有する。

50

【 0 4 5 6 】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各MMは、その対応するABの任意の天然の結合パートナーに対して50%同一に過ぎないポリペプチド配列を有する。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各MMは、その対応するABの任意の天然の結合パートナーに対して25%同一に過ぎないポリペプチド配列を有する。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各MMは、その対応するABの任意の天然の結合パートナーに対して10%同一に過ぎないポリペプチド配列を有する。

【 0 4 5 7 】

いくつかの実施形態によれば、各MMのカップリングは、その対応するABのその標的又はエピトープを結合する能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップされない場合のABの K_d よりも少なくとも20倍、高い。

10

【 0 4 5 8 】

いくつかの実施形態によれば、各MMのカップリングは、その対応するABのその標的又はエピトープを結合する能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップされない場合のABの K_d よりも少なくとも40倍、高い。

20

【 0 4 5 9 】

いくつかの実施形態によれば、各MMのカップリングは、その対応するABのその標的又はエピトープを結合する能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップされない場合のABの K_d よりも少なくとも100倍、高い。

【 0 4 6 0 】

いくつかの実施形態によれば、各MMのカップリングは、その対応するABのその標的又はエピトープを結合する能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップされない場合のABの K_d よりも少なくとも100倍、高い。

30

【 0 4 6 1 】

いくつかの実施形態によれば、各MMのカップリングは、その対応するABのその標的又はエピトープを結合する能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップリングされる場合、ABの解離定数(K_d)は、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップされない場合のABの K_d よりも少なくとも10,000倍、高い。

【 0 4 6 2 】

いくつかの実施形態によれば、各MMは、本明細書に開示されるMMから選択されるアミノ酸配列である。

40

【 0 4 6 3 】

いくつかの実施形態によれば、CM1及び/又はCM2の少なくとも1つは、少なくとも1つのMMPプロテアーゼにより切断される。CM1及び/又はCM2の少なくとも1つは、配列I S S G L L S S (配列番号14); Q N Q A L R M A (配列番号15); A Q N L L G M V (配列番号16); S T F P F G M F (配列番号17); P V G Y T S S L (配列番号18); D W L Y W P G I (配列番号19); M I A P V A Y R (配列番号20); R P S P M W A Y (配列番号21); W A T P R P M R (配列番号22); F R L L D W Q W (配列番号23); L K A A P R W A (配列番号24); G P S H L V L T (配列番号25); L P G G L S P W (配列番号26); M G L F S E A G (配列番号27); S P L

50

P L R V P (配列番号 28); R M H L R S L G (配列番号 29); L A A P L G L L (配列番号 30); A V G L L A P P (配列番号 31); L L A P S H R A (配列番号 32); P A G L W L D P (配列番号 33); 及び/又は I S S G L S S (配列番号 159)から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0464】

いくつかの実施形態によれば、C M 1 及び/又は C M 2 の少なくとも 1 つは、配列番号 364 - 370、379 - 393、402 - 409、420 - 424、434、435、450 - 452、457、470 - 472、474 及び 483 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0465】

いくつかの実施形態によれば、C M 1 及び/又は C M 2 の少なくとも 1 つは、配列番号 328, 336 - 339 及び 348 - 351 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0466】

いくつかの実施形態によれば、第 1 切断可能部分 (C M 1) 配列を切断するプロテアーゼは、組織において多重特異的活性化可能抗体における A B 1 の標的と共に在し、そしてプロテアーゼは、多重特異的活性化可能抗体がそのプロテアーゼに暴露される場合、多重特異的活性化可能抗体における C M 1 を切断する。

【0467】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、複数の切断可能部分配列を含み、そして少なくとも 1 つの切断可能部分配列を切断するプロテアーゼは、組織において多重特異的活性化可能抗体における A B 領域の少なくとも 1 つの領域の標的と共に在され、そしてプロテアーゼは、多重特異的活性化可能抗体がプロテアーゼに暴露される場合、多重特異的活性化可能抗体における C M を切断する。

【0468】

いくつかの実施形態によれば、各 C M、例えば C M 1 及び少なくとも C M 2 は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B 領域中の 1 つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていない A B の平衡解離定数よりも少なくとも 2 倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A B はその標的を結合する。

【0469】

いくつかの実施形態によれば、各 C M、例えば C M 1 及び少なくとも C M 2 は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B 領域中の 1 つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていない A B の平衡解離定数よりも少なくとも 3 倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A B はその標的を結合する。

【0470】

いくつかの実施形態によれば、各 C M、例えば C M 1 及び少なくとも C M 2 は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B 領域中の 1 つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていない A B の平衡解離定数よりも少なくとも 4 倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A B はその標的を結合する。

【0471】

いくつかの実施形態によれば、各 C M、例えば C M 1 及び少なくとも C M 2 は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B 領域中の 1 つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていない A B の平衡解離定数よりも少なくとも 5 倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A B はその標的を結合する。

【0472】

いくつかの実施形態によれば、各 C M、例えば C M 1 及び少なくとも C M 2 は、多重特

10

20

30

40

50

異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B 領域中の 1 つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていない A B の平衡解離定数よりも少なくとも 10 倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A B はその標的を結合する。

【 0 4 7 3 】

いくつかの実施形態によれば、各 C M、例えば C M 1 及び少なくとも C M 2 は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B 領域中の 1 つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていない A B の平衡解離定数よりも少なくとも 20 倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A B はその標的を結合する。 10

【 0 4 7 4 】

いくつかの実施形態によれば、各 C M、例えば C M 1 及び少なくとも C M 2 は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B 領域中の 1 つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていない A B の平衡解離定数よりも少なくとも 40 倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A B はその標的を結合する。

【 0 4 7 5 】

いくつかの実施形態によれば、各 C M、例えば C M 1 及び少なくとも C M 2 は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B 領域中の 1 つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていない A B の平衡解離定数よりも少なくとも 50 倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A B はその標的を結合する。 20

【 0 4 7 6 】

いくつかの実施形態によれば、各 C M、例えば C M 1 及び少なくとも C M 2 は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B 領域中の 1 つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていない A B の平衡解離定数よりも少なくとも 100 倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A B はその標的を結合する。

【 0 4 7 7 】

いくつかの実施形態によれば、各 C M、例えば C M 1 及び少なくとも C M 2 は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B 領域中の 1 つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていない A B の平衡解離定数よりも少なくとも 200 倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A B はその標的を結合する。 30

【 0 4 7 8 】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各 C M は、15 個までの長さのアミノ酸のポリペプチドである。

【 0 4 7 9 】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における少なくとも 1 つの C M は、配列番号 14 - 33 及び 159 化らなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、そして他の C M は、アミノ酸配列 L S G R S D N H (配列番号 26) を含む。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における少なくとも 1 つの C M は、アミノ酸配列 L S G R S D N H (配列番号 26) を含む。いくつかの実施形態によれば、少なくとも 1 つの切断可能部分が、特定のプロテアーゼ、例えば多重特異的活性化可能抗体の少なくとも 1 つの標的と共に在化されることが知られているプロテアーゼとの使用のために選択される。例えば、本開示の多重特異的活性化可能抗体に使用するための適切な切断可能部分は、少なくともプロテアーゼ、例えばウロキナーゼ、レグマイン及び / 又はマトリプターゼ (また、M T - S P 1 又は M T S S P 1 として本明細書において言及される) により切断される。いくつかの実施形態によれば、適切な切断可能部分は、次の配列の少なくとも 1 つを含む : T G R G P S W V (配列番号 34); S A R G P S R W (配列番号 35) 40

; T A R G P S F K (配列番号 3 6); L S G R S D N H (配列番号 3 7); G G W H T G R N (配列番号 3 8); H T G R S G A L (配列番号 3 9); P L T G R S G G (配列番号 4 0); A A R G P A I H (配列番号 4 1); R G P A F N P M (配列番号 4 2); S S R G P A Y L (配列番号 4 3); R G P A T P I M (配列番号 4 4); R G P A (配列番号 4 5); G G Q P S G M W G W (配列番号 4 6); F P R P L G I T G L (配列番号 4 7); V H M P L G F L G P (配列番号 4 8); S P L T G R S G (配列番号 4 9); S A G F S L P A (配列番号 1 2 6); L A P L G L Q R R (配列番号 5 0); S G G P L G V R (配列番号 5 1); 及び/又は P L G L (配列番号 5 2)。

【 0 4 8 0 】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における 1 つの C M は、少なくとも 1 つの M M P プロテアーゼのための基質であり、そして、多重特異的活性化可能抗体における他の C M は、表 7 に示されるそれらから成る群から選択されるプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態によれば、プロテアーゼは、u P A、レグマイン、マトリプターゼ、A D A M 1 7、B M P - 1、T M P R S S 3、T M P R S S 4、好中球エラスターーゼ、M M P - 7、M M P - 9、M M P - 1 2、M M P - 1 3 及び M M P - 1 4 から成る群から選択される。いくつかの実施形態によれば、プロテアーゼは、カテプシン、例えば、カテプシン S であるが、但しそれだけには限定されない。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体における各 C M は、u P A (ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子)、レグマイン及びマトリプターゼから成る群から選択されるプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態によれば、プロテアーゼは、u P A を包含する。いくつかの実施形態によれば、プロテアーゼはレグマインを包含する。いくつかの実施形態によれば、プロテアーゼは、マトリプターゼを包含する。いくつかの実施形態によれば、プロテアーゼは、マトリックスマタロプロテイナーゼ (M M P) を包含する。

【 0 4 8 1 】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体中の少なくとも 1 つの C M は、少なくとも 2 つのプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態によれば、各プロテアーゼは、表 7 に示されるそれらからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体中の少なくとも 1 つの C M は、少なくとも 2 つのプロテアーゼのための基質であり、ここでプロテアーゼの 1 つは、u P A、レグマイン及びマトリプターゼから成る群から選択され、そして他のプロテアーゼは、表 7 に示されるそれらから成る群から選択される。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体中の少なくとも 1 つの C M は、u P A、レグマイン及びマトリプターゼから成る群から選択され少なくとも 2 種のプロテアーゼのための基質である。

【 0 4 8 2 】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、第 1 C M (C M 1) 及び第 2 C M (C M 2) を少なくとも含む。いくつかの実施形態によれば、C M 1 及び C M 2 は、M M を A B に連結する単一の切断可能リンカーの一部である。いくつかの実施形態によれば、C M 1 は、M M 1 を A B 1 に連結する切断可能リンカーの一部であり、そして C M 2 は、M M 2 を A B 2 に連結する別の切断可能リンカーの一部である。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、2 以上の C M を含む。いくつかの実施形態によれば、そのような多重特異的活性化可能抗体は、2 つ以上の C M 及び 2 つ以上の M M を含む。いくつかの実施形態によれば、C M 1 及び C M 2 は、それぞれ、1 5 個以下の長さのアミノ酸のポリペプチドである。いくつかの実施形態によれば、第 1 C M 及び第 2 C M の少なくとも 1 つは、表 7 に列挙されるそれらから成る群から選択されるプロテアーゼのための基質として機能するポリペプチドである。いくつかの実施形態によれば、第 1 C M 及び第 2 C M の少なくとも 1 つは、u P A、レグマイン及びマトリプターゼから成る群から選択されるプロテアーゼのための基質としても機能するポリペプチドである。いくつかの実施形態によれば、第 1 C M は、標的組織において、u P A、レグマイン及びマトリプターゼから成る群から選択される第 1 切断剤により切断され、そして第 2 C M は、標的

10

20

30

40

50

組織において、第2切断剤により切断される。いくつかの実施形態によれば、他のプロテアーゼは、表7に示されるそれらから成る群から選択される。いくつかの実施形態によれば、第1切断剤及び第2切断剤は、表7に列挙されるそれらから成る群から選択される同じプロテアーゼであり、そして第1CM及び第2CMは、酵素のための異なった基質である。いくつかの実施形態によれば、第1切断剤及び第2切断剤は、uPA、レグマイン及びマトリプターゼから成る群から選択される同じプロテアーゼであり、そして第1CM及び第2CMは、酵素のための異なった基質である。いくつかの実施形態によれば、第1切断剤及び第2切断剤は、表7に列挙される群から選択される同じプロテアーゼであり、そして第1CM及び第2CMは同じ基質である。いくつかの実施形態によれば、第1切断剤及び第2切断剤は、異なったプロテアーゼである。いくつかの実施形態によれば、第1切断剤及び第2切断剤は、表7に示されるそれらから成る群から選択される異なったプロテアーゼである。いくつかの実施形態によれば、第1切断剤及び第2切断剤は、標的組織において共局在される。いくつかの実施形態によれば、第1CM及び第2CMは、標的組織において少なくとも1つの切断剤により切断される。

【0483】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、プロテアーゼに暴露され、そして切断され、結果的に、活性化されたか又は切断された状態下で、活性化された多重特異的活性化可能抗体は、プロテアーゼがCMを切断した後、LP2及び/又はCM配列の少なくとも1部を含むL鎖アミノ酸配列を含む。

【0484】

本開示はまた、標的を特異的に結合する第1抗体又はフラグメント(AB1)、及び第2抗体又はフラグメント(AB2)を少なくとも含む多重特異的活性化可能抗体を包含する組成物及び方法も提供し、ここで少なくとも多重特異的活性化可能抗体における第1ABは、AB1のその標的を結合する能力を低めるマスキング部分(MM1)にカップリングされている。いくつかの実施形態によれば、各ABは、その対応するABの各標的を結合する能力を低めるMMにカップリングされる。例えば多重特異的活性化可能抗体の実施形態によれば、AB1は、AB1のその標的を結合する能力を低める第1マスキング部分(MM1)にカップリングされ、そしてAB2は、AB2のその標的を結合する能力を低める第2マスキング部分(MM2)にカップリングされる。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、2つ以上のAB領域を含み；そのような実施形態によれば、AB1は、AB1のその標的を結合する能力を低める第1マスキング部分(MM1)にカップリングされ、AB2は、AB2のその標的を結合する能力を低める第2マスキング部分(MM2)にカップリングされ、AB3は、AB3のその標的を結合する能力を低める第3マスキング部分(MM3)にカップリングされそして多重特異的活性化可能抗体における各ABについても同様である。

【0485】

いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、プロテアーゼのための基質である少なくとも1つの切断可能部分(CM)をさらに含み、ここでCMはMMをABに連結する。例えば、いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、標的を特異的に結合する第1抗体又は抗体フラグメント(AB1)及び第2抗体又は抗体フラグメント(AB2)を少なくとも含み、多重特異的活性化可能抗体における少なくとも第1ABは、AB1のその標的を結合する能力を低めるマスキング部分(MM1)に、切断可能部分(CM1)を介してカップリングされる。いくつかの多重特異的活性化可能抗体の実施形態によれば、AB1はCM1を介してMM1にカップリングされ、そしてAB2は、AB2のその標的を結合する能力を低める第2マスキング部分(MM2)に、第2切断可能部分(CM2)を介してカップリングされる。いくつかの実施形態によれば、多重特異的活性化可能抗体は、2以上のAB領域を含み；これらの実施形態のいくつかによれば、AB1はCM1を介してMM1にカップリングされ、AB2はCM2を介してMM2にカップリングされ、そしてAB3は第3切断可能部分(CM3)を介して、AB3のその標的を結合する能力を低める第3マスキング部分(MM3)にカップリングされ、そし

て多重特異的活性化可能抗体における各 A B についても同様である。

【 0 4 8 6 】

非結合立体部分又は非結合立体部分のための結合パートナーを有する活性化可能抗体
本開示はまた、非結合立体部分 (N B) 、又は非結合立体部分のための結合パートナー
(B P) を含む活性化可能抗体を提供し、ここで B P は、活性化可能抗体に N B をリクルートするか、又は他方では、引き付ける。本明細書に提供される活性化可能抗体は例えば
、非結合立体部分 (N B) 、切断可能リンカー (C L) 及び標的を結合する抗体又は抗体
フラグメント (A B) を含む活性化可能抗体；非結合立体部分 (B P) のための結合パートナー、 C L 及び A B 1 を含む活性化可能抗体；及び N B がリクルートされている B P 、
C L 、及び標的を結合する A B を含む活性化可能抗体を包含する。 N B が活性化可能抗体
の C L 及び A B に共有結合されているか、又は活性化可能抗体の C L 及び A B に共有結合
される B P との相互作用により会合される活性化可能抗体は、「 N B - 含有活性化可能抗
体」として、本明細書において言及される。活性化可能又はスイッチング可能とは、活性
化可能抗体が、阻害された、マスキングされた、又は切断されていない状態下にある場合
、標的への結合の第 1 レベル（第 1 コンホーメーション）、及び阻害されていない、マスキ
ングされていない、及び / 又は切断された状態下にある場合、標的への結合の第 2 レベル
（すなわち、第 2 コンホーメーション）を示し、ここで標的結合の第 2 レベルは、結合の第
1 レベルよりも大きいことを意味する。活性化可能抗体組成物は、従来の抗体療法に比べ
て、高められた生物学的利用能及びより良好な生体分布を示すことができる。
10

【 0 4 8 7 】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、 A B がマスキングされていないか、
又は他方では、そのような部位への結合から阻害されていない場合、非治療部位及び / 又
は非診断部位の結合に起因する、低められた毒性及び / 又は有害な副作用を提供する。
20

【 0 4 8 8 】

1 つの実施形態によれば、活性化可能抗体は、非結合立体部分 (N B) ；切断可能リン
カー (C L) ；及び標的に対して特異的に結合する少なくとも抗体又は抗体フラグメント
(A B) を含み、ここで N B は、 A B に対して特異的に結合しないポリペプチドであり；
C L は、酵素のための基質 (S) を含むポリペプチドであり； C L は、切断されていない
状態で、 N B がその標的への A B の結合を妨害し、そして切断された状態で、 N B が A B
のその標的への結合を妨害しないよう位置決定され；そして N B は、酵素による C L の切
断を阻害しない。本明細書及びそれを通じて使用される場合、用語、ポリペプチドとは、
少なくとも 2 つのアミノ酸残基を含む任意のポリペプチド、例えばより大きなポリペプチ
ド、完全長タンパク質及びそれらのフラグメントを意味し、そして用語、ポリペプチドとは、
単鎖ポリペプチドに制限されず、そして複数ユニット、例えば多鎖ポリペプチドを包
含することができる。ポリペプチドが短い長さのもの、例えば合計 50 個以下のアミノ酸
のものである場合、用語、ペプチド及びポリペプチドは、本明細書においては、交換可能
的に使用され、そしてポリペプチドがより長いもの、例えば 50 個又はそれ以上のアミノ
酸のものである場合、用語、ポリペプチド及びタンパク質は、本明細書においては、交換
可能的に使用される。
30

【 0 4 8 9 】

1 つの実施形態によれば、活性化可能抗体は、非結合立体部分 (N B) ；切断可能リン
カー (C L) ；及び標的に対して特異的に結合する少なくとも抗体又は抗体フラグメント
(A B) を含み、ここで (i) N B は、 A B に対して特異的に結合しないポリペプチドで
あり； (ii) C L は、酵素のための基質 (S) を含む、 50 個までの長さのアミノ酸のポ
リペプチドであり； (iii) C L は、切断されていない状態で、 N B がその標的への A B
の結合を妨害し、そして切断された状態で、 N B が A B のその標的への結合を妨害しない
よう位置決定され；そして (iv) N B は、酵素による C L の切断を阻害しない。例えば、
C L は、次の長さのアミノ酸を有する： 15 個までの長さのアミノ酸、 20 個までの長さ
のアミノ酸、 25 個までの長さのアミノ酸、 30 個までの長さのアミノ酸、 35 個までの
長さのアミノ酸、 40 個までの長さのアミノ酸、 45 個までの長さのアミノ酸、 50 個ま
40

での長さのアミノ酸、10 - 50 の範囲の長さのアミノ酸、20 - 50 の範囲の長さのアミノ酸、25 - 50 の範囲の長さのアミノ酸、30 - 50 の範囲の長さのアミノ酸、35 - 50 の範囲の長さのアミノ酸、40 - 50 の範囲の長さのアミノ酸、45 - 50 の範囲の長さのアミノ酸、10 - 40 の範囲の長さのアミノ酸、15 - 40 の範囲の長さのアミノ酸、20 - 40 の範囲の長さのアミノ酸、25 - 40 の範囲の長さのアミノ酸、30 - 40 の範囲の長さのアミノ酸、35 - 40 の範囲の長さのアミノ酸、10 - 30 の範囲の長さのアミノ酸、15 - 30 の範囲の長さのアミノ酸、20 - 30 の範囲の長さのアミノ酸、25 - 30 の範囲の長さのアミノ酸、10 - 20 の範囲の長さのアミノ酸、又は10 - 15 の範囲の長さのアミノ酸。

【0490】

10

1つの実施形態によれば、活性化可能抗体は、非結合立体部分（N B）；切断可能リンカー（C L）；及び標的に対して特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント（A B）を含み、ここで(i) N Bは、A Bに対して特異的に結合しないポリペプチドであり；(ii) C Lは、酵素のための基質（S）を含むポリペプチドであり；(iii) C Lは、切断されていない状態で、N Bがその標的へのA Bの結合を妨害し、そして切断された状態で、N BがA Bのその標的への結合を妨害しないよう位置決定され；(iv) N Bは、酵素によるC Lの切断を阻害せず；そして(v) 多重特異的活性化可能抗体の少なくとも一部が、切断されていない状態で、次の通りのN - 末端からC - 末端側に構造配置を有する：N B - C L - A B又はA B - C L - N B。

【0491】

20

1つの実施形態によれば、活性化可能抗体は、非結合立体部分（N B）；切断可能リンカー（C L）；及び標的に対して特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント（A B）を含み、ここで(i) N Bは、A Bに対して特異的に結合しないポリペプチドであり；(ii) C Lは、酵素のための基質（S）を含むポリペプチドであり；(iii) C Lは、切断されていない状態で、N Bがその標的へのA Bの結合を妨害し、そして切断された状態で、N BがA Bのその標的への結合を妨害しないよう位置決定され；そして切断されていない活性化可能抗体におけるN Bが、切断されたA Bのその標的を結合する能力に比べて、A Bのその標的を結合する能力を、少なくとも50%、例えば少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも100%、低め；そして(iv) N Bは、酵素によるC Lの切断を阻害しない。A Bのその標的を結合する能力の低下は、例えば、本明細書に記載されるようなアッセイ、又はインビトロ標的置換アッセイ、例えば国際公開第2009/025846号及び第2010/081173号に記載されるアッセイを用いて、決定される。

【0492】

30

1つの実施形態によれば、活性化可能抗体は、非結合立体部分（N B）のための結合パートナー（B P）；切断可能リンカー（C L）；及び標的に対して特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント（A B 1）を含み、ここでB Pは、N Bに暴露される場合、そのN Bに結合するポリペプチドであり；N Bは、A Bに対して特異的に結合しないポリペプチドであり；C Lは、酵素のための基質（S）を含むポリペプチドであり；C Lは、N Bの存在下で、切断されていない状態で、N Bがその標的へのA B 1の結合を妨害し、そして切断された状態で、N BがA B 1のその標的への結合を妨害せず、そしてB PがA Bの標的への結合を妨害しないよう位置決定され；そしてN B及びB Pは、酵素によるC Lの切断を阻害しない。この実施形態のいくつかの例によれば、活性化可能抗体のB Pは、任意には、N Bに結合される。1つの実施形態によれば、N Bは、インビボで、活性化可能抗体のB Pによりリクルートされる。

【0493】

40

それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、活性化可能抗体は、組成物として製剤化される。それらの実施形態のいくつかによれば、組成物はまた、N Bも含み、ここでN Bは、B P、C L及びA Bを含む活性化可能抗体と同時製剤化される

50

。この実施形態のいくつかの例によれば、B Pは、アルブミン結合ペプチド、フィブリノーゲン結合ペプチド、フィブロネクチン結合ペプチド、ヘモグロビン結合ペプチド、トランスフェリン結合ペプチド、免疫グロブリンDメイン結合ペプチド及び他の血清タンパク質結合ペプチドから成る群から選択される。

【0494】

それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、N Bは可溶性球状タンパク質である。それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、N Bは血流において循環するタンパク質である。それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、N Bは、アルブミン、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、ヘモグロビン、トランスフェリン、免疫グロブリンDメイン及び他の血清タンパク質から成る群から選択される。

10

【0495】

それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、C Lは、プロテマーゼのための基質を含むポリペプチドである。それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、プロテアーゼは、組織において、その標的と共に在され、そしてプロテアーゼは、活性化可能抗体がプロテアーゼに暴露される場合、活性化可能抗体におけるC Lを切断する。それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、C Lは、50個までの長さのアミノ酸のポリペプチドである。それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、C Lは、15個までの長さのアミノ酸、例えば3個の長さのアミノ酸、4個の長さのアミノ酸、5個の長さのアミノ酸、6個の長さのアミノ酸、7個の長さのアミノ酸、8個の長さのアミノ酸、9個の長さのアミノ酸、10個の長さのアミノ酸、11個の長さのアミノ酸、12個の長さのアミノ酸、13個の長さのアミノ酸、14個の長さのアミノ酸、又は15個の長さのアミノ酸を有する基質(S)を含むポリペプチドである。

20

【0496】

それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、活性化可能抗体は、切断されていない状態で次の通りのN - 末端からC - 末端側に構造配置を有する：N B - C L - A B、A B - C L - N B、B P - C L - A B又はA B - C L - B P。活性化可能抗体がB Pを含み、そして活性化可能抗体がその対応するN Bの存在下にある実施形態によれば、活性化可能抗体は、切断されていない状態で次の通りのN - 末端からC - 末端側に構造配置を有する：N B : B P - C M - A B又はA B - C M - B P : N B、ここで「:」は、N BとB Pとの間の相互作用、例えば結合を表す。

30

【0497】

それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、活性化可能抗体は、所定の標的を特異的に結合し、そしてモノクローナル抗体、ドメイン抗体、単鎖、F abフラグメント、F(ab)₂フラグメント、scFv、scab、dAb、单一のドメインH鎖抗体、及び单一のドメインL鎖抗体である、抗体又はその抗原結合抗体を包含する。いくつかの実施形態によれば、その標的を結合する、そのような抗体又はその免疫学的活性フラグメントは、マウス、他のゲッシ動物、キメラ、ヒト化、又は完全ヒトモノクローナル抗体である。

40

【0498】

それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、活性化可能抗体は、本明細書に提供されるアミノ酸配列を含む可変H鎖領域及び本明細書に提供されるアミノ酸配列を含む可変L鎖領域の組合せを含む。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、本明細書に提供されるアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上、同一であるアミノ酸配列を含む可変H鎖領域及び本明細書に提供されるアミノ酸配列に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上、同一であるアミノ酸配列を含む可変L鎖領域の組合せを含む。

【0499】

50

それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、活性化可能抗体はまた、A Bに接合される剤も含む。いくつかの実施形態によれば、剤は治療剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は抗腫瘍剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は毒素又はそのフラグメントである。いくつかの実施形態によれば、剤は、リンカーを介してA Bに接合される。いくつかの実施形態によれば、リンカーは切断可能リンカーである。いくつかの実施形態によれば、剤は、非切断可能リンカーを介してA Bに接合される。いくつかの実施形態によれば、剤は、表3に列挙される群から選択された剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は、核酸損傷剤、例えばDNAアルキル化剤又はインターラーカー、又は他のDNA損傷剤である。いくつかの実施形態によれば、剤はドラスタチンである。いくつかの実施形態によれば、剤はアウリスタチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤は、アウリスタチンE又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤は、モノメチルアウリスタチンE(MMAE)である。いくつかの実施形態によれば、剤は、モノメチルアウリスタチンD(MMAD)である。いくつかの実施形態によれば、剤は、メイタンシノイド又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤はDM1又はDM4である。いくつかの実施形態によれば、剤はデュオカルマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤はカリケアマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤はピロロベンゾジアゼピンである。10

【0500】

それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、活性化可能抗体はまた、検出可能部分も含む。いくつかの実施形態によれば、検出可能部分は、診断剤である。20

【0501】

それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、活性化可能抗体はまた、スペーサーも含む。それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、活性化可能抗体はまた、シグナルペプチドも含む。いくつかの実施形態によれば、シグナルペプチドは、スペーサーを介して活性化可能抗体に接合される。それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、スペーサーは、活性化可能抗体のMMに直接、結合される。30

【0502】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、その対応する抗体の半減期よりも長く；例えば、活性化可能抗体のpKは、その対応する抗体のpKよりも長い。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、その対応する多抗体の半減期に類似する。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも15日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも12日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも11日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも9日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも8日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも7日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも6日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも5日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも4日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも3日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、生物に投与される場合、少なくとも2日である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも24時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも20時間である。4050

くつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 18 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 16 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 14 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 12 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 10 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 8 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 7 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 6 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 4 時間である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体の血清半減期は、生物に投与される場合、少なくとも 3 時間である。

【 0503 】

本開示はまた、それらの活性化可能抗体の何れかをコードする単離された核酸分子、及びそれらの単離された核酸配列を含むベクターも提供する。本開示は、活性化可能抗体の発現を導く条件下で、そのような核酸配列を含む細胞を培養することによる、活性化可能抗体の生成方法を提供する。いくつかの実施形態によれば、前記細胞は、そのようなベクターを含む。

【 0504 】

標的に対する NB - 含有活性化可能抗体の解離例数 (Kd) は、AB が NB 又は NB : BP と関連しない場合、標的に対する AB の Kd よりも高い。標的に対する NB - 含有活性化可能抗体の解離定数は、標的に対する親 AB の Kd よりも高い。例えば、標的に対する NB - 含有活性化可能抗体の Kd は、AB が NB 又は NB : BP に関連しない場合、AB の Kd、又は標的に対する親 AB の Kd よりも、少なくとも 10、20、25、40、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000、10,000,000,000、50,000,000,000 又はそれ以上、又は 5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1000,000、10,000-100,000、10,000-1000,000、100,000-1,000,000 又は 100,000-10,000 倍、高い。逆に、標的に対する NB - 含有活性化可能抗体の結合親和性は、AB が NB 又は NB : BP と関連しない場合、AB の結合親和性よりも低く、又は標的に対する親 AB の結合親和性よりも低い。例えば、標的に対する NB - 含有活性化可能抗体の結合親和性は、AB が NB 又は NB : BP に関連しない場合、AB の結合親和性、又は標的に対する親 AB の結合親和性よりも、少なくとも 10、20、25、40、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000,000、100,000,000、500,000,000、10,000,000,000、50,000,000,000 又はそれ以上、又は 5-10、10-100、10-1,000、10-10,000、10-100,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1000,000、10,000-100,000、10,000-1000,000、100,000-1,000,000 又は 100,000-10,000 倍、高い。

10

20

30

40

50

, 0 0 0 , 0 0 0 、 1 0 0 , 0 0 0 - 1 , 0 0 0 , 0 0 0 又は 1 0 0 , 0 0 0 - 1 0 ,
0 0 0 , 0 0 0 倍、 低い。

【 0 5 0 5 】

N B - 含有活性化可能抗体が、その標的の存在下にある場合、 A B のその標的に対する特異的結合は、 A B が N B 又は N B : B P に関連しない場合、 A B の特異的結合に比べて、低められるか、又は阻害される。 N B - 含有活性化可能抗体が、その標的の存在下にある場合、 A B のその標的に対する特異的結合は、親 A B のその標的への特異的結合に比べて、低められるか、又は阻害される。 N B 又は N B : B P に関連しない A B の結合、又は親 A B のその標的への結合に比較される場合、その標的を結合する N B - 含有活性化可能抗体の能力は、例えばインビトロ及び / 又はインビボで測定される場合、その標的を結合する N B - 含有活性化可能抗体の能力は、インビボ又はインビトロアッセイで測定される場合、少なくとも 2 、 4 、 6 、 8 、 1 2 、 2 8 、 2 4 、 3 0 、 3 6 、 4 8 、 6 0 、 7 2 、 8 4 又は 9 6 時間、又は 5 、 1 0 、 1 5 、 3 0 、 4 5 、 6 0 、 9 0 、 1 2 0 、 1 5 0 又は 1 8 0 日、又は 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、又は 1 2 か月又はそれ以上で、少なくとも 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 及びさらに 1 0 0 % 、低められ得る。
10

【 0 5 0 6 】

N B - 含有活性化可能抗体が、その標的の存在下にあるが、しかし修飾剤（例えば、プロテアーゼ又は他の酵素）の存在下ではない場合、 A B のその標的に対する特異的結合は、 A B が N B 又は N B : B P に関連しない場合、 A B の特異的結合に比べて、低められるか、又は阻害される。 N B - 含有活性化可能抗体が、その標的の存在下にあるが、しかし修飾剤（例えば、プロテアーゼ、他の酵素、還元剤又は光）の存在下ではない場合、 A B のその標的に対する特異的結合は、親 A B のその標的への特異的結合に比べて、低められるか、又は阻害される。 N B 又は N B : B P に関連しない A B の結合、又は親 A B のその標的への結合に比較される場合、その標的を結合する N B - 含有活性化可能抗体の能力は、例えはインビトロ及び / 又はインビボで測定される場合、その標的を結合する N B - 含有活性化可能抗体の能力は、インビボ又はインビトロアッセイで測定される場合、少なくとも 2 、 4 、 6 、 8 、 1 2 、 2 8 、 2 4 、 3 0 、 3 6 、 4 8 、 6 0 、 7 2 、 8 4 又は 9 6 時間、又は 5 、 1 0 、 1 5 、 3 0 、 4 5 、 6 0 、 9 0 、 1 2 0 、 1 5 0 又は 1 8 0 日、又は 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、又は 1 2 か月又はそれ以上で、少なくとも 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 及びさらに 1 0 0 % 、低められ得る。
20
30

【 0 5 0 7 】

それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、活性化可能抗体はまた、活性化可能抗体接合体を生成するために、 A B に接合される剤も含む。活性化可能抗体接合体のいくつかの実施形態によれば、剤は治療剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は診断剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は検出可能マーカーである。活性化可能抗体接合体のいくつかの実施形態によれば、剤は抗腫瘍剤である。活性化可能抗体接合体のいくつかの実施形態によれば、剤は毒素又はそのフラグメントである。活性化可能抗体接合体のいくつかの実施形態によれば、剤は、リンカーを介して A B に接合される。活性化可能抗体接合体のいくつかの実施形態によれば、リンカーは切断可能リンカーである。いくつかの実施形態によれば、剤は、非切断可能リンカーを介して A B に接合される。いくつかの実施形態によれば、剤は、微小管阻害剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は、核酸損傷剤、例えば D N A アルキル化剤又はインターラーカーティー、又は他の D N A 損傷剤である。いくつかの実施形態によれば、剤は、表 3 に列挙される群から選択された剤である。いくつかの実施形態によれば、剤はドラスタチンである。いくつかの実施形態によれば、剤はアウリスタチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤は、アウリスタチン E 又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、
40
50

剤は、モノメチルアウリスタチンE（MMAE）である。いくつかの実施形態によれば、剤は、モノメチルアウリスタチンD（MMAD）である。いくつかの実施形態によれば、剤は、メイタンシノイド又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤はDM1又はDM4である。いくつかの実施形態によれば、剤はデュオカルマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば、剤はカリケアマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態によれば剤はピロロベンゾジアゼピンである。

【0508】

それらの活性化可能抗体実施形態の何れかのいくつかの例によれば、活性化可能抗体は、二重-標的結合活性化可能抗体である。そのような二重標的結合活性化可能抗体は、同じが又は異なった標的結合できる2個のAbを含む。特定の実施形態によれば、二重-標的化活性化可能抗体は、二重特異的抗体又はそのフラグメントを含む。10

【0509】

二重標的結合活性化可能抗体は、活性化可能抗体のABに結合できる1つ又は両標的と共に標的組織において共局在される切断剤により切断できるCLを有するよう企画される。同じが又は異なった標的に対する複数のABを有する二重標的結合活性化可能抗体は、複数のCLを有するよう企画され得、ここで第1CLは第1標的組織において切断剤により切断でき、そして第2CLは、第2標的組織において切断剤により切断でき、そして1又は2以上の標的が活性化可能抗体のABに結合する。1つの実施形態によれば、第1及び第2標的組織は、例えば、生物における異なった部位で、空間的に分離されている。1つの実施形態によれば、第1及び第2標的組織は、一時的に分離された同じ組織であり、例えば2種の異なった時点で同じ組織であり、例えば第1時点は、組織が初期段階の腫瘍である場合であり、そして第2時点は、組織が後期段階の腫瘍である場合である。20

【0510】

本開示はまた、本明細書に記載される活性化可能抗体をコードする核酸分子を提供する。本開示はまた、それらの核酸を含むベクターも提供する。本明細書に記載される活性化可能抗体は、活性化可能抗体の発現を導く条件下で、それらの核酸分子又はベクターを含む細胞を培養することにより生成され得る。

【0511】

本開示はまた、活性化可能抗体の製造方法も提供する。1つの実施形態によれば、前記方法は、(a)活性化可能抗体の発現を導く条件下で、活性化可能抗体をコードする核酸コンストラクトを含む細胞を培養し、ここで活性化可能抗体は、(i)非結合立体部分(NB)；(ii)切断可能リンカー(CL)；及び(iii)標的を特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント(AB)を含み、ここで(1)NBはABに対して特異的に結合せず；(2)CLは、酵素のための基質(S)を含むポリペプチドであり；(3)CLは、切断されていない状態で、NBがABの標的への結合を妨害し、そして切断された状態で、NBがABの標的への結合を妨害しないよう、位置決定され；そして(4)NBが酵素によるCLの切断を阻害しない；そして(b)活性化可能抗体を回収する段階を包含する。30

【0512】

別の実施形態によれば、前記方法は、(a)活性化可能抗体の発現を導く条件下で、活性化可能抗体をコードする核酸コンストラクトを含む細胞を培養し、ここで活性化可能抗体は、(i)非結合立体部分(NB)のための結合パートナー(BP)；(ii)切断可能リンカー(CL)；及び(iii)標的を特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント(AB)を含み、ここで(1)NBはABに対して特異的に結合せず；(2)CLは、酵素のための基質(S)を含むポリペプチドであり；(3)CLは、切断されていない状態で、及びNBの存在下で、NBがABの標的への結合を妨害し、そして切断された状態で、NBがABの標的への結合を妨害せず、そしてBPがABの標的への結合を妨害しないよう、位置決定され；そして(4)NBが酵素によるCLの切断を阻害しない；そして(b)活性化可能抗体を回収する段階を包含する。この実施形態のいくつかの例によれば、活性化可能抗体のBPは、NBに結合される。4050

【 0 5 1 3 】**活性化可能抗体及び接合された活性化可能抗体の使用**

本開示に従っての治療実態の投与が、改善された伝達、送達、耐性及び同様のものを提供するために製剤中に組込まれる、適切な担体、賦形剤及び他の剤と共に投与されるであろうことは理解されるであろう。多数の適切な製剤は、全ての薬剤師に知られている処方に見出される得る：Blaug, Seymour による、Remington's Pharmaceutical Sciences (1 5th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), 特に、Chapter 87。それらの製剤は例えば、粉末、ペースト、軟膏、ジェリー、ワックス、オイル、脂質、脂質（カチオン又はアニオン性）含有小胞（例えば、リポフェクチン（登録商標））、DNA接合体、無水吸収性ペースト、水中油及び油中水エマルジョン、エマルジョンカーボワックス（種々の分子量のポリエチレングリコール）、半固体ゲル及び半固体混合物含有カーボワックスを包含する。前述の混合物の何れでも、本開示に従っての治療及び療法において適切であるが、但し、製剤中の活性成分は、製剤により不活性化されず、そして製剤は投与経路と生理学的に適合し、且つ許容できるべきである。また、薬剤師に良く知られている、製剤、賦形剤及び担体に関連する追加の情報については、またBaldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998)及びこそこにおける引用文献を参照のこと。10
20

【 0 5 1 4 】

接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体を含む、本開示の治療製剤は、異常標的の発現及び／又は活性に関連する疾患又は障害を予防し、治療し又は他方では、改善するために使用される。例えば、接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体を含む、本開示の治療製剤は、炎症、炎症性障害、自己免疫疾患及び／又は癌又は他の腫瘍状態を治療するか、又は他方では、改善するために使用される。いくつかの実施形態によれば、癌は、標的が発現される、固形腫瘍又は造血器悪性腫瘍である。いくつかの実施形態によれば、癌は、標的が発現される固形腫瘍である。いくつかの実施形態によれば、癌は、標的が発現される造血器悪性腫瘍である。いくつかの実施形態によれば、標的是、実質組織（例えば癌における、器官又は組織の機能を、しばしば担持する、器官又は組織の部分）上で発現される。いくつかの実施形態によれば、標的是、細胞、組織又は器官上で発現される。いくつかの実施形態によれば、標的は、間質（すなわち、細胞、組織又は器官の結合支持骨格）上で発現される。いくつかの実施形態によれば、標的は、骨芽細胞上で発現される。いくつかの実施形態によれば、標的は、内皮（血管系）上で発現される。いくつかの実施形態によれば、標的は、癌幹細胞上で発現される。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体が接合されている剤は、微小管阻害剤である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体が接合されている剤は、核酸損傷剤である。30
40

【 0 5 1 5 】

予防、改善又は治療の有効性は、標的の発現及び／又は活性、例えば異常標的の発現及び／又は活性に関連する疾患又は障害を診断するか又は治療するための任意の既知方法に関連して決定される。対象の生存性の延長、又は他方では、対象における標的の発現及び／又は活性、例えば異常標的の発現及び／又は活性に関連する疾患又は障害の進行の遅延は、接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体が臨床的有益性を付与することを示唆する。

【 0 5 1 6 】

接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体は、医薬組成物の形で接合され得る。そのような組成物の調製に関する原理及び考慮事項、及び成分の50

選択の指針は例えば、次の文献に提供される：Remington : The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al, editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement : Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; 及び Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

【0517】

抗体フラグメントが使用されるいくつかの実施形態によれば、標的タンパク質の結合ドメインに対して特異的に結合する最も小さなフラグメントが選択される。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列を結合する能力を保持するペプチド分子が企画され得る。そのようなペプチドは、化学的に合成され得、そして／又は組換えDNA技法により生成され得る。（例えば、Marasco et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993) を参照のこと）。製剤はまた、治療される特定の徵候のために必要な複数の活性化合物、例えば、いくつかの実施形態によれば、お互い悪影響を与えない相補的活性を有するそれらの化合物も含むことができる。いくつかの実施形態によれば、又はさらに、組成物は、その機能を増強する剤、例えば細胞毒性剤、サイトカイン、化学療法剤、又は成長阻害剤を含むことができる。そのような分子は適切には、意図される目的のために効果的である量で、組合して存在する。

【0518】

活性成分は、例えばコアセルベーション技法により、又は界面重合により調製されるマイクロカプセル、例えばそれぞれコロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマイクロエマルジョン中、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン・マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに封入され得る。

【0519】

インビオ投与のために使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、無菌濾過膜を通しての濾過により、容易に達成される。

【0520】

徐放性製剤が調製され得る。徐放性製剤の適切な例は、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスを包含し、ここで前記マトリックスは成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形で存在する。徐放性マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-L-グルタミン酸及びエチル-L-L-グルタノートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-クリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT（登録商標）（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射可能マイクロスフェア）、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸を包含する。ポリマー、例えばエチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸は100日間にわたって分子の放出を可能にするが、特定のヒドロゲルはより短い期間、タンパク質を放出する。

【0521】

いくつかの実施形態によれば、接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体は、検出可能標識を含む。損なわれていない抗体又はそのフラグメント（例えば、Fab、scFv、又はF(ab)₂）が使用される。プローブ又は抗体に関しての用語「標識された」とは、プローブ又は抗体に検出可能物質をカップリングする（すなわち、物理的に連結する）ことによるプローブ又は抗体の直接的標識化、及び直接的に標識される別の試薬との反応性によるプローブ又は抗体の間接的標識化を包含することが意図される。関接的標識化の例は、蛍光標識された二次抗体を用いての一次抗体の検出、及び蛍光標識されたストレプタビシンにより検出され得るよう、ビオチンによるDNA抗体の末端標識化を包含する。用語「生物学的サンプル」とは、対象から単離された組織、細胞及び生物学的流体、並びに対象内に存在する組織、細胞及び流体を包含することが意

10

20

30

40

50

図される。従って、血液、及び血液の画分又は成分、例えば血清、血漿又はリンパは、用語「生物学的サンプル」の使用法内に含まれる。すなわち、本開示の検出方法は、インビトロで及びインビオで生物学的サンプルにおける分析mRNA、タンパク質又はゲノムDNAを検出するために使用され得る。例えば、分析mRNAの検出のためのインビトロ技法は、ノザンハイブリダイゼーション及び現場ハイブリダイゼーションを包含する。分析タンパク質の検出のためのインビトロ技法は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウエスターんプロット、免疫沈降、免疫化学染色及び免疫蛍光を包含する。分析ゲノムDNAの検出のためのインビトロ技法は、サザンハイブリダイゼーションを包含する。イムノアッセイを行うための手順は、例えば“ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”, Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; “Immunoassay”, E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; 及び“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985に記載される。さらに、分析タンパク質の検出のためのインビオ技法は、標識された抗-分析タンパク質抗体を、対象中に導入することを包含する。例えば、抗体は、対象におけるその存在及び位置が標準のイメージング技法により検出され得る放射性マーカーにより標識され得る。

【0522】

本開示の接合された抗体、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体はまた、種々の診断及び予防製剤において有用である。1つの実施形態によれば、接合された抗体、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体が、1又は2以上の前述の障害を発症する危険性がある患者に投与される。1又は2以上の障害に対する患者又は器官の素因は、遺伝子型、血清学的または生化学マーカーを用いて決定され得る。

【0523】

いくつかの実施形態によれば、接合された抗体、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、1又は2以上の前述の障害に関連する臨床学的徴候を有するものとして診断されたヒト個人に投与される。診断に基づいて、接合された抗体、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、臨床学的徴候の効果を軽減するか、又は逆転するためには結合される。

【0524】

接合された抗体、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体はまた、患者サンプルにおける1又は2以上の標的の検出に有用であり、そして従って、診断剤としても有用である。例えば、前記抗体及び/又は活性化可能抗体、及びその接合されたバージョンは、患者サンプルにおける1又は2以上の標的レベルを検出するために、インビトロアッセイ、例えばELISAに使用される。

【0525】

1つの実施形態によれば、本開示の接合された抗体、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、固体支持体（例えば、マイクロタイタープレートのウェル）上に固定される。固定された接合された抗体、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、試験サンプルに存在することができる任意の標的のための捕捉抗体として作用する。固定された抗体と患者サンプルとの接触の前、固体支持体は、分析物の非特異的吸着を妨げるために、ブロッキング剤、例えば乳タンパク質により洗浄され、そして処理される。

【0526】

続いて、ウェルが、抗原を含む疑いのある試験サンプルにより、又は標準量の抗原を含む溶液により処理される。そのようなサンプルは、例えば病理診断であると思われる循環抗原のレベルを有する疑いのある対象からの血清サンプルである。試験サンプル又は標準を洗い流した後、固体支持体が、検出的に標識される二次抗体により処理される。標識された二次抗体は、検出抗体として作用する。検出可能標識のレベルが測定され、そして試験サンプル中の標的抗原の濃度が、標準サンプルから開発される標準曲線との比較により決定される。

10

20

30

40

50

【0527】

インビトロ診断アッセイにおいて本開示の抗体及びその接合されたバージョンを用いて得られる結果に基づいて、標的抗原の発現レベルに基づいて患者における疾患を分類することが可能であることが理解されるであろう。所定の疾患に関して、血液サンプルが、疾患の進行での種々の段階で、及び／又は、疾患の治療処理における種々の点で、診断される対象から採取される。進行又は治療の各段階のために統計学的に有意な結果を提供するサンプル集団を用いて、各段階で特徴的であると思われる抗原の濃度範囲が指定される。

【0528】

接合された抗体、活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体はまた、診断及び／又はイメージング方法に使用され得る。いくつかの実施形態によれば、そのような方法は、インビトロ方法である。いくつかの実施形態によれば、そのような方法は、インビボ方法である。いくつかの実施形態によれば、そのような方法は、現場方法である。いくつかの実施形態によれば、そのような方法は、エクスピボ方法である。例えば、酵素的に切断可能なCMを有する活性化可能抗体は、CMを切断できる酵素の存在又は不在を検出するために使用され得る。そのような活性化可能抗体は、所定の宿主生物の所定の細胞又は組織における活性化された抗体（すなわち、活性化可能抗体の切断に起因する抗体）の測定される蓄積を通して、酵素活性（又は、いくつかの実施形態によれば、高められた還元電位の環境、例えばジスルフィド結合の還元を提供できる環境）のインビボ検出（例えば、定性的又は定量的）を包含する診断に使用される。活性化された抗体のそのような蓄積は、組織が酵素活性（又はCMの性質に依存して、高められた還元電位）を発現するのみならず、また組織が、活性化された抗体が結合する少なくとも1つの標的を発現することを示唆する。

10

【0529】

例えば、CMは、腫瘍の部位で、ウィルス又は細菌感染の部位で、生物学的に限られた部位（例えば、膿瘍、器官等において）で、及び同様の部位で見出されるマトリックス・メタロプロテアーゼのための基質であるよう選択され得る。ABは、標的抗原を結合するものである。本明細書に開示されるような方法を用いて、又は適切な場合、当業者に知られている方法を用いて、検出可能標識（例えば、蛍光標識又は放射性標識又は放射性トレーサー）が、抗体及び／又は活性化可能抗体のAB又は他の領域に接合され得る。適切な検出可能標識は、上記スクリーニング方法に論じられており、そして追加の特定の例が下記に提供される。その活性が目的の疾患組織において高められている MMPと共に、疾患状態のタンパク質又はペプチドに対して特異的なABを用いて、活性化可能抗体は、組織への疾患組織の高められた相対的結合速度を示し、ここでCM特異的抗体は、検出レベルで存在しないか、又は疾患組織においてよりも低いレベルで存在するか、又は不活性である（例えば、チモーゲン形で、又は阻害剤との複合体形で）。小タンパク質及びペプチドは腎濾過システムにより血液から急速にクリアランスされるので、CMに対して特異的な酵素は検出レベルで存在しない（又は非疾患組織においては低レベルで存在するか、又は不活性コンホメーションで存在する）ので、疾患組織における活性化された活性化可能抗体の蓄積が、非疾患組織と比較して増強される。

20

【0530】

30

別の例によれば、活性化可能抗体は、サンプルにおける切断剤の存在又は不在を検出するために使用され得る。例えば、活性化可能抗体が酵素による切断に対して敏感なCMを含む場合、活性化可能抗体は、サンプルにおける還元状態の存在を検出するために（定性的に又は定量的に）、使用され得る。それらの方法での分析を促進するために、活性化可能抗体が、検出可能に標識され得、そして支持体（例えば、固体支持体、例えばスライド又はビーズ）に結合され得る。検出可能標識は、切断に続いて放出されない活性化可能抗体の一部を位置決定し、例えば検出可能標識は、急冷蛍光標識、又は切断が生じるまで、検出できない他の標識であり得る。アッセイは例えば、固定された、検出可能に標識された活性化可能抗体と、酵素及び／又は還元剤を含むことが疑われるサンプルとを、切断が生じるのに十分な時間、接触し、次に、過剰のサンプル及び汚染物を除去するために洗

40

50

浄することにより実施され得る。次に、サンプルにおける切断（例えば、酵素又は還元剤）の存在又は不在が、サンプルとの接触の前、活性化可能抗体の検出可能シグナルの変化、例えばサンプルにおける切断剤による活性化可能抗体の切断のために検出可能シグナルの存在及び／又は上昇により評価される。

【0531】

そのような検出方法は、切断される場合、活性化可能抗体の少なくとも1つのA Bを結合できる標的の存在又は不在の検出を提供するよう適合され得る。従って、アッセイは、切断剤の存在又は不在、及び目的の標的の存在又は不在を評価するよう適合され得る。接断剤の存在又は不在は、上記のような活性化可能抗体の検出可能レベルの存在及び／又は不在により検出され得、そして標的の存在又は不在は、標的 - A B複合体の検出により、例えば検出可能に標識された抗 - 標的抗体の使用により検出され得る。

10

【0532】

活性化可能抗体はまた、例えばプロテアーゼ切断による活性化可能抗体の活性化の検証のために現場イメージング、及び特定の標的への結合においても有用である。現場イメージングは、生物学的サンプル、例えば細胞培養物又は組織切片におけるタンパク質分解活性及び標的の局在化を可能にする技法である。この技法を用いて、検出可能標識（例えば、蛍光標識）の存在に基づいて、所定の標的への結合及びタンパク質分解活性の両者を認識することが可能である。

【0533】

それらの技法は、疾患部位（例えば、腫瘍組織）又は健康組織に由来する何れかの凍結された細胞又は組織において有用である。それらの技法はまた、新鮮な細胞又は組織サンプルにおいても有用である。

20

【0534】

それらの技法によれば、検出可能抗体は、検出可能標識により標識される。検出可能標識は、蛍光色素（例えば、蛍光団、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミンイソチオシアネート（TRITC）、Alexa Fluor（登録商標））、近赤外（NIR）色素（例えば、Qdot（登録商標）ナノクリスタル）、コロイド金属、ハプテン、放射性マーカー、ビオチン、及び增幅試薬、例えばストレプトアビシン、又は酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼ）であり得る。

30

【0535】

標識された活性化可能抗体と共にインキュベートされたサンプルにおける標識の検出は、サンプルが標的を含み、そして活性化可能抗体のCMに対して特異的であるマトリックス・メタロプロテアーゼ（MMP）を含むことを示唆する。いくつかの実施形態によれば、MMPの存在は、広範囲のプロテアーゼ阻害剤、例えば本明細書に記載されるそれらを用いて、及び／又はプロテアーゼに対して特異的である剤、例えばプロテアーゼマトリプターゼ（MT-SP1）に対して特異的であり、そしてマトリプターゼのタンパク質分解活性を阻害する、抗体、例えばA11を用いて、確認され得る；例えば、2010年11月に公開された国際公開第2010/129609号を参照のこと。広範囲のプロテアーゼ阻害剤、例えば本明細書に記載されるそれらを使用することの、及び／又はより選択的阻害剤を用いることによる同じアプローチが、プロテアーゼ、又は活性化可能抗体のCMに対して特異的なMMPを同定するために使用され得る。いくつかの実施形態によれば、標的の存在は、標的、例えば別の抗体に対して特異的である剤を用いて確かめられ得るか、又は検出可能標識が標識されていない標的と競争され得る。いくつかの実施形態によれば、標識されていない活性化可能抗体が、標識された二次抗体又はより複雑な検出システムによる検出と共に使用され得る。

40

【0536】

類似する技法がまた、インビボイメージングのためにも有用であり、ここで対象、例えば哺乳類、例えばヒトにおける蛍光シグナルの検出は、疾患部位が標的を含み、そして活性化可能抗体のCMに対して特異的であるMMPを含むことを示唆する。

【0537】

50

それらの技法はまた、活性化可能抗体におけるプロテアーゼ特異的 CM に基づいて、種々の細胞、組織及び生物におけるプロテアーゼ活性の検出、同定又は特徴づけのために、キットに、及び / 又は試薬としても有用である。

【 0 5 3 8 】

本開示は、種々の診断的及び / 又は予防的適用のためへの抗体及び / 又は活性化可能抗体の使用方法を提供する。例えば、本開示は、(i) 対象又はサンプルと、活性化可能抗体とを接触し、ここで活性化可能抗体は、マスキング部分 (MM) 、切断剤により切断される切断部分 (CM) 、及び目的の標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント (AB) を含み、ここで活性化可能抗体は、未切断、非活性化状態で、次のような、N - 末端から C - 末端への構造配置を有し； MM - CM - AB 又は AB - CM - MM ; ここで、(a) MM は、標的への AB の結合を阻害するペプチドであり、そして MM は、AB の天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そして AB の天然の結合パートナーの変性形ではなく；そして (b) 未切断、非活性化状態で、MM は標的への AB の特異的結合を妨害し、そして切断された、活性化された状態で、MM は、標的への AB の特異的結合を妨害せず、又はそれと競争せず；そして (ii) 対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤及び目的の標的の存在又は非存在を検出するための方法を提供し、ここで対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出レベルが、切断剤及び標的が対象又はサンプルに存在することを示唆し、そして対象又はサンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の検出レベルの不在は、切断剤、標的又は切断剤及び標的の両者が対象又はサンプルに存在せず、そして / 又は十分には存在しないことを示唆する。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、治療剤が接合される活性化できる活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、検出できる標識を含む。いくつかの実施形態によれば、検出できる標識は、AB 上に位置決定される。いくつかの実施形態によれば、対象又はサンプル中の活性化できる活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された活性化可能抗体に対して特異的に結合する、検出可能標識を含む二次試薬を用いて達成される。いくつかの実施形態によれば、前記二次試薬は、検出できる標識を含む抗体である。

【 0 5 3 9 】

本開示は、(i) 対象又はサンプルと、活性化可能抗体とを、目的の標的、例えば前記標的の存在下で、接触し、ここで活性化可能抗体は、マスキング部分 (MM) 、切断剤により切断される切断部分 (CM) 、及び目的の標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント (AB) を含み、ここで活性化可能抗体は、未切断、非活性化状態で、次のような、N - 末端から C - 末端への構造配置を有し； MM - CM - AB 又は AB - CM - MM ; ここで、(a) MM は、標的への AB の結合を阻害するペプチドであり、そして MM は、AB の天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そして AB の天然の結合パートナーの変性形ではなく；そして (b) 未切断、非活性化状態で、MM は標的への AB の特異的結合を妨害し、そして切断された、活性化された状態で、MM は、標的への AB の特異的結合を妨害せず、又はそれと競争せず；そして (ii) 対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤及び目的の標的の存在又は非存在を検出するための方法を提供し、ここで対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出レベルが、切断剤が対象又はサンプルに存在することを示唆し、そして対象又はサンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の検出レベルの不在は、切断剤が対象又はサンプルに存在せず、そして / 又は十分には存在しないことを示唆する。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、治療剤が接合される活性化できる活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、剤に接合されない。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、検出できる標識を含む。いくつかの実施形態によれば、検出できる標識は、AB 上に位置決定される。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

によれば、対象又はサンプル中の活性化できる活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された活性化可能抗体に対して特異的に結合する、検出可能標識を含む二次試薬を用いて達成される。いくつかの実施形態によれば、前記二次試薬は、検出できる標識を含む抗体である。

【 0 5 4 0 】

本開示はまた、対象又はサンプルにおける切断剤及び標的の存在又は非存在の検出方法への使用のためのキットを提供し、(i) 対象又はサンプルと、活性化可能抗体とを接触し；そして(ii) 対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤及び標的の存在又は非存在を検出するためのキットを提供し、ここで前記キットは、マスキング部分(MM)、切断剤により切斷される切斷部分(CM)、及び目的の標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント(AB)を含む活性化可能抗体を、少なくとも含み、ここで活性化可能抗体は、未切斷、非活性化状態で、次のような、N - 末端からC - 末端への構造配置を有し；MM - CM - AB 又はAB - CM - MM ；ここで、(a) MMは、標的へのABの結合を阻害するペプチドであり、そしてMMは、ABの天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そしてABの天然の結合パートナーの変性形ではなく；そして(b) 未切斷、非活性化状態で、MMは標的へのABの特異的結合を妨害し、そして切斷された、活性化された状態で、MMは、標的へのABの特異的結合を妨害せず、又はそれと競争せず、ここで対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出レベルが、切断剤が対象又はサンプルに存在することを示唆し、そして対象又はサンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の検出レベルの不在は、切断剤が対象又はサンプルに存在せず、そして/又は十分には存在しないことを示唆する。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、治療剤が接合される活性化できる活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、剤に接合されない。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、検出できる標識を含む。いくつかの実施形態によれば、検出できる標識は、AB上に位置決定される。いくつかの実施形態によれば、対象又はサンプル中の活性化できる活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された活性化可能抗体に対して特異的に結合する、検出可能標識を含む二次試薬を用いて達成される。いくつかの実施形態によれば、前記二次試薬は、検出できる標識を含む抗体である。

【 0 5 4 1 】

本開示は、(i) 対象又はサンプルと、活性化可能抗体とを接触し、ここで活性化可能抗体は、マスキング部分(MM)、切断剤により切斷される切斷部分(CM)、及び標的及び検出可能標識を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント(AB)を含み、ここで活性化可能抗体は、未切斷、非活性化状態で、次のような、N - 末端からC - 末端への構造配置を有し；MM - CM - AB 又はAB - CM - MM ；ここで、MMは、標的へのABの結合を阻害するペプチドであり、そしてMMは、ABの天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そしてABの天然の結合パートナーの変性形ではなく；そして未切斷、非活性化状態で、MMは標的へのABの特異的結合を妨害し、そして切斷された、活性化された状態で、MMは、標的へのABの特異的結合を妨害せず、又はそれと競争せず；そして検出可能標識が、CMの切斷に続いて放出される活性化可能抗体の部分上に位置し；そして(ii) 対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤及び目的の標的の存在又は非存在を検出するための方法を提供し、ここで対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出レベルが、切断剤及び標的が対象又はサンプルに存在することを示唆し、そして対象又はサンプルにおける検出可能標識の検出レベルの不在は、切断剤が対象又はサンプルに存在しないことを示唆する。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、治療剤が接合される活性化できる活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、剤に接合されない。いくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、検出できる標識を含む。いくつ

10

20

30

40

50

かの実施形態によれば、検出できる標識は、A B 上に位置決定される。いくつかの実施形態によれば、対象又はサンプル中の活性化できる活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された活性化可能抗体に対して特異的に結合する、検出可能標識を含む二次試薬を用いて達成される。いくつかの実施形態によれば、前記二次試薬は、検出できる標識を含む抗体である。

【 0 5 4 2 】

本開示はまた、対象又はサンプルにおける切断剤及び標的の存在又は非存在の検出方法への使用のためのキットを提供し、ここで、前記キットは、対象又は生物学的サンプルとの接触への使用のための、本明細書に記載される活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体（例えば、治療剤が接合されている活性化可能抗体）、及び対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体のレベルを検出するための手段を少なくとも含み、ここで対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出レベルが、切断剤及び標的が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆し、そして対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の検出レベルの不在は、切断剤、標的又は切断剤及び標的の両者が対象又は生物学的サンプルに存在せず、そして/又は十分には存在せず、結果的に、活性化可能抗体の標的結合及び/又はプロテアーゼ切断が対象又は生物学的サンプルにおいて検出され得ないことを示唆する。

【 0 5 4 3 】

本開示は、(i) 対象又は生物学的サンプルと、活性化可能抗体とを、標的の存在下で接触し、そして(ii) 対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤の存在又は非存在を検出するための方法を提供し、ここで対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出レベルが、切断剤が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆し、そして対象又は生物学的サンプルにおける検出可能標識の検出レベルの不在は、切断剤が対象又は生物学的サンプルに検出できるレベルで存在せず、結果的に、活性化可能抗体のプロテアーゼ切断が対象又は生物学的サンプルに検出され得ないことを示唆する。そのような活性化可能抗体は、マスキング部分(MM)、切断剤により切断される切断部分(CM)、及び標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント(AB)を含み、ここで活性化可能抗体は、未切断(すなわち、非活性化)状態で、次のような、N - 末端から C - 末端への構造配置を有し； MM - CM - AB 又は AB - CM - MM ；ここで、(a) MM は、標的への AB の結合を阻害するペプチドであり、そして MM は、AB の天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そして(b) 未切断状態で、活性化可能抗体の MM は、標的への AB の特異的結合を妨害せず、そして、ここで切断(すなわち、活性化)状態で、活性化可能抗体の M は、標的への AB の特異的結合を妨害せず、又はそれと競争しない。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、治療剤が接合される活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、剤に接合されない。いくつかの実施形態によれば、検出できる標識は、マスキング部分に結合される。いくつかの実施形態によれば、検出できる標識は、プロテアーゼ切断部位の N - 末端側の切断可能部分に結合される。いくつかの実施形態によれば、AB の単一の抗原結合部位がマスキングされる。本開示の抗体が少なくとも 2 つの抗原結合部位を有するいくつかの実施形態によれば、少なくとも 1 つの抗原結合部位がマスキングされ、そして少なくとも 1 つの抗原結合部位がマスキングされていない。いくつかの実施形態によれば、すべての抗原結合部位がマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、測定段階は検出できる標識を含む二次試薬の使用を包含する。

【 0 5 4 4 】

本開示はまた、対象又はサンプルにおける切断剤及び標的の存在又は非存在の検出方法への使用のためのキットを提供し、ここで前記キットは、対象又は生物学的サンプルと、活性化可能抗体とを、標的の存在下で接触し、そして対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体レベルを測定することへの使用のために、本明細書に記載される活性

10

20

30

40

50

化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体を少なくとも含み、ここで対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出レベルが、切断剤が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆し、そして対象又は生物学的サンプルにおける検出可能標識の検出レベルの不在は、切断剤が対象又は生物学的サンプルに検出できるレベルで存在せず、結果的に、活性化可能抗体のプロテアーゼ切断が対象又は生物学的サンプルに検出され得ないことを示唆する。そのような活性化可能抗体は、マスキング部分（MM）、切断剤により切断される切断部分（CM）、及び標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント（AB）を含み、ここで活性化可能抗体は、未切断（すなわち、非活性化）状態で、次のような、N-末端からC-末端への構造配置を有し；MM-CM-AB又はAB-CM-MM；ここで、（a）MMは、標的へのABの結合を阻害するペプチドであり、そしてMMは、ABの天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そして（b）未切断状態で、活性化可能抗体のMは、標的へのABの特異的結合を妨害せず、そして、ここで、切断（すなわち、活性化）状態で、活性化可能抗体のMMは、標的へのABの特異的結合を妨害せず、又はそれと競争しない。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、治療剤が接合される活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、剤に接合されない。いくつかの実施形態によれば、検出できる標識は、マスキング部分に結合される。いくつかの実施形態によれば、検出できる標識は、プロテアーゼ切断部位のN-末端側の切断可能部分に結合される。いくつかの実施形態によれば、ABの単一の抗原結合部位がマスキングされる。本開示の抗体が少なくとも2つの抗原結合部位を有するいくつかの実施形態によれば、少なくとも1つの抗原結合部位がマスキングされ、そして少なくとも1つの抗原結合部位がマスキングされていない。いくつかの実施形態によれば、すべての抗原結合部位がマスキングされている。いくつかの実施形態によれば、測定段階は検出できる標識を含む二次試薬の使用を包含する。
10

【0545】

本開示はまた、対象又はサンプルにおける切断剤の存在又は非存在の検出方法への使用のためのキットを提供し、ここで、前記キットは、対象又は生物学的サンプルとの接触への使用のための、本明細書に記載される活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体、及び対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体のレベルを検出するための手段を少なくとも含み、ここで活性化可能抗体は、CMの切断に統して放出される活性化可能抗体の部分上に位置する検出可能標識を含み、対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出できるレベルは、切断剤が対象又は生物学的サンプルに存在せず、そして/又は十分に存在せず、結果的に、活性化可能抗体の標的結合及び/又はプロテアーゼ切断が対象又は生物学的サンプルに検出され得ないことを示唆し、そして対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出レベルの不在が、切断剤が検出できるレベルで、対象又は生物学的サンプルに存在しないことを示唆する。
20

【0546】

本開示は、（i）対象又は生物学的サンプルと、活性化可能抗体とを接触し、ここで活性化可能抗体は、CMの切断に統して放出される活性化可能抗体の部分上に位置する検出可能標識を含み、そして（ii）対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤及び標的の存在又は非存在を検出する方法を提供し、ここで対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の検出可能レベルは、切断剤、標的、又は切断剤及び標的の両者が対象又は生物学的サンプルに存在せず、及び/又は十分には存在せず、結果的に、活性化可能抗体の標的結合及び/又はプロテアーゼ切断が対象又は生物学的サンプルに検出され得ないことを示唆し、そして対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の低められた検出可能レベルが、接断剤及び標的が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆する。検出可能標識の低められたレベルは、例えば約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%
40
50

%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%及び/又は約100%の低減率である。そのような活性化可能抗体は、マスキング部分(MM)、切断剤により切断される切断部分(CM)、及び標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント(AB)を含み、ここで活性化可能抗体は、未切断(すなわち、非活性化)状態で、次のような、N-末端からC-末端への構造配置を有し；MM-CM-AB又はAB-CM-MM；ここで、(a) MMは、標的へのABの結合を阻害するペプチドであり、そしてMMは、ABの天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そして(b) 未切断状態で、活性化可能抗体のMは、標的へのABの特異的結合を妨害せず、そして、ここで、切断(すなわち、活性化)状態で、活性化可能抗体のMMは、標的へのABの特異的結合を妨害せず、又はそれと競争しない。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、治療剤が接合されている活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、剤に接合されない。いくつかの実施形態によれば、検出可能標識を含む。いくつかの実施形態によれば、検出可能標識は、AB上に位置する。いくつかの実施形態によれば、対象又はサンプルにおける活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された抗体に対して特異的に結合する二次試薬を用いて達成され、ここで試薬は検出可能標識を含む。いくつかの実施形態によれば、二次試薬は、検出可能標識を含む抗体である。10

【0547】

本開示はまた、対象又はサンプルにおける切断剤及び標的の存在又は非存在の検出方法への使用のためのキットを提供し、ここで、前記キットは、対象又は生物学的サンプルとの接触への使用のための、本明細書に記載される活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体、及び対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体のレベルを検出するための手段を少なくとも含み、ここで対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の検出可能レベルは、切断剤、標的、又は切断剤及び標的の両者が対象又は生物学的サンプルに存在せず、及び/又は十分には存在せず、結果的に、活性化可能抗体の標的結合及び/又はプロテアーゼ切断が対象又は生物学的サンプルに検出され得ないことを示唆し、そして対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の低められた検出可能レベルが、接断剤及び標的が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆する。検出可能標識の低められたレベルは、例えば約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%及び/又は約100%の低減率である。20

【0548】

本開示は、(i) 対象又は生物学的サンプルと、活性化可能抗体とを接触し、ここで活性化可能抗体は、CMの切断に続いて放出される活性化可能抗体の部分上に位置する検出可能標識を含み、そして(ii) 対象又は生物学的サンプルにおける検出可能抗体のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤の存在又は非存在を検出する方法を提供し、ここで対象又は生物学的サンプルにおける検出可能抗体の検出可能レベルは、切断剤が対象又は生物学的サンプルに存在せず、及び/又は十分には存在せず、結果的に、活性化可能抗体のプロテアーゼ切断が対象又は生物学的サンプルに検出され得ないことを示唆し、そして対象又は生物学的サンプルにおける検出可能抗体の低められた検出可能レベルが、接断剤が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆する。検出可能標識の低められたレベルは、例えば約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%及び/又は約100%の低減率である。そのような活性化可能抗体は、マスキング部分(MM)、切断剤により切断される切断部分(CM)、及び標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント(AB)を含み、ここで活性化可能抗体は、未切断(すなわち、非活性化)状態で、次のような、N-末端からC-末端への構造配置を有し；MM-CM-AB又はA40

B - C M - M M ; ここで、(a) M M は、標的への A B の結合を阻害するペプチドであり、そして M M は、A B の天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そして(b) 未切断状態で、活性化可能抗体の M は、標的への A B の特異的結合を妨害せず、そして、ここで、切断(すなわち、活性化)状態で、活性化可能抗体の M M は、標的への A B の特異的結合を妨害せず、又はそれと競争しない。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、治療剤が接合されている活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、剤に接合されない。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、検出可能標識を含む。いくつかの実施形態によれば、検出可能標識は、A B 上に位置する。いくつかの実施形態によれば、対象又はサンプルにおける活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された抗体に対して特異的に結合する二次試薬を用いて達成され、ここで試薬は検出可能標識を含む。いくつかの実施形態によれば、二次試薬は、検出可能標識を含む抗体である。

【 0 5 4 9 】

本開示はまた、対象又はサンプルにおける目的の切断の存在又は非存在の検出方法への使用のためのキットを提供し、ここで、前記キットは、対象又は生物学的サンプルとの接触への使用のための、本明細書に記載される活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体、及び対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体のレベルを検出するための手段を少なくとも含み、ここで活性化可能抗体は、C M の切断に続いて放出される活性化可能抗体の部分上に位置する検出可能標識を含み、ここで対象又は生物学的サンプルにおける検出可能抗体の検出可能レベルは、切断剤、標的、又は切断剤及び標的の両者が対象又は生物学的サンプルに存在せず、及び/又は十分には存在せず、結果的に、活性化可能抗体の標的結合及び/又はプロテアーゼ切断が対象又は生物学的サンプルに検出され得ないことを示唆し、そして対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の低められた検出可能レベルが、接断剤及び標的が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆する。検出可能標識の低められたレベルは、例えば約 5 %、約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 % 及び/又は 約 100 % の低減率である。

【 0 5 5 0 】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、活性化できる活性化可能抗体は、検出できる標識を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、検出できる標識は、イメージング剤、造影剤、酵素、蛍光標識、発色団、色素、1又は2以上の金属イオン、又はリガンドベースの標識を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、イメージング剤は、放射性同位体を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、放射性同位体は、インジウム又はテクネチウムである。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、造影剤は、ヨウ素、ガドリニウム又は酸化鉄を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ又は - ガラクトシダーゼを含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、蛍光標識は、黄色蛍光タンパク質(Y F P)、シアノ蛍光タンパク質(C F P)、緑色蛍光タンパク質(G F P)、修飾された赤色蛍光タンパク質(M R F P)、赤色蛍光タンパク質 t ダイマー 2(R F P t ダイマー 2)、H C R E D、又はユーロピウム誘導体を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、発光標識は、N - メチルアクリジウム誘導体を含む。それらの方法のいくつかの実施形態によれば、標識は、Alexa Fluor(登録商標)標識、例えば Alexa Fluor(登録商標) 680 又は Alexa Fluor(登録商標) 750 を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、リガンドベースの標識は、ビオチン、アビシン、ストレプタビシン又は1又は2以上のハプテンを含む。

【 0 5 5 1 】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、対象は哺乳類である。それら

10

20

30

40

50

の方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、対象はヒトである。いくつかの実施形態によれば、対象は、非ヒト哺乳類、例えば非ヒト靈長類、愛玩動物（例えば、ネコ、イヌ、ウマ）、農業用動物、作業用動物又は動物園の動物である。いくつかの実施形態によれば、対象は齧歯動物である。いくつかの実施形態によれば、対象はヒトである。いくつかの実施形態によれば、対象は愛玩動物である。いくつかの実施形態によれば、対象は、獣医師のケア動物である。

【0552】

それらの方法のいくつかの実施形態によれば、前記方法は、インビボ方法である。それらの方法のいくつかの実施形態によれば、前記方法は、現場方法である。それらの方法のいくつかの実施形態によれば、前記方法は、エキソビボ方法である。それらの方法のいくつかの実施形態によれば、前記方法は、インビトロ方法である。10

【0553】

いくつかの実施形態によれば、現場イメージング及び／又はインビボイメージングは、治療する患者を同定する方法において有用である。例えば、現場イメージングにおいては、活性化可能抗体が、適切な位置で、例えば腫瘍部位で、適切なプロテアーゼ及び標的を有するそれらの患者を同定するために患者サンプルをスクリーンするために使用される。

【0554】

いくつかの実施形態によれば、現場イメージングは、本開示の活性化可能抗体による治療のために適切な患者集団を同定するか、又は他方では、さらに絞り込むために使用される。例えば、標的、及び試験される活性化可能抗体中の切断可能部分（CM）において基質を切断するプロテアーゼの両者について陽性である患者（例えば、疾患部位で、活性化された抗体を蓄積する）は、そのようなCMを含む活性化可能抗体による治療のための適切な候補体として同定される。同様に、それらの方法を用いて試験される、標的、及び活性化可能抗体中のCMにおいて基質を切断するプロテアーゼの両者について陰性である患者は、別の形の治療のための適切な候補体として同定され得る。いくつかの実施形態によれば、第1活性化可能抗体に関して陰性であるそのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体（例えば、疾患の部位で患者により切断されるCMを含む活性化可能抗体）が同定されるまで、異なったCMを含む他の活性化可能抗体により試験され得る。いくつかの実施形態によれば、次に、患者は、陽性である患者のための治療的有効量の接合された活性化可能抗体が投与される。20

【0555】

いくつかの実施形態によれば、インビボイメージングは、本開示の活性化可能抗体による治療のために適切な患者集団を同定するか、又は他方では、さらに絞り込むために使用される。例えば、標的、及び試験される活性化可能抗体中の切断可能部分（CM）において基質を切断するプロテアーゼの両者について陽性である患者（例えば、疾患部位で、活性化された抗体を蓄積する）は、そのようなCMを含む活性化可能抗体による治療のための適切な候補体として同定される。同様に、陰性である患者は、別の形の治療のための適切な候補体として同定され得る。いくつかの実施形態によれば、第1活性化可能抗体に関して陰性であるそのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体（例えば、疾患の部位で患者により切断されるCMを含む活性化可能抗体）が同定されるまで、異なったCMを含む他の活性化可能抗体により試験され得る。いくつかの実施形態によれば、次に、患者は、陽性である患者のための治療的有効量の接合された活性化可能抗体が投与される。30

【0556】

方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、前記方法又はキットは、本開示の活性化可能抗体による治療のために適切な患者集団を同定するか、又は他方では、さらに絞り込むために使用される。例えば、標的、及びそれらの方法により試験される活性化可能抗体中の切断可能部分（CM）において基質を切断するプロテアーゼの両者について陽性である患者は、そのようなCMを含む活性化可能抗体による治療のための適切な候補体として同定される。同様に、それらの方法を用いて試験される、標的、及び活性化可能抗体中40

50

の CMにおいて基質を切断するプロテアーゼの両者について陰性である患者は、別の形の治療のための適切な候補体として同定され得る。いくつかの実施形態によれば、そのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体（例えば、疾患の部位で患者により切断される CMを含む活性化可能抗体）が同定されるまで、他の活性化可能抗体により試験され得る。いくつかの実施形態によれば、標的の何れかについて陰性である患者は、そのような CMを含むそのような活性化可能抗体による治療のための適切な候補体として同定される。いくつかの実施形態によれば、標的の何れかについて陰性である患者は、そのような CMを含む活性化可能抗体による治療のための適切な候補体ではない。いくつかの実施形態によれば、そのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体（例えば、疾患の部位で患者により切断される CMを含む活性化可能抗体）が同定されるまで、他の活性化可能抗体により試験され得る。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、治療剤が接合されている活性化可能抗体である。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、接合されない。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、検出可能標識である。いくつかの実施形態によれば、検出可能標識は、AB上に位置する。いくつかの実施形態によれば、対象又はサンプル中の活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された抗体に対して特異的に結合する二次試薬を用いて達成され、ここで前記試薬は検出可能標識を含む。いくつかの実施形態によれば、前記二次試薬は、検出可能標識を含む抗体である。

【0557】

いくつかの実施形態によれば、方法又はキットは、本開示の抗 - 標的活性化可能抗体及び / 又は接合された活性化可能抗体（例えば、治療剤が接合されている活性化可能抗体）による治療、続いて、前記活性化可能抗体及び / 又は接合された活性化可能抗体を、その必要な対象に投与することによる治療のために適切な患者集団を同定するか、又は他方では、絞り込むために使用される。例えば、標的、及びそれらの方法により試験される活性化可能抗体及び / 又は接合された活性化可能抗体の切断可能部分（CM）において基質を切断するプロテアーゼの両者について陽性である患者は、そのような CMを含む、そのような抗体及び / 又はそのような接合された活性化可能抗体による治療のための適切な候補体として同定され、そして次に、治療的有効量の試験された活性化可能抗体及び / 又は接合された活性化可能抗体を投与される。同様に、それらの方法を用いて試験される、標的、及び活性化可能抗体中の CMにおいて基質を切断するプロテアーゼの何れか又は両者について陰性である患者は、別の形の治療のための適切な候補体として同定され得る。いくつかの実施形態によれば、そのような患者は、治療のための適切な抗体及び / 又は接合された活性化可能抗体（例えば、患者の部位で患者により切断される CMを含む活性化可能抗体及び / 又は接合された活性化可能抗体）が固定されるまで、他の抗体及び / 又は接合された活性化可能抗体により試験され得る。いくつかの実施形態によれば、次に、患者は、患者が陽性であると試験された、治療的有効量の活性化可能抗体及び / 又は接合された活性化可能抗体が投与される。

【0558】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、MMは、約4 - 40個の長さのアミノ酸を有するペプチドである。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、リンカーペプチドを含み、ここで前記リンカーペプチドはMMとCMとの間に位置する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体はリンカーペプチドを含み、ここで前記リンカーペプチドは、ABとCMとの間に位置する、それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、第1リンカーペプチド（L1）及び第2リンカーペプチド（L2）を含み、ここで前記第1リンカーペプチドはMMとCMの間に位置し、そして第2リンカーペプチドは、ABとCMとの間に位置する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、L1及びL2の個々は、約1 - 20個の長さのアミノ酸のペプチドであり、そしてL1及びL2の個々は同じリンカーである必要はない。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、L1及びL2の1つ又は両者は、グリシン - セリンポリマーを含む。それ

らの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、L1及びL2の少なくとも1つは、(G)n、グリシン-セリンポリマー(例えば、(GS)n、(GSGGS)n(配列番号1)及び(GGGS)n(配列番号2)から成る群から選択されたアミノ酸配列を含み、ここでnは少なくとも1つの整数である。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、L1及びL2の少なくとも1つは、式(GGS)n(ここで、nは少なくとも1つの整数である)を有するアミノ酸配列を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、L1及びL2の少なくとも1つは、Gly-Gly-Ser-Gly(配列番号3)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly(配列番号4)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly(配列番号5)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly(配列番号6)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly(配列番号7)及びGly-Ser-Ser-Ser-Gly(配列番号8)から成る群から選択されたアミノ酸配列を含む。

10

【0559】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、ABは、本明細書に提供される交差反応性抗体配列が選択される抗体又は抗体フラグメント配列を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、ABは、Fabフラグメント、scFv又は一本鎖抗体(scAb)を含む。

【0560】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、切断剤は、標的と共に、対象又はサンプルにおいて共局在化されるプロテアーゼであり、そしてCMは、プロテアーゼのための基質として機能するペプチドであり、ここで、プロテアーゼは、活性化可能抗体がそのプロテアーゼに暴露される場合、活性化可能抗体におけるCMを切断する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、CMは、15個までの長さのアミノ酸のポリペプチドである。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、CMは、ABのN-末端にカップリングされる。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、CMは、ABのC-末端にカップリングされる。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、CMは、ABのVL鎖のN-末端にカップリングされる。

20

【0561】

本開示の活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、診断用及び予防用製剤に使用される。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体は、1又は2以上の前述の炎症、炎症性障害、癌又は他の障害の発症の危険性である患者に投与される。

30

【0562】

1又は2以上の前述の障害に対する患者の又は器官の素因は、遺伝子型、血清学的又は生物学的マーカーを用いて決定され得る。

【0563】

いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、1又は2以上の前述の障害に関連する臨床学的徴候を有するとして診断されたヒト個体に投与される。診断に基づいて、活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、臨床学的徴候の効果を軽減するか又は逆にするために投与される。

【0564】

本開示の活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体はまた、患者サンプルにおける標的の検出においても有用であり、そして従って、診断剤として有用である。例えば、本開示の活性化可能抗体及び/又は接合された活性化可能抗体は、患者サンプルにおける標的レベルを検出するために、インビトロアッセイ、例えばELISAにおいて使用される。

40

【0565】

1つの実施形態によれば、本開示の活性化可能抗体は、固体支持体(例えば、マイクロタイタープレートのウェル)上に固定される。固定された活性化可能抗体は、試験サンプルに存在することができる任意の標的のための捕捉抗体として作用する。固定された抗体と患者サンプルとの接触の前、固体支持体は、分析物の非特異的吸着を妨げるために、ブロッキング剤、例えば乳タンパク質により洗浄され、そして処理される。

【0566】

50

続いて、ウェルが、抗原を含む疑いのある試験サンプルにより、又は標準量の抗原を含む溶液により処理される。そのようなサンプルは、例えば病理診断であると思われる循環抗原のレベルを有する疑いのある対象からの血清サンプルである。試験サンプル又は標準を洗い流した後、固体支持体が、検出的に標識される二次抗体により処理される。標識された二次抗体は、検出抗体として作用する。検出可能標識のレベルが測定され、そして試験サンプル中の標的抗原の濃度が、標準サンプルから開発される標準曲線との比較により決定される。

【 0 5 6 7 】

インビトロ診断アッセイにおいて本開示の抗体を用いて得られる結果に基づいて、標的抗原の発現レベルに基づいて患者における疾患を分類することが可能であることが理解されるであろう。所定の疾患に関して、血液サンプルが、疾患の進行での種々の段階で、及び／又は、疾患の治療処理における種々の点で、診断される対象から採取される。進行又は治療の各段階のために統計学的に有意な結果を提供するサンプル集団を用いて、各段階で特徴的であると思われる抗原の濃度範囲が指定される。10

【 0 5 6 8 】

活性化可能抗体及び／又は接合された活性化可能抗体はまた、診断及び／又はイメージング方法に使用され得る。いくつかの実施形態によれば、そのような方法は、インビトロ方法である。いくつかの実施形態によれば、そのような方法は、インビボ方法である。いくつかの実施形態によれば、そのような方法は、現場方法である。いくつかの実施形態によれば、そのような方法は、エクスピボ方法である。例えば、酵素的に切断可能なCMを有する活性化可能抗体は、CMを切断できる酵素の存在又は不在を検出するために使用され得る。そのような活性化可能抗体は、所定の宿主生物の所定の細胞又は組織における活性化された抗体（すなわち、活性化可能抗体の切断に起因する抗体）の測定される蓄積を通して、酵素活性（又は、いくつかの実施形態によれば、高められた還元電位の環境、例えばジスルフィド結合の還元を提供できる環境）のインビボ検出（例えば、定性的又は定量的）を包含する診断に使用される。活性化された抗体のそのような蓄積は、組織が酵素活性（又はCMの性質に依存して、高められた還元電位）を発現するのみならず、また組織が、活性化された抗体が結合する少なくとも1つの標的を発現することを示唆する。20

【 0 5 6 9 】

例えば、CMは、腫瘍の部位で、ウィルス又は細菌感染の部位で、生物学的に限られた部位（例えば、膿瘍、器官等において）で、及び同様の部位で見出されるプロテアーゼのためのプロテアーゼ基質であるよう選択され得る。ABの少なくとも1つは、標的抗原を結合するものである。当業者に知られている方法を用いて、検出可能標識（例えば、蛍光標識又は放射性標識又は放射性トレーサー）が、活性化可能抗体のAB又は他の領域に接合され得る。適切な検出可能標識は、上記スクリーニング方法に論じられており、そして追加の特定の例が下記に提供される。その活性が目的の疾患組織において高められているプロテアーゼと共に、疾患状態のタンパク質又はペプチドに対して特異的なABを用いて、活性化可能抗体は、組織への疾患組織の高められた相対的結合速度を示し、ここでCM特異的抗体は、検出レベルで存在しないか、又は疾患組織においてよりも低いレベルで存在するか、又は不活性である（例えば、チモーゲン形で、又は阻害剤との複合体形で）。小タンパク質及びペプチドは腎濾過システムにより血液から急速にクリアランスされるので、CMに対して特異的な酵素は検出レベルで存在しない（又は非疾患組織においては低レベルで存在するか、又は不活性コンホメーションで存在する）ので、疾患組織における活性化された活性化された抗体の蓄積が、非疾患組織と比較して増強される。3040

【 0 5 7 0 】

別の例によれば、活性化可能抗体は、サンプルにおける切断剤の存在又は不在を検出するために使用され得る。例えば、活性化可能抗体が酵素による切断に対して敏感なCMを含む場合、活性化可能抗体は、サンプルにおける還元状態の存在を検出するために（定性的に又は定量的に）、使用され得る。それらの方法での分析を促進するために、活性化可能抗体が、検出可能に標識され得、そして支持体（例えば、固体支持体、例えばスライド

又はビーズ)に結合され得る。検出可能標識は、切断に続いて放出されない活性化可能抗体の一部を位置決定し、例えば検出可能標識は、急冷蛍光標識、又は切断が生じるまで、検出できない他の標識であり得る。アッセイは例えば、固定された、検出可能的に標識された活性化可能抗体と、酵素及び/又は還元剤を含むことが疑われるサンプルとを、切断が生じるのに十分な時間、接触し、次に、過剰のサンプル及び汚染物を除去するために洗浄することにより実施され得る。次に、サンプルにおける切断(例えば、酵素又は還元剤)の存在又は不在が、サンプルとの接触の前、活性化可能抗体の検出可能シグナルの変化、例えばサンプルにおける切断剤による活性化可能抗体の切断のために検出可能シグナルの存在及び/又は上昇により評価される。

【0571】

10

そのような検出方法は、切断される場合、活性化可能抗体の少なくとも1つのA Bを結合できる標的の存在又は不在の検出を提供するよう適合され得る。従って、アッセイは、切断剤の存在又は不在、及び目的の標的の存在又は不在を評価するよう適合され得る。接断剤の存在又は不在は、上記のような活性化可能抗体の検出可能レベルの存在及び/又は不在により検出され得、そして標的の存在又は不在は、標的-A B複合体の検出により、例えば検出可能に標識された抗-標的抗体の使用により検出され得る。

【0572】

活性化可能抗体はまた、例えばプロテアーゼ切断による活性化可能抗体の活性化の検証のために現場イメージング、及び特定の標的への結合においても有用である。現場イメージングは、生物学的サンプル、例えば細胞培養物又は組織切片におけるタンパク質分解活性及び標的の局在化を可能にする技法である。この技法を用いて、検出可能標識(例えば、蛍光標識)の存在に基づいて、所定の標的への結合及びタンパク質分解活性の両者を認識することが可能である。

20

【0573】

それらの技法は、疾患部位(例えば、腫瘍組織)又は健康組織に由来する何れかの凍結された細胞又は組織において有用である。それらの技法はまた、新鮮な細胞又は組織サンプルにおいても有用である。

【0574】

30

それらの技法によれば、検出可能抗体は、検出可能標識により標識される。検出可能標識は、蛍光色素(例えば、蛍光団、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミンイソチオシアネート(TRITC)、、近赤外(NIR)色素(例えば、Qdot(登録商標)ナノクリスタル)、コロイド金属、ハプテン、放射性マーカー、ビオチン、及び增幅試薬、例えばストレプトアビジン、又は酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼ)であり得る。

【0575】

40

標識された活性化可能抗体と共にインキュベートされたサンプルにおける標識の検出は、サンプルが標的を含み、そして活性化可能抗体のCMに対して特異的であるプロテアーゼを含むことを示唆する。いくつかの実施形態によれば、プロテアーゼの存在は、広範囲のプロテアーゼ阻害剤、例えば本明細書に記載されるそれらを用いて、及び/又はプロテアーゼに対して特異的である剤、例えばプロテアーゼマトリプターゼ(MT-SP1)に対して特異的であり、そしてマトリプターゼのタンパク質分解活性を阻害する、抗体、例えばA11を用いて、確認され得る;例えば、2010年11月に公開された国際公開第2010/129609号を参照のこと。広範囲のプロテアーゼ阻害剤、例えば本明細書に記載されるそれらを使用することの、及び/又はより選択的阻害剤を用いることによる同じアプローチが、プロテアーゼ、又は活性化可能抗体のCMに対して特異的な種類のプロテアーゼを同定するために使用され得る。いくつかの実施形態によれば、標的の存在は、標的、例えば別の抗体に対して特異的である剤を用いて確かめられ得るか、又は検出可能標識が標識されていない標的と競争され得る。いくつかの実施形態によれば、標識されていない活性化可能抗体が、標識された二次抗体又はより複雑な検出システムによる検出と共に使用され得る。

50

【 0 5 7 6 】

類似する技法がまた、インビボイメージングのためにも有用であり、ここで対象、例えば哺乳類、例えはヒトにおける蛍光シグナルの検出は、疾患部位が標的を含み、そして活性化可能抗体の CM に対して特異的であるプロテアーゼを含むことを示唆する。

【 0 5 7 7 】

それらの技法はまた、活性化可能抗体におけるプロテアーゼ特異的 CM に基づいて、種々の細胞、組織及び生物におけるプロテアーゼ活性の検出、同定又は特徴づけのために、キットに、及び / 又は試薬としても有用である。

【 0 5 7 8 】

いくつかの実施形態によれば、現場イメージング及び / 又はインビボイメージングは、10 治療する患者を同定する方法において有用である。例えは、現場イメージングにおいては、活性化可能抗体が、適切な位置で、例えは腫瘍部位で、適切なプロテアーゼ及び標的を有するそれらの患者を同定するために患者サンプルをスクリーンするために使用される。

【 0 5 7 9 】

いくつかの実施形態によれば、現場イメージングは、本開示の活性化可能抗体による治療のために適切な患者集団を同定するか、又は他方では、さらに絞り込むために使用される。例えは、標的、及び試験される活性化可能抗体（例えは、疾患部位で活性化された抗体を蓄積する）中の切断可能部分（CM）において基質を切断するプロテアーゼの両者について陽性である患者（例えは、疾患部位で、活性化された抗体を蓄積する）は、そのような CM を含む活性化可能抗体による治療のための適切な候補体として同定される。同様に、それらの方法を用いて試験される、標的、及び活性化可能抗体中の CM において基質を切断するプロテアーゼの何れか又は両者について陰性である患者は、別の形の治療のための適切な候補体として同定され得る（すなわち、試験される活性化可能抗体による治療のために適切でない）。いくつかの実施形態によれば、第 1 活性化可能抗体に関して陰性であるそのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体（例えは、疾患の部位で患者により切断される CM を含む活性化可能抗体）が同定されるまで、異なった CM を含む他の活性化可能抗体により試験され得る。20

【 0 5 8 0 】

いくつかの実施形態によれば、インビボイメージングは、本開示の活性化可能抗体による治療のために適切な患者集団を同定するか、又は他方では、さらに絞り込むために使用される。例えは、標的、及び試験される活性化可能抗体中の切断可能部分（CM）において基質を切断するプロテアーゼの両者について陽性である患者（例えは、疾患部位で、活性化された抗体を蓄積する）は、そのような CM を含む活性化可能抗体による治療のための適切な候補体として同定される。同様に、陰性である患者は、別の形の治療のための適切な候補体として同定され得る（すなわち、試験される活性化可能抗体による治療のために適切でない）。いくつかの実施形態によれば、第 1 活性化可能抗体に関して陰性であるそのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体（例えは、疾患の部位で患者により切断される CM を含む活性化可能抗体）が同定されるまで、異なった CM を含む他の活性化可能抗体により試験され得る。30

【 0 5 8 1 】**医薬組成物**

本開示の接合された抗体、活性化可能抗体、及び / 又は接合された活性化可能抗体（また、本明細書においては、「活性化合物」と称する）、及びその誘導体、フラグメント、類似体及び相同体が、投与のために適切な医薬組成物中に組込まれ得る。そのような組成物は、典型的には、接合された抗体、活性化可能抗体、及び / 又は接合された活性化可能抗体及び医薬的に許容される担体を含む。本明細書において使用される場合、用語「医薬的に許容できる担体（pharmaceutically acceptable carrier）」とは、医薬投与と適合できる、何れか及びすべての溶媒、分散媒体、コーチング、抗菌及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、及び同様のものを含むことが意図される。適切な担体は、参照により本明細書に組込まれる、この分解においては標準的参考テキストである Remington's Pharmac

4050

eutical Scienceの最新版に記載される。そのような担体又は希釈剤の適切な例は、水、生理食塩水、リソゲル液、デキストロース溶液、及び5%ヒト血清アルブミンを包含するが、但しそれらだけには限定されない。リポソーム及び非水性媒体、例えば固定油がまた使用され得る。医薬活性物質のためのそのような媒体及び剤の使用は、当業界においては良く知られている。任意の従来の媒体又は剤が活性化合物と不適合である場合を除き、組成物へのその使用が企画される。補助的な活性化合物も組成物に組み込まれ得る。

【0582】

本開示の医薬組成物は、その意図される投与経路と適合できるよう製剤化される。投与経路の例は、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（すなわち、局所）、経粘膜、及び直腸投与を包含する。非経口、皮内又は皮下適用のために使用される溶液又は懸濁液は次の成分を含むことができる：滅菌希釈剤、例えば注射用水、生理食塩溶液、固定油、ポリエチレンジリコール、グリセリン、プロピレンジリコール又は他の合成溶媒；抗菌剤、例えばベンジルアルコール又はメチルパラベン；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）；緩衝液、例えば酢酸塩、硝酸塩又はリン酸塩、及び張性の調整のための薬、例えば塩化ナトリウム及びデキストロース。pHは、酸又は塩基、例えば塗酸又は水酸化ナトリウムにより調節され得る。非経口製剤は、アンプル、使い捨て注射器、又はガラス又はプラスチックから製造される複数回投与バイアルに封入され得る。

【0583】

注射使用に適した医薬組成物は、無菌注射溶液又は分散液の即時調製のための無菌水溶液（水溶性）又は分散液、及び無菌粉末を含む。静脈内投与のためには、適切な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（登録商標）(BASF, Parsippany, N.J.)、又はリン酸緩衝溶液（PBS）を包含する。すべての場合、組成物は、容易な注射針通過まで無菌で且つ流体であるべきである。それは、製造及び貯蔵の条件下で安定すべきであり、そして微生物、例えば細菌及び菌類の汚染作用に対して保存されるべきである。担体は、例えば水エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレンジリコール及び液体ポリエチレンジリコール及び同様のもの）及びそれらの適切な混合物を含む溶媒又は分散媒であり得る。適切な流動性は、例えばコーティング、例えばレシチンの使用により、分散液の場合、必要とされる粒度の維持により、及び界面活性剤の使用により維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサール及び同様のものにより達成され得る。多くの場合、等張剤、例えば糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物に含むことが適切であろう。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延する剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを、組成物に含むことによりもたらされ得る。

【0584】

無菌注射用溶液は、適切な溶媒中、必要とされる量での活性成分を、上記に列挙される成分の1つ又は組み合わせと共に組込むことにより、必要な場合、続いて、濾過滅菌により調整され得る。一般的に、分散液は、基本的分散媒及び上記の列挙されるそれらからの必要とされる他の成分を含む無菌ビーカー中に活性化合物を組込むことにより調製される。無菌注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合、調製方法は、活性成分及びその前もって滅菌濾過された溶液からの任意の追加の所望する成分を生成する、真空乾燥及び凍結乾燥である。

【0585】

経口組成物は一般的に不活性希釈剤又は食用担体を含む。それらは、ゼラチンカプセルに封入されるか、又は錠剤に圧縮され得る。経口治療投与のためには、活性化合物は、賦形剤と共に組込まれ、そして錠剤、トローチ又はカプセルの形で使用される。経口組成物はまた、マウスウォッシュとして使用のための液体担体を用いて調製され得、ここで液体担体中の化合物は、経口適用され、そしてスワイッシュされ、そして吐き出されるか、又は飲み込まれる。医薬的に適合できる結合剤、及び／又はアジュバント材料は、組成物の

10

20

30

40

50

一部として含まれ得る。錠剤、ピル、カプセル、トローチ及び同様のものは、次の成分の何れか、又は類似する性質の化合物を含むことができる：結合剤、例えば微晶性セルロース、トラガカントガム又はゼラチン；賦形剤、例えば澱粉又はラクトース；崩壊剤、例えばアルギン酸、ブリモゲル又はコーンスターク；滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム又はSterotes；流動促進剤、例えばコロイド状二酸化珪素；甘味剤、例えばスクロース又はサッカリン；又は風味剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジ香料。

【 0 5 8 6 】

吸入による投与のためには、化合物は、適切な推進剤、例えばガス、例えば二酸化炭素を含む加圧された容器又はディスペンサー、又はネプライザーからエアロゾル噴霧の形で送達される。10

【 0 5 8 7 】

全身性投与はまた、経粘膜又は経皮手段によるものであっても良い。経粘膜又は経皮投与のためには、浸透されるべき障壁に適切な浸透剤が製剤に使用される。そのような浸透剤は一般的に当業界において知られており、そして例えば、経粘膜投与のためには、界面活性剤、胆汁酸塩及びフシジン酸誘導体を包含する。経粘膜投与は、鼻腔内スプレー又は坐剤の使用を介して達成され得る。経皮投与のためには、活性化合物は、当業界において一般的に知られているように、軟膏、膏薬、ゲル又はクリーム中に配合される。

【 0 5 8 8 】

化合物はまた、直腸送達のために、坐剤（例えば、従来の製剤基材、例えばココアバター及び他のグリセリドを含む）又は保持浣腸の形で調製され得る。20

【 0 5 8 9 】

1つの実施形態によれば、活性化合物は、身体からの急速な排除に対して化合物を保護するであろう担体、例えば制御放出製剤、例えばインプラント及びマイクロカプセル化送達システムを用いて調製される。生分解性、生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸が使用され得る。そのような製剤の調製方法は、当業者に明らかであろう。材料はまた、Alza Corporation 及びNova Pharmaceuticals, Incから市販されている。リポソーム懸濁液（ウィルス抗原に対するモノクローナル抗体により、感染された細胞に標的化されたりポソームを含む）がまた、医薬的に許容される担体として使用され得る。それらは、米国特許第4,522,811号に記載されるように、当業者に知られている方法に従って調製され得る。30

【 0 5 9 0 】

投与の容易性及び投与量の均一性のための単位剤形で経口又は非経口組成物を製剤化することが特に好都合である。単位剤形とは、本明細書において使用される場合、治療される対象のための単位用量として適した物理的に別個の単位を意味し；各単位は、必要とされる医薬担体と関連して所望する治療効果を生成するよう計算された所定量の活性化合物を含む。本開示の単位剤形の仕様は、活性化合物のユニーク特徴及び達成されるべき特定の治療効果、及び個体の治療のためのそのような活性化合物を配合する技術的に固有の制限により決定され、そしてそれらに直接的に依存する。40

【 0 5 9 1 】

医薬組成物は、投与のための説明書と共に、容器、パック又はディスペンサーに含まれる。

【 0 5 9 2 】

本発明は、さらに、次の実施例に記載されるが、但し、それらは本発明の範囲を制限するものではない。

【 実施例 】

【 0 5 9 3 】

実施例 1 . 本開示の基質を含むクエンチされたプロープを活性化するための滑液の能力

この実施例は、本開示の MMP 基質配列を切断する滑液サンプルの能力を実証する。特50

に、MMP切断可能配列を、評価されるMMP切断可能配列を含むリンカー領域を介して、抗-IL-6R抗体配列に連結されるマスキング部分を含む活性化可能抗体コンストラクトについて試験した。

【0594】

次のMMP-切断可能抗体を、滑液と共にインキュベートした：

【0595】

479210419_{AV1} アミノ酸

【化68】

QGQSGQYGSCSWNYVHIFMDCGS SGGSGGGSGISSGLSSGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQDISSYLNWYQQ
KPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSTDFTFTISSLQPEDIA TYCQQGNTLPYTFQGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC (配列番号115)

10

【0596】

4792¹⁰⁴¹⁹AV1 ヌクレオチド

【化69】

Caaggccagtctggccagtatgggtcctgcagttggactatgtacacatattcatggatt gcccgtcgagccgtggcagcg
gtggctctgtggctcaggtttagtagtggcttagcag tggcggttctgacatccagatgactcagtctcttagtccct
gtccgcctctgtggggac cgagtcaccatcacatgcagagccagccaggatatttctagttacactgaactggtatcagc a
gaagcccgaaaagcacctaagctgtatctactatacctccaggctgcactctggcgt gcccagtccgttcaactggctca
gggagccgaaaccgacttcactttaccatctcaaggctg cagccagaggatattgcacatactattgtcagcaggccaata
cactgccctacacttttg gccaggggaccaaggtgaaatcaaacgtacggctgcaccatctgtcttcatcttccc gc
catctgtatgagcagttgaaatctggactgccttgtgtgcctgctgaataacttc tatccagagagggccaaagtaca
gtggaaagggtggataaccccctccaatcggttaactccc aggagagtgtcacagagcaggacagcacctacagc
ctcagcagcaccctgac gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtccatcagggc ctg
agctcgccgtcacaaagagcttcaacagggagagtgt (配列番号116)

20

【0597】

4792⁵⁵⁹AV1 アミノ酸

【化70】

QGQSGQYGSCSWNYVHIFMDCGSSGGSGGSQNQALRMAGGSDIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQDISSYLNWYQQ
KPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSTDFTFTISSL QPEDIA TYCQQGNTLPYTFQGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPV
PVTKSFNRGEC (配列番号117)

30

【0598】

4792⁵⁵⁹AV1 ヌクレオチド

40

【化71】

caaggccagtctggccagtatgggcctgcagttgaaactatgtacacatattcatggatt gcccgtcgagcggtggcagcg
gtggctctgtggctcacagaatcaggcattacgtatggc aggccgttctgacatccagatgactcagtctccatgtccct
gtccgcctctgtggggac cgagtcaccatcacatgcagagccagccaggatattttagttacactgaactggtatcagc a
gaagccccggaaaagcacctaagctgtatctactatacctccaggctgcactctggcgt gcccagtgcgttcagtggctca
gggagcggaccgacttcactttaccatctcaagcctg cagccagaggatattgccacatactattgtcagcaggcaata
cactgcctacacttttgcagggaccaggtggaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttccc gc
catctgtatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgtgtgcctgtaataacttc tatcccagagaggccaaagtaca
gtggaaagggtggataaccccctccaatcggttaactccc aggagagtgtcacagagcaggacagcacctacagc
ctcagcagcaccctgac gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc ctg
agctcgccgtcacaaagagcttcaacagggagagtgt (配列番号118) 10

【0599】

4792⁶⁰¹AV1 アミノ酸

【化72】

QGQSGQYGSWSNNVHIFMDCGSSGGSGGSQAQNLLGMVGGSDIQMTQSPSSLASVGD RVTITCRASQDISSYLNWYQQ
KPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSQGTDFFTISSL QPEDIATYYCQQQNTLPYTFQGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
SSPVTKSFNRGEC (配列番号119) 20

【0600】

4792⁶⁰¹AV1 ヌクレオチド

【化73】

Caaggccagtctggccagtatgggcctgcagttgaaactatgtacacatattcatggatt gcccgtcgagcggtggcagcg
gtggctctgtggctcacagaatctgttagtgtatggt aggccgttctgacatccagatgactcagtctccatgtccct
gtccgcctctgtggggac cgagtcaccatcacatgcagagccagccaggatattttagttacactgaactggtatcagc a
gaagccccggaaaagcacctaagctgtatctactatacctccaggctgcactctggcgt gcccagtgcgttcagtggctca
gggagcggaccgacttcactttaccatctcaagcctg cagccagaggatattgcacatactattgtcagcaggcaata
cactgcctacacttttgcagggaccaggtggaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttccc gc
catctgtatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgtgtgcctgtaataacttc tatcccagagaggccaaagtaca
gtggaaagggtggataaccccctccaatcggttaactccc aggagagtgtcacagagcaggacagcacctacagc
ctcagcagcaccctgac gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc ctg
agctcgccgtcacaaagagcttcaacagggagagtgt (配列番号120) 30

【0601】

4792³⁴⁵⁷AV1 アミノ酸

【化74】 40

QGQSGQYGSWSNNVHIFMDCGSSGGSGGSSTFPFGMFFGSDIQMTQSPSSLASVGD RVTITCRASQDISSYLNWYQQ
KPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSQGTDFFTISSL QPEDIATYYCQQQNTLPYTFQGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASWCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PTVTKSFNRGEC (配列番号121)

【0602】

4792³⁴⁵⁷AV1 ヌクレオチド

【化75】

Caaggccagtctggccagtatgggcctgcagttgaaactatgtacacatattcatggatt gcccgtcgagcggtggcagcg
gtggctctgtggctcaagtacattccattcgttatgtt cggcggtctgacatccagatgactcagtctccatctccct
gtccgcctctgtggggac cgagtaccatcacatgcagagccagccaggatattttagttacactgaactggatc
gaagcccgaaaagcacctaagctgtatctactatacctccaggctgcactctgggt gcccagtcggttcagtggctca
gggagcggaccgcacttacatttaccatctcaagcctg cagccagaggatattgcacatactattgtcagcaggc
cactgcctacacttttgcagggaccatggaaatcaaacgtacggctgcaccatctgtcttcatcttccc
catctgtatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgtgtgcctgctgaataacttc tatcccagagaggc
gtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactccc aggagagtgtcacagagcaggacagc
ctcagcagcaccctgac gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagt
agctcgccgtcacaaagagctcaacaggagagtgt (配列番号122)

10

【0603】

4 7 9 2³⁴⁵⁸ A V 1 アミノ酸

【化76】

QGQSGQYGSWSWNYVHIFMDCGSSGGSGSGSPVGYTSSLGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISSYLNWYQQ
KPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGTDFTFTISSL QPEDIATYYCQQQNTLPYTFQGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG L
SSPVTKSFNRGEC (配列番号123)

20

【0604】

4 7 9 2³⁴⁵⁸ A V 1 ヌクレオチド

【化77】

Caaggccagtctggccagtatgggcctgcagttgaaactatgtacacatattcatggatt gcccgtcgagcggtggcagcg
gtggctctgtggctcacatgtggatatacgagttgtt cggcggtctgacatccagatgactcagtctccatctccct
gtccgcctctgtggggac cgagtaccatcacatgcagagccagccaggatattttagttacactgaactggatc
gaagcccgaaaagcacctaagctgtatctactatacctccaggctgcactctgggt gcccagtcggttcagtggctca
gggagcggaccgcacttacatttaccatctcaagcctg cagccagaggatattgcacatactattgtcagcaggc
cactgcctacacttttgcagggaccatggaaatcaaacgtacggctgcaccatctgtcttcatcttccc
catctgtatgagcagttgaaatctggaaactgcctctgtgtgcctgctgaataacttc tatcccagagaggc
gtggaaagggtggataacgcctccaatcggttaactccc aggagagtgtcacagagcaggacagc
ctcagcagcaccctgac gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagt
agctcgccgtcacaaagagctcaacaggagagtgt (配列番号124)

30

【0605】

4 7 9 2³⁴⁶³ A V 1 アミノ酸

【化78】

40

QGQSGQYGSWSWNYVHIFMDCGSSGGSGSGSDWLWPGIGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISSYLNWYQQ
KPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGTDFTFTISSL QPEDIATYYCQQQNTLPYTFQGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG L
SSPVTKSFNRGEC (配列番号125)

【0606】

4 7 9 2³⁴⁶³ A V 1 ヌクレオチド

【化79】

Caaggccagtctggccagtatgggcctgcagttggaaactatgtacacatattcatggatt gcggctcgagcggtggcagcg
gtggctctggctcagactggttatactggcctggtat tggcggttctgacatccagatgactcagtctccatctccct
gtccgcctctgtggggac cgagtaccatcacatgcagagccagggatattcttagttacactgaactggtatcagc a
gaagccccggaaaagcacctaagctgtatctactatacctccaggctgcactctggcgt gcccagtcggttcagtggctca
gggagcggaaaccgacttcactttaccatctcaagcctg cagccagaggatattccacatactattgtcagcagggcaata
cactgcctacacttttg gccaggggaccaaggtaaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttccc gc
catctgtatgagcagttgaaatctggaaactgcctgtgtgcctgctgaataacttc tatccagagaggccaaagtaca
gtggaaagggtggataacgccctccaatcggttaactccc aggagagtgtcacagagcaggacagcacctacagc
ctcagcagcaccctgac gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc ctg
agctcgcccgtcacaaagagcttcaacagggagagtgt (配列番号66)

10

【0607】

活性化可能抗体活性化の程度を、滑液におけるインキュベーションに続いて、IL6Rへの抗-IL6R親抗体の結合に比較して、ヒトIL6Rに結合する活性化可能抗体の能力を評価するELISA形式により決定した。手短に言えば、Nunc Maxisorpプレートを、PBS(pH7.4)中、ヒトIL6R(R and D Systems、カタログ番号227-SR/CF)の500-nmol/ml溶液100μl(ウェル当たり)により、4で一晩、被覆した。プレートを、PBST(PBS、pH7.4、0.05%Tween-20)により3度洗浄した。次に、ウェルを、PBST中、2%NFDM(脱脂粉乳)200μl(ウェル当たり)により、室温で2時間、ブロックした。IL6R-被覆されたプレートを、PBST(PBS、pH7.4、0.05%Tween-20)により3度、洗浄した。各活性化可能抗体-滑液反応化合物の希釈系、及び親抗-IL6R抗体の希釈系を、IL6R-被覆されたELISAプレートの適切なウェルに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートし、そして次に、PBST(PBS、pH7.4、0.05%Tween-20)により3度、洗浄した。2%NFDM-PBST中、ヤギ-抗-ヒトIgG(Fab特異的、Sigmaカタログ番号A0293)の1:3000希釈溶液100μl(ウェル当たり)を添加し、そしてプレートを、室温で1時間、インキュベートした。プレートを、PBST(PBS、pH7.4、0.05%Tween-20)により6度、洗浄し、そして次に、TMB及び1NのHClにより展開した。

20

【0608】

表6は、この実験の結果を提供する。データは、表6における基質を含む抗-IL6R活性化可能抗体が、RA患者から得られた少なくともいくつかの滑液サンプル(SyF)により切断されることを示唆する。

30

【0609】

【表29】

表6. 活性化可能抗体活性化

基質/配列	インビボでの活性化	SyFでの活性化	SyFでの発生
10419 ISSGLSS (配列番号159)	<5%	>30%	3/3
559 QNQALRMA (配列番号15)	<5%	20%	3/3
601 AQNLGMV (配列番号16)	<5%	>30%	3/3
3457 STFPGMF (配列番号17)	10%	>50%	3/3
3458 PVGYTSSL (配列番号18)	10%	20%	3/3
3463 DWLYWPGI (配列番号19)	<5%	>30%	3/3

【0610】

実施例2. 腫瘍増殖を阻害するためのMMP - 切断可能基質を有する活性化可能抗-EGRF抗体

この実施例は、アミノ酸配列CISPRGCPDGPYVMY (配列番号160)を含むマスキング部分、MMP14基質520 (本明細書においては、MN520としても呼ばれる) ISSGLLSS (配列番号14)を含む切断部分、及び抗-EGRF抗体C225v5 (ここで、完全な活性化可能抗体コンストラクトは、本明細書においてPb-MN520とも呼ばれる)のH鎖 (配列番号56)及びL鎖 (配列番号59)を含む活性化可能抗-EGRF抗体の、H292異種移植肺癌モデルにおける腫瘍増殖を阻害する能力を示す。活性化可能抗体のL鎖の配置は、マスキング部分 - MMP基質 - C225v5のL鎖であった。

【0611】

図1Aは、異なった時間で投与される、Pb-520 (12.5mg/kg、青の実線)及びIVIG (12.5mg/kg、緑の点線)を用いて処置されたH292異種移植腫瘍担持マウスに見られる効果を示すグラフである。データは、平均腫瘍体積±SEMとして表される。図1Bは、H292腫瘍担持マウスにおけるPb-520活性化可能抗体の全身安定性を示すグラフである。血液サンプルを、7日目、眼窩後部採血を通して取り、そして基質520の循環安定性を、キャピラリー電気泳動 (GXII: Caliper LifeSciences)によるIgGブル-ダウンの分析により決定した。切断された、及び切断されていないL鎖の濃度を、LabChip GXソフトウェア(Caliper LifeSciences)を用いて決定した。

【0612】

実施例3. 材料及び方法

試薬及び菌株：ストレプタビジン - 接合フィコエリトリン (SA - PE) (Invitrogen, Life Technologies)を、変性しないで使用した。ヒトMMP9 (Research & Diagnostics Systems, Inc.)を、供給されるプロトコルに従って活性化し、そして変性しないで使用した。ヒトMMP14 (Research & Diagnostics Systems, Inc.)を、供給されるプロトコルに従って活性化し、そして変性しないで使用した。ヒトプラスミン (Haematologic Technologies Inc.)を、変性しないで使用した。ヒトtPA (Molecular Innovations)を、変性しないで使用した。Mona (単球アダプターナンパク質)のSH3ドメインに融合されるYPEを、YPEを、CytamX Therapeuticsで製造し、そして変性しないで使用した。MMP14緩衝液HCM (50mMのHEPES (pH 6.8)、10mMのCaCl₂、0.5mMのMgCl₂)を使用した。MMP9緩衝液TCNB (50mMのトリス-HCl、10mMのCaCl₂、150mMのNaCl、0.05% (w/v) のBrig-35、pH 7.5)を使用した。プラスミン緩衝液(50

10

20

30

40

50

mMのトリス-HCl pH 7.5、100 mMのNaCl、0.01%のTween 20及び1 mMのEDTAを使用した。TBS-T(50 mMのトリス-HCl、150 mMのNaCl、0.05%のTween 20、pH 7.4)を使用した。E.コリMC1061(Casadaban et al, JMB 138(2): 179-207 (1980)を使用した。すべての細菌増殖を、別の構成物質が指定される限り、34 µg/mlのクロラムフェニコールにより補充されたLuria-Bertani培養液(LB)中で、激しく振盪しながら、37℃で行った。

【0613】

基質切断及びスカフォールド安定性分析：スクリーニング及びクローン分析のために、一晩の培養物を、新鮮な培地による希釈(1:50)により継代培養し、そして1.5-2時間、増殖した。次に、継代培養物を、0.04%のアラビノースにより誘発し、そして37℃で45分-1時間、振盪しながらインキュベートした。さらなる増殖を停止するために、細胞を、15分-1時間、氷上でインキュベートした。細胞アリコートを収穫し、そしてPBS(pH 7.4)により洗浄した。細胞を遠心分離によりペレット化し、上清液を除き、そして細胞を、酵素を含む反応緩衝液に再懸濁し；反応混合物を37℃で静的にインキュベートした。反応を停止するために、細胞を除き、そしてPBSにより10倍に希釈し、遠心分離によりペレット化し、そして(CLIPS)SA-PE(20 µg/ml)又はYPet-MONA(50 nM)の何れかを含むPBSに再懸濁した。氷上のインキュベーション(30分)の後、細胞をPBSにより洗浄し、そしてFACSAria(登録商標)細胞ソーターを用いて分析した。

【0614】

MMP9プロテアーゼ切断分析のために、培養物を、45分-1時間、誘発した。MMP9のための反応緩衝液はTCNBであった。MMP9加水分析のための圧迫を実施し、その後、新鮮な細胞を、5 nM-25 nMのMMP9と共に1時間インキュベートした。基質部位を端に有する領域のバックグラウンド分析(2014年2月13日、国際公開第2014/026136号として公開された、2013年8月9日、提出されたPCT特許出願US13/54378号に記載されるプラットフォームeCLIPS3.0-NSUB_SPを用いる；それらの内容は、それらの全体が参考により本明細書に組込まれる)を、各反応条件下で測定し、加水分解が企画される基質領域に発生したことを確認した。

【0615】

MMP14プロテアーゼ切断分析のために、培養物を、45分-1時間、誘発した。MMP14のための反応緩衝液はHCMであった。3 nM-250 nMのMMP14との反応又は1時間後、MMP14加水分析のためのアッセイを実施した。基質部位を端に有する領域のバックグラウンド分析(本明細書に記載されるプラットフォームeCLIPS3.0-NSUB_SPを用いる)を、加水分解が企画される基質領域に発生したことを確認するために各反応条件下で測定した。

【0616】

ヒトプラスミン安定性アッセイのために、プラットフォームeCLIPS3.0-NSUB_SPを使用し；培養物を、45分-1時間、誘発する。プラスミンのための反応緩衝液は、100 mMのNaCl、0.01%のTween 20及び1 mMのEDTAにより補充された50 mMのトリス-HCl(pH 7.5)である。プラスミン加水分解についての分析を、プラスミンとの1時間の反応の後、実施する。

【0617】

ヒトtPA安定性アッセイのために、プラットフォームeCLIPS3.0-NSUB_SPを使用し；培養物を、45分-1時間、誘発する。tPAのための反応緩衝液は、TBS-Tである。tPA加水分解についての分析を、tPAとの1時間の反応の後、実施する。

【0618】

アミノ及びカルボキシ末端標識条件：ストレプタビシン接合フィコエリトリン(SAPE)を、CPXのN-末端上でのストレプタビシン結合親和性リガンドを標識するために使用した。MonaのSH3ドメインに融合される蛍光タンパク質YPetを、CPXの

10

20

30

40

50

C - 末端上のMONA結合親和性リガンドを標識するために使用した。プロテアーゼ反応を伴わないでの細胞の最適な標識のために、細胞を、SAPe (20 μg / ml) 又はYPet-MONA (50 nM)と共に4℃で30分間インキュベートした。記載される下記実験側については、30分インキュベーションを使用した。

【0619】

キネティックデータ分析：細胞表面表示ペプチド基質の転換の程度を、フローサイトメトリーを用いて、直接的に測定し、プロテアーゼ処理に基づくクローニング細胞集団の平均蛍光の変化を測定した。特に、各サンプルについて、転換は、下記関係を用いて、フローサイトメトリー分析により決定した：

【0620】

【数1】

10

$$\text{転換} = \frac{FL_- - FL_+}{FL_- - FL_0} \quad [1]$$

【0621】

ここで (FL_-) は、酵素なしでのインキュベーションの後での蛍光であり、(FL_+) は、酸素とのインキュベーションの後での蛍光であり、そして (FL_0) は、標識されていない細胞の蛍光である。使用された予測される基質濃度が、有意に標的プロテアーゼのための基質の予測される K_M 以下である場合、ミカエリス・メンテンモデルは、下記のように単純になり：

【0622】

【数2】

20

$$\frac{d[S]}{dt} \approx -\frac{k_{cat}}{k_M}[S][E] \quad [2]$$

30

【0623】

下記のように表される基質転換を可能にする：

【0624】

【数3】

$$\text{転換} = 1 - \exp \left(-\frac{k_{cat}}{k_M} \cdot [E] \cdot t \right) \quad [3]$$

【0625】

40

ここで [S] は基質濃度であり、[E] は酵素濃度であり、そして t は時間である。二次速度定数 (k_{cat} / K_M) を決定するために、等式 [3] が下記のように単純化された：

【0626】

【数4】

$$k_{cat}/K_m = -In(1-C)/(t^*p)$$

【0627】

ここで C は生成物転換であり、t は時間であり、そして p はプロテアーゼ濃度である。

50

【0628】

配列データ分析 - 指導されるファミリー : 基質を、 Ion Torrent (登録商標) 配列決定 (例えば、Rothenberg, JM, Nature 475, 348-352を参照のこと)に提出した。生の Ion Torrent 読み取りは、ちょうどどの可変ペプチド挿入体を得るために、不变ベクター配列が取られた。挿入体配列を翻訳し、そして終止コドンを有する配列を、さらなる分析のために除外した。各配列の頻度を、観察される全生存ペプチド読み取りから観察される回数により得た。配列の事前選択の頻度への各配列の事後選択の観察される頻度の比較により得た。個々の配列を、それらのデータから同定し、そして単離し、そして配列を CLC メイン lab (CLC Main Workbench 6.6.2、オンラインで利用可能)において整列した。その整列ファイルは、 Jalview にインポートされ (例えば、Waterhouse, A.M., et al, 2009, Bioinformatics 9, 1189-1191を参照のこと)、そして平均距離ツリーを、 BLOSUM62 アルゴリズム (Henikoff S et al, 1992, Proc Natl Acad Sci U S A. 89, 10915-10919) を用いてアセンブルした。制限される配列グループは、目的の配列に最も近いクラスターメンバーを包含する。配列の拡張グループは、制限された配列グループ、及び最も近い共通祖先を共有する (適用できる) 分岐メンバーを包含する。

【0629】

実施例 4 . プラットフォームスカフォールドにおける基質プールの選択及び特徴づけ

全細胞上への多コピー基質表示の使用は、 MMP9 により切断された基質集団の選択を可能にした。選択は、組換えヒト MMP9 を用いて、 2010 年 2 月 23 日に発行された米国特許第 7,666,817 B2 号に記載されるようにして実施された。基質部位を端に有する領域のバックグラウンド分析 (プラットフォーム eCLIPS3.0-NSUB_SP を用いる) を、加水分解が企画される基質領域に発生したことを確認するために各反応条件下で測定した。選択されたプールを、 MMP9 及び MMP14 により試験した。図 2A 及び 2B は、 TCBNB 緩衝液中、 5 nM での MMP9 によるプール SMP87 の切断を示す。

実施例 5 . プラットフォームスカフォールドにおける基質切断キネティックの特徴づけ

【0630】

全細胞上への多コピー基質表示の使用は、切断キネティックの単純且つ直接的な定量的特徴づけを可能にした。結果的に、フローサイトメトリーを使用し、基質転換に基づいて個々の単離されたクローンをランク付けし、そしてクローンを、 DNA 配列決定により同定した。このようにして、各クローンについての転換の程度を、いくつかの異なったプロテアーゼ濃度で決定し、そしてミカエリス・メンテンモデル (キネティックデータ分析セクション) に適合せしめる。観察された二次速度定数 (k_{cat} / K_M) を、 MMP9 に対する各基質について決定した。基質部位を端に有する領域のバックグラウンド分析 (プラットフォーム eCLIPS3.0-NSUB_SP を用いる) を、加水分解が企画される基質領域に発生したことを確認するために各反応条件下で測定した。例えば、図 3A 及び 3B は、 TBS-T 中、 5 nM の MMP9 によるアミノ酸配列 VAGRSMRP (配列番号 484) を含む基質の切断を示す。

【0631】

実施例 6 . プラットフォームスカフォールドにおける次世代配列決定頻度と基質切断キネティックスの相互関係

富化された基質の最終プールを、 Ion Torrent 次世代配列決定を用いて配列決定した。生の Ion Torrent 読み取りは、ちょうどどの可変ペプチド挿入体を得るために、不变ベクター配列が取られた。挿入体配列を翻訳し、そして終止コドンを有する配列を、さらなる分析のために除外した。クローン (広範囲の頻度を示す) の選択を、機能的分析のために行った。選択されたクローンを、ヒト MMP9 により切断し、そして k_{cat} / K_M を個々について決定した。次に、プール内のクローンコピー数の対数を、 k_{cat} / K_M の対数に対してプロットした。図 4 は、特定の切断部分の頻度 (コピー数) と、 MMP9 により切断されるそれらの能力 ($MMP9 k_{cat} / K_M M^{-1} s^{-1}$) との間の相互関係を示す。

【0632】

実施例 7 . プラットフォームスカフォールドにおける基質プールの選択及び特徴づけ

10

20

30

40

50

全細胞上への多コピー基質表示の使用は、MMP14により切断された基質集団の選択を可能にした。選択は、組換えヒトMMP14を用いて、米国特許第7,666,817B2号に記載されるようにして実施された。基質部位を端に有する領域のバックグラウンド分析（プラットフォームeCLiPS3.0-NSUB_SPを用いる）を、加水分解が企画される基質領域に発生したことを確認するために各反応条件下で測定した。選択されたプールを、MMP9及びMMP14により試験した。図5A及び5Bは、HCM緩衝液中、60nMでのMMP14によるプールSMP39の切断を示す。

【0633】

実施例8. プラットフォームスカフォールドにおける基質切断キネティックの特徴づけ

全細胞上への多コピー基質表示の使用は、切断キネティックの単純且つ直接的な定量的特徴づけを可能にした。結果的に、フローサイトメトリーを使用し、基質転換に基づいて個々の単離されたクローンをランク付けし、そしてクローンを、DNA配列決定により同定した。このようにして、各クローンについての転換の程度を、いくつかの異なったプロテアーゼ濃度で決定し、そしてミカエリス・メンテンモデル（キネティックデータ分析セクション）に適合せしめる。観察された二次速度定数（ k_{cat}/K_m ）を、MMP14に対する各基質について決定した。基質部位を端に有する領域のバックグラウンド分析（プラットフォームeCLiPS3.0-NSUB_SPを用いる）を、加水分解が企画される基質領域に発生したことを確認するために各反応条件下で測定した。例えば、図6A及び6Bは、HCM緩衝液中、30nMのMMP14によるアミノ酸配列Q N Q A L R M A（配列番号15）を含む基質の切断を示す。

【0634】

実施例9. 活性化可能抗体におけるインピトロ基質活性

この実施例は、本開示の基質が活性化可能抗体中に組込まれる場合、それらの基質のインピトロ活性を示す。

【0635】

この研究で同定されるいくつかの基質を、3954マスク細胞 / 及びセツキシマブのC225v5変異体（国際公開番号2013/163631に記載され；それはその全体を参照により本明細書に組込まれる）を有する活性化可能抗体中に挿入した。

【0636】

その得られる活性化可能抗体における基質のMMP9又はMMP14により切断される能力を、次の通りに決定した。MMP9プロテアーゼ消化を、T C N B、50 mMのトリス-HCl、10 mMのCaCl₂、150 mMのNaCl、0.05% (w/v) のBrrij-35、pH 7.5において実施した。MMP14消化を、50 mMのHEPES (pH 6.8)、10 mMのCaCl₂、0.5 mMのMgCl₂において実施した。種々の濃度の活性部位滴定MMP9又はMMP14と、固定された濃度の活性化可能抗体とを組合し、プロテアーゼに対する基質の比率を50に維持した。MMP9基質を含むサンプルを、37で24時間までインキュベートした。MMP14基質を含むサンプルを、37で4時間インキュベートした。反応を停止するために、5 μlの消化物を、20 mMの2-メルカプトエタノールを含むHt Protein Express Sample Buffer (Caliper LifeSciences) 7 μlに、95で10分間にわたって添加した。熱変性の後、32 μlのddH₂Oを添加し、そしてサンプルを、LabChip GXII上で、その製造業者の説明書に従って分析した。LabChip GXIIソフトウェアを用いて、L鎖ピーク領域を定量化した。生成物転換を、次の等式中にL鎖ピーク領域を挿入することにより計算した：切断されたLC（切断されたLC + 切断されていないLC）、LC = L鎖。 k_{cat}/K_m 値を、次の等式により決定した：

【0637】

【数5】

$$k_{cat}/K_m = -I_n(1-C)/(t^*p)$$

10

20

30

40

50

【 0 6 3 8 】

ここで、Cは生成物転換であり、tは時間（秒）であり、そしてpはプロテアーゼ濃度(M)であり、これは、基質濃度がK_m以下であり、そしてプロテアーゼ濃度を越えていることを想定している。

【 0 6 3 9 】

MMP14による切断について試験されたMMP14による切断のために選択された基質を含む、得られる活性化可能抗体は、MMP14について約400~60,000 M⁻¹ s⁻¹の範囲のk_{cat}/K_m値を有した。MMP9による切断について試験されたMMP9による切断のために選択された基質を含む、得られる活性化可能抗体を、MMP9により切断した。

10

【 0 6 4 0 】**実施例10. インビボでの活性化可能抗体の基質安定性**

この実施例は、本開示の基質が活性化可能中に組込まれ、そしてマウス中に注入される場合のそれらの基質のインビボ安定性を示す。

【 0 6 4 1 】

3匹のヌードマウス(Crl : NU - Foxn1nu)は、0日目、12.5 mg/kgで、それぞれ活性化可能抗体の単一IP投与を受けた。マウスは、CO₂窒息により、4日目(投与後、約96時間)、安樂死させ、そして血液を、血漿 - EDTAとして、すぐに集め、そして-80°で貯蔵した。

20

【 0 6 4 2 】

活性化可能抗体を、磁気ビーズを用いて、抗-ヒトIgG免疫沈澱により血漿から精製した。溶出された活性化可能抗体を、k_{cat}/K_mセクションに記載されるようにして、キャピラリー電気泳動による分析のために調製した。手短には、5 μlの溶出されたIgGを、7 μlのタンパク質発現サンプル緩衝液に、2-メルカプトエタノールと共に添加した。循環安定性の定量化は、生成物転換の定量化と同一であった。

【 0 6 4 3 】

MMP14による切断のために選択された本開示の基質を含む10個の活性化可能抗体のうち、7個は、採血された血漿サンプルにおいて20%未満の切断を示した。MMP9による切断のために選択された本開示の基質を含む7個の活性化可能抗体のうち、4個は、採血された血漿サンプルにおいて20%以下の切断を示した。

30

【 0 6 4 4 】**実施11. 材料及び方法**

試薬及び菌株：ヒトMMP9(カタログ番号911-MP、Research & Diagnostics Systems, Inc.)を、提供されたプロトコルに従って活性化し、そして変性なしに使用した。ヒトMMP14(カタログ番号918-M、Research & Diagnostics Systems, Inc.)を、提供されたプロトコルに従って活性化し、そして変性なしに使用した。ヒトプラスミン(カタログ番号HCPM-0140、Haematologic Technologies Inc.)を、変性しないで使用した。抗-EEモノクローナル抗体(Covance, Princeton, NJ)を、Alexa647(Life Sciences)により標識し、そして他の変性なしに使用した(E647と称する)。E.コリMC1061又はMC1061由来の菌株(DH10)を、すべての実験のために使用した(Casadaban et al., JMB 138(2): 179-207 (1980))。すべての細菌増殖を、別の抗生物質が特定されない限り、34 μg/mlのクロラムフェニコール(cm)により補充されたLuria-Bertaniブイヨン(LB)において、激しい振盪下で37°で実施した。

40

【 0 6 4 5 】

ディスプレイプラットフォーム：本実施形態の8-アミノ酸基質を含むようそれぞれ構築されたディスプレイプラットフォームを、2014年2月13日に公開された国際公開番号第2014/026136号(この内容は、それらの全体が参照により本明細書に組込まれる)に記載されるようにして、生成し、そして使用した。成熟(すなわち、シグナルペプチドを有さない)CYTX-DP-XXXXXXディスプレイプラットフォー

50

ム（配列番号 512）のアミノ酸配列が、図 7A に示されている。XXXXXX（配列番号 514）は、各基質が挿入される位置を示す。そのシグナルペプチドもまた含む CYTX-DP-XXXXXXX（配列番号 512）ディスプレイプラットフォーム、すなわち SP-CYTX-DP-XXXXXXX（配列番号 513）ディスプレイプラットフォームのアミノ酸配列が、図 7B に示される。

【 0 6 4 6 】

C Y T X - D P - X X X X X X X X のディスプレイプラットフォーム：

【化 8 0】

GQSGQEYMPMEGGSGXXXXXXXXXSGGQGGSGGSGGSGGSAYYGITAGPAYRINDWASIYGVVG VGYGSGPGGSYGFSGAGLQFNP ENVALDFSYEQSRIHSVGTWILSVGYRGFSKSRATSTVGGYAQSDAQGQMNKMGGFNLKYRYEEDNSPLGVIGSFTYTGGSGGSSGQAAGHHHHHHHHH (配列番号 5.1.2)

(0 6 4 7)

S P - C Y T X - D P - X X X X X X X X ディスプレイプラットフォーム :

【化 8 1】

MKKIACLSALAALVLAFTAGTSVAGQSGQEYMPMEGGSGQXXXXXXXXSGGQGGSGSGSGGGSA YYGITAGPAYRINDW
ASIYGWGVGYGSGPGGSYGFSYAGLQFNP ENVALDFSYEQRIRSVDVGTWILSVGYRGSKSRRATSTVTGGYAQSDAQG
QMNKMGGFNLKYRYEEDNSPLGVIGSFTYTGGSGG SSSGQAAAGHHHHHHHHHH (配列番号 5, 1, 3)

〔 0 6 4 8 〕

基質切断及び切断キネティクス分析：クローニング分析のために、一晩の培養物を、新鮮な培地による希釈（1：40）により継代培養し、そして1.5-2時間、増殖した。次に、継代培養物を、0.04%のアラビノースにより誘発し、そして37℃で40分-1時間、振盪しながらインキュベートした。さらなる増殖を停止するために、細胞を、15分-1時間、氷上でインキュベートした。細胞アリコートを収穫し、そしてPBS（pH 7.4）により洗浄した。細胞を遠心分離によりペレット化し、上清液を除き、そして細胞を、酵素を含む反応緩衝液に再懸濁し；反応混合物を37℃で振盪しながらインキュベートした。反応を停止するために、細胞を除き、そしてPBSにより10倍に希釈し、遠心分離によりペレット化し、そしてEE647（20 μg/ml）を含むPBSに再懸濁した。氷上のインキュベーション（1時間）の後、細胞をPBSにより洗浄し、そしてAc curi C6細胞ソーターを用いて分析した。

【 0 6 4 9 】

MMP-9プロテアーゼ切断アッセイのために、培養物を45分間、誘発した。MMP-9のための反応緩衝液は、150 mMのNaCl、10 mMのCaCl₂及び0.05% (w/v) のBrrij-35により補充された、50 mMのトリス-HCl (pH 7.4) であった。MMP-9加水分解についてのアッセイを、5 nM - 150 nMのMMP-9による1時間の切断の後、実施した。基質部位を端に有する領域のバックグラウンド加水分解（例えば、CYT-X-DP-NSUB、すなわち「基質」が非切断可能リンカーGGSGGGS（配列番号515）であるディスプレイプラットフォームを用いる）を、加水分解が企画される基質領域において発生したことを確保するために各反応条件下で測定した。

〔 0 6 5 0 〕

MMP14プロテアーゼ切断アッセイのために、培養物を45分間、誘発した。MMP14のための反応緩衝液は、10 mMのCaCl₂及び0.5 mMのMgCl₂により補充された、50 mMのHEPES(pH 6.8)であった。MMP14加水分解についてのアッセイを、5 nM-150 nMのMMP14による1時間の切断の後、実施した。基質部位を端に有する領域のバックグラウンド加水分解(例えば、CYTX-DP-NSUBを用いる)を、加水分解が企画される基質領域において発生したことを確保するた

めに各反応条件下で測定した。

【0651】

ヒトプラスミン安定性アッセイのために、培養物を45分間、誘発した。プラスミンのための反応緩衝液は、100 mMのNaCl、0.01%のTween 20及び1mMのEDTAにより補充された、500 mMのトリス-HCl(pH 7.4)であった。プラスミン加水分解についてのアッセイを、500 pMのプラスミンによる1時間の切断の後、実施した。基質部位を端に有する領域のバックグラウンド加水分解(例えば、CYTX-DP-NSUBを用いる)を、加水分解が企画される基質領域において発生したことを確保するために各反応条件下で測定した。

【0652】

アミノ及びカルボキル末端標識条件：Alexa-647接合抗-EE抗体(EE647)を、CYTX-DPディスプレイプラットフォームのN-末端上にEE結合親和性リガンドを標識するために使用した。Alexa-647接合抗-His抗体(His647)を、CYTX-DPディスプレイプラットフォームのC-末端上に8His結合親和性リガンドを標識するために使用した。プロテアーゼ反応を伴わないでの細胞の最適的な標識のために、細胞を、EE647(20 μg/ml)又はHis647(2 μg/ml)と共に、4℃で1時間インキュベートした。下記実施例のために、1時間のインキュベーションを使用した。

10

【0653】

キネティックデータ分析：細胞表面表示ペプチド基質の転換の程度を、フローサイトメトリーを用いて、直接的に測定し、プロテアーゼ処理に基づくクローン細胞集団の平均蛍光の変化を測定した。特に、各サンプルについて、転換は、下記関係を用いて、フローサイトメトリー分析により決定した：

20

【0654】

【数6】

$$\text{転換}_{\text{CLiPS}} = \frac{FL_- - FL_+}{FL_- - FL_0} \quad [1]$$

30

【0655】

ここで(FL_-)は、酵素なしでのインキュベーションの後での蛍光であり、(FL_+)は、酸素とのインキュベーションの後での蛍光であり、そして(FL_0)は、標識されていない細胞の蛍光である。使用された予測される基質濃度が、有意に標的プロテアーゼのための基質の予測される K_M 以下である場合、ミカエリス・メンテンモデルは、下記のように単純になり：

【0656】

【数7】

40

$$\frac{d[S]}{dt} \approx -\frac{k_{\text{cat}}}{k_M}[S][E] \quad [2]$$

【0657】

下記のように表される基質転換を可能にする：

【0658】

【数8】

$$\text{転換}_{MM} = 1 - \exp\left(-\frac{k_{cat}}{k_M}[E] \cdot t\right) \quad [3]$$

【0659】

ここで $[S]$ は基質濃度であり、 $[E]$ は酵素濃度であり、そして t は時間である。二次速度定数 (k_{cat} / K_M) を決定するために、各基質のための時間依存性転換は、等式 [10
3] 適合された。

【0660】

実施例 12. CYTX-DP ディスプレイプラットフォームにおける基質切断性の特徴づけ

この実施例は、プラスミンによらないで、MMPにより切断される、本実施形態の基質の abilities を示す。

【0661】

全細胞上への多コピー基質表示の使用は、切断キネティックの単純且つ直接的な定量的特徴づけを可能にした。基質をコードするクローナーを、DNA配列決定により同定し、そして CYTX-DP ディスプレイプラットフォーム中にサブクローナー化し、結果的に、その発現されたディスプレイプラットフォームは、XXXXXX (配列番号 514) の代わりに、8-アミノ酸基質を含んだ。個々の基質表示クローナー (全部で 127 の独立した基質含有ディスプレイプラットフォーム) を、MMP9 又は MMP14 (標的プロテアーゼ、すなわち基質を選択するために使用されるプロテアーゼ) の何れか及びプラスミン (標的外プロテアーゼ) による切断について評価し；ターンオーバーを、フローサイトメトリーにより決定した。31 の MMP9 - 選択された基質を、アミノ酸配列番号 17、18、19、20、21、22 又は 23 を含む基質の源であった同じプール (プールからの MMP9 基質) から選択した。9 の MMP9 - 選択された基質は、コンセンサスアミノ酸配列番号 328、336、337、338、339、348、349、350 又は 351 (MMP9 コンセンサス配列) を含む。38 の MMP14 - 選択された基質を、アミノ酸配列番号 14、15、16、24、25、26、27、28、29、30 又は 33 を含む基質の源であった同じプール (第1プールからの MMP14 基質) から選択した。10 の MMP14 - 選択された基質を、アミノ酸配列番号 31 又は 32 を含む基質の源であった同じプール (第2プールからの MMP14 基質) から選択した。39 の MMP14 - 選択された基質を、コンセンサスアミノ酸配列番号 364 - 370、379 - 393、402 - 409、420 - 424、434 - 435、450 - 452、457、470 - 472、474 又は 483 (MMP14 コンセンサス配列) から選択した。

【0662】

このようにして、各クローナーについての切断の程度を決定し、そしてデータを集約し、標的プロテアーゼにより切断されるクローナーの % 及標的外プロテアーゼにより切断されないクローナーの % を決定した。基質部位を端に有する領域のバックグラウンド加水分解 (例えば、CYTX-DP-NSUB を用いる) を、加水分解が企画される基質領域において発生したことを確保するために各反応条件下で測定した。結果を、表 9 に提供する。

【0663】

【表30】

表9. 基質切断性の統計学的要約

発見努力	基質グループ	50 nMのMMP 9又はMMP 14による>20%の切断	500 pMのプラスミンによる<20%の切断
MMP 9 - 選択された基質	試験されるすべての MMP 9 基質	35% (14/40)	85% (34/40)
	プールからの MMP 9 基質	39% (12/31)	82% (26/31)
	MMP 9 コンセンサス 基質	22% (2/9)	89% (8/9)
MMP 14 - 選択された基質	試験されるすべての MMP 14 基質	85% (74/87)	94% (82/87)
	第1プール及び第2プールからの MMP 14 基質	79% (38/48)	94% (45/48)
	第1プールからの MMP 14 基質	79% (30/38)	95% (36/38)
	第2プールからの MMP 14 基質	80% (8/10)	100% (9/10)
	MMP 14 コンセンサス 基質	92% (36/39)	95% (37/39)
組合された MMP 9 及び MMP 14	合計	69% (88/127)	91% (116/127)

【0664】

表9は、(a) 150 mMのNaCl、10 mMのCaCl₂及び0.05% (w/v)のBrrij-35により補充された、50 mMのトリス-HCl (pH 7.4) 中で、37 °Cで1時間、50 nMのヒトMMP 9 (カタログ番号911-MP、Research & Diagnostics Systems, Inc.)、供給されるプロトコルに従って活性化され、そして変性なしに使用されると共にインキュベートされる場合、少なくとも20%の切断率を示した、CYT-X-DPディスプレイプラットフォームにおいて試験されたMMP 9 - 選択された基質の% (50 nMのMMP 9に関しては>20%の切断率)；(b) 10 mMのCaCl₂及び0.0 mMのMgCl₂により補充された、50 mMのHEPES (pH 6.8) 中で、37 °Cで1時間、50 nMのヒトMMP 14 (カタログ番号918-MP、Research & Diagnostics Systems, Inc.)、供給されるプロトコルに従って活性化され、そして変性なしに使用されると共にインキュベートされる場合、少なくとも20%の切断率を示した、CYT-X-DPディスプレイプラットフォームにおいて試験されたMMP 14 - 選択された基質の% (50 nMのMMP 14に関しては>20%の切断率)；及び(c) 100 mMのNaCl、0.01%のTween 20及び1 mMのEDTAにより補充された、50 mMのトリス-HCl (pH 7.4) 中で、37 °Cで1時間、500 pMのヒトプラスミン (カタログ番号HCPM-0140、Haematologic Technologies, Inc.)、変性しないで使用されると共にインキュベートされる場合、20%未満の切断率を示した、CYT-X-DPディスプレイプラットフォームにおいて試験された、MMP 9 - 選択された、又はMMP 14 - 選択された基質の%を示す。

【0665】

実施例13. CYT-X-DPディスプレイプラットフォームにおける基質切断キネティクスの特徴づけ

この実施例は、種々の基質の切断キネティクスを示す。

【0666】

全細胞上への多コピー基質表示の使用は、切断キネティクスの単純且つ直接的な定量

10

20

30

40

50

的特徴づけを可能にした。クローンを、DNA配列決定により同定し、そして前述の実施例に記載のようにして、CYT-X-DP-XXXXXX (配列番号512) ディスプレイプラットフォーム中にサブクローン化した。72の個々の基質-表示クローンを、切断について評価し、そしてそのサブセットを選択し、それらの標的プロテアーゼによる切断キネティクスを評価した。各クローンについての転換の程度を、いくつかの異なったプロテアーゼ濃度で決定し、そして本明細書に記載されるミカエリス・メンテンモデルに適合せしめた。次に、観察された k_{cat}/K_M 値を、基質プール内のクローンの頻度に対してプロットし、そして頻度と k_{cat}/K_M の間の相互関係が見出される。基質部位を端に有する領域のバックグラウンド加水分解（例えば、CYT-X-DP-NSUBを用いる）を、加水分解が企画される基質領域において発生したことを確保するために各反応条件下で測定した。結果を、表10に提供する。

【0667】

【表31】

表10. 基質キネティクスの統計学的要約

	基質グループ	標的プロテアーゼ $K_{cat}/K_M > 1 \times 10^{E2}$	標的プロテアーゼ $K_{cat}/K_M > 1 \times 10^{E3}$	標的プロテアーゼ $K_{cat}/K_M > 1 \times 10^{E4}$
MMP 9 基質	試験されるすべてのMMP 9 基質	100% (16/16)	100% (16/16)	63% (10/16)
	プールからのMMP 9 基質	100% (15/15)	100% (15/15)	67% (10/15)
	MMP 9 コンセンサス基質	100% (1/1)	100% (1/1)	0% (0/1)
MMP 14 基質	すべてのMMP 14	100% (55/55)	98% (54/55)	36% (20/55)
	第1プール及び第2プールからのMMP 14 基質	100% (47/47)	98% (46/47)	36% (17/47)
	第1プールからのMMP 14 基質	100% (38/38)	100% (38/38)	39% (15/38)
	第2プールからのMMP 14 基質	100% (9/9)	89% (8/9)	22% (2/9)
	MMP 14 コンセンサス基質	100% (8/8)	100% (8/8)	38% (3/8)
組合されたMMP 9 及びMMP 14	合計	100% (71/171)	99% (70/71)	42% (30/71)

【0668】

実施例14. MMP基質を含む活性化可能抗体のインピボ効能及び現場活性化

この実施例は、本実施形態のMMP基質を含む活性化可能抗体がインピボで効果的であることを実証する。この実施例はまた、そのような活性化可能抗体が、2014年7月10日に公開された国際公開第2014/107559号（この内容は、参照により本明細書に組込まれる）に記載されるように、現場イメージングアッセイにおいて活性可能であることも実証する。本実施形態の異なったMMP基質を含む6種の活性化可能抗体（1つのMMP9-選択された及び5つのMMP14-選択された）を、H292異種移植腫瘍担持（肺癌）マウスに、10mg/kg又は12.5mg/kgで投与した。すべての6種の活性化可能抗体はまた、アミノ酸配列CISPRGCPDGPYVMY（配列番号160）を含むマスキング部分、及びL鎖（配列番号59）及びH鎖（配列番号56）を含む抗-EGFR抗体C225v5抗体を含んだ。活性化可能抗体のL鎖の配置は、マスキング部分-MMP基質-C225v5のL鎖であった。すべての6種の活性化可能抗体は、平均% 阻害率により測定される場合、22%~81%の範囲の腫瘍増殖阻害率を示し

10

20

30

40

50

た。平均% 阻害率は、(平均(C) - 平均(C0)) - 平均(T0)) / (平均(C) - 平均(C0)) * 100 (ここで、Tは現試験グループ値であり、T0は現試験グループ初期値であり、Cは対照グループであり、そしてC0は対照グループ初期値である)として計算される。EGFR抗体セツキシマブは、この研究において96 - 98 %の阻害率を示した。

【0669】

同じ6種の活性化可能抗体を、国際公開第2014/107559号の実施例に記載される条件を用いて、H292腫瘍組織の現場イメージングアッセイに提供した。すべての6種の活性化可能抗体を活性化し、すべての6種のMMP基質を切断し、そして放出された抗体は、腫瘍組織上のEGFRに結合したことを実証する。染色シグナルは、セツキシマブのIHCシグナル強度の15% ~ 65%の範囲であった。一般的に、各活性化可能抗体の活性化の%は、活性化可能抗体がH292マウスマodelにおいて示される効能との正の相互関係を示した。10

【0670】

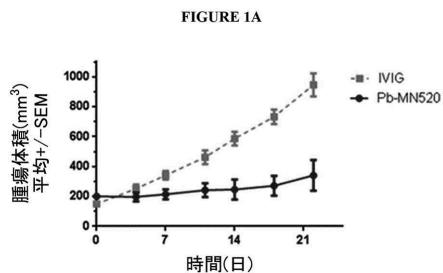
10人のトリプルネガティブ乳癌患者からの組織を、国際公開第2014/107559号の実施例に記載される条件下で、MMP14 - 選択された基質を含む抗-Jagged活性化可能抗体（例えば、2013年12月27日に公開された国際公開第2013/192550号に引用される抗-Jagged活性化可能抗体；それらの全体が参照により本明細書に組込まれる）を用いて現場イメージングに提供した。10の組織サンプルのうち9種は、セツキシマブのIHCシグナル強度に比較して、15% ~ 100%の範囲の活性化可能抗体活性化染色標点を示した。10の組織サンプルのうち8種は、セツキシマブのIHCシグナル強度に比較して、30% ~ 100%の範囲の活性化可能抗体活性化染色評点を示した。20

【0671】

他の実施形態

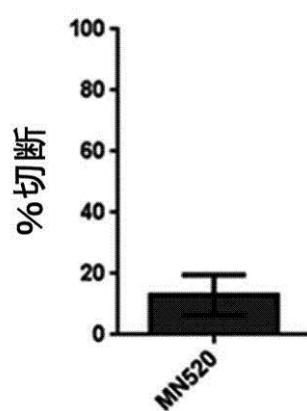
本発明はその詳細な説明と併せて説明して来たが、前述の説明は例示であって、特許請求の範囲を限定するものではない。他の側面、利点及び修飾は、添付の特許請求の範囲内である。

【図 1 A】



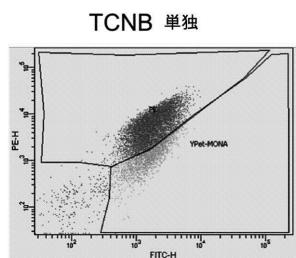
【図 1 B】

FIGURE 1B



【図 2 A】

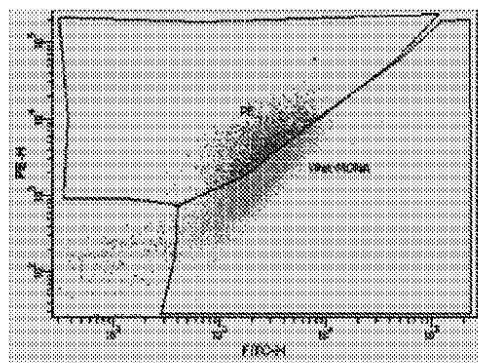
FIGURE 2A



【図 2 B】

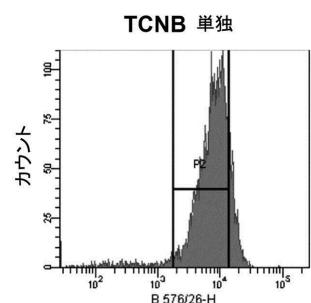
FIGURE 2B

5nM MMP-9



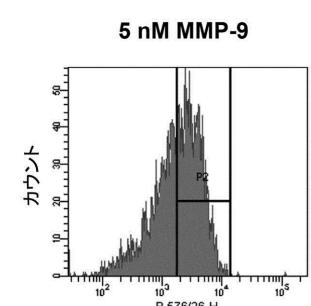
【図3A】

FIGURE 3A



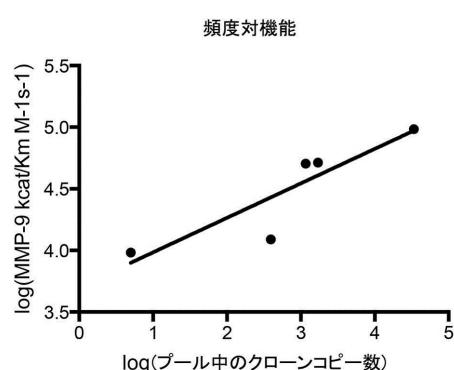
【図3B】

FIGURE 3B



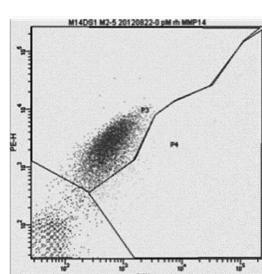
【図4】

FIGURE 4



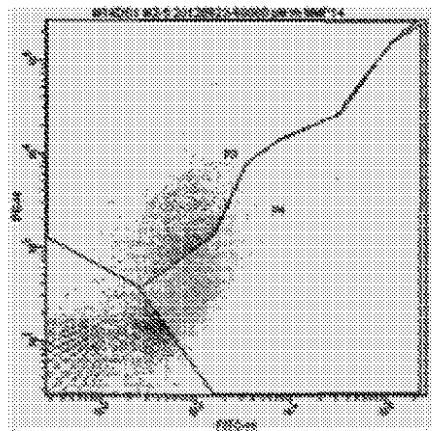
【図5A】

FIGURE 5A

HCM 単独

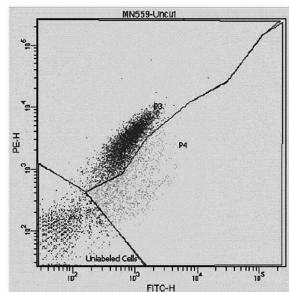
【図5B】

FIGURE 5B

60 nM MMP14

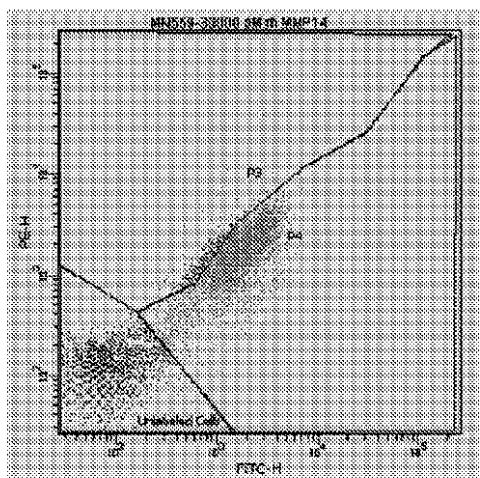
【図6A】

FIGURE 6A

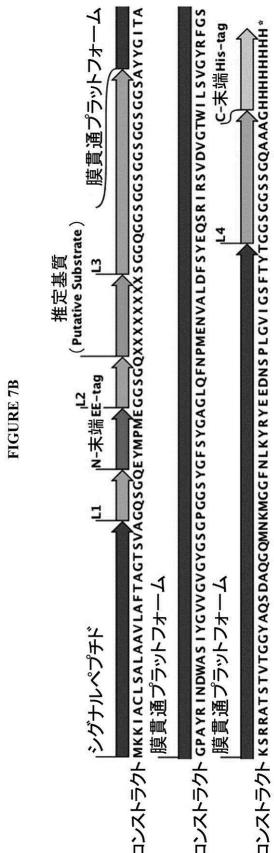
HCM 単独

【図 6 B】

FIGURE 6B

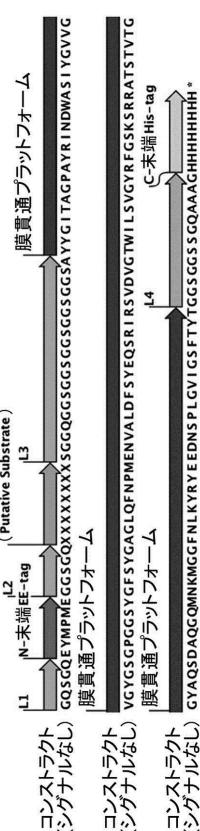
30 nM MMP14

【図 7 B】



【図 7 A】

FIGURE 7A



【配列表】

0006915987000001.app

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 61/971,332

(32)優先日 平成26年3月27日(2014.3.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100173107

弁理士 胡田 尚則

(72)発明者 スティーブン ジェイムズ ムーア

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94506, ダンビル, カントリー メドーズ レーン 21
8

(72)発明者 マーガレット ティー ルー グエン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95121, サンノゼ, プサテリ ウェイ 1176

(72)発明者 ダニエル アール. ホステッター

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94306, パロ アルト, パーク ブールバード 3909

(72)発明者 オルガ バジルジェバ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 95104, クパチーノ, ロドリゲス アベニュー 20080
#ティー

(72)発明者 ジャンヌ グレース フランデス

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94607, オークランド, テンス ストリート 555, #
115

合議体

審判長 田村 聖子

審判官 安居 拓哉

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 国際公開第2010/088691((WO, A2))

特表2012-514982(JP, A)

特表2010-536370(JP, A)

TURK B E; ET AL、DETERMINATION OF PROTEASE CLEAVAGE SITE MOTIFS USING MIXTURE-BASED ORIENTED PEPTIDE LIBRARIES、NATURE BIOTECHNOLOGY、米国、2001.07.発行、VOL:19, NO:7, PAGE(S):661 - 667

KRIDEL S J; ET AL、SUBSTRATE HYDROLYSIS BY MATRIX METALLOPROTEINASE-9、JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY、米国、2001.06.08発行、VOL:276, NO: 23, PAGE(S):20572 - 20578

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C07K19/00, 7/04, 16/28, C12N15/09

DB名 CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIplus(STN), UniProt/GenSeq, JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII)