

(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 I
<b>C O 7 K 19/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 19/00 Z N A
<b>C O 7 K 7/06 (2006.01)</b>	C O 7 K 7/06
<b>C O 7 K 16/28 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/28
<b>C 1 2 N 15/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00

請求項の数 14 (全 172 頁)

(21) 出願番号	特願2016-516911 (P2016-516911)	(73) 特許権者	514270641
(86) (22) 出願日	平成26年9月25日 (2014.9.25)		シトムクス セラピューティクス, インコーポレイティド
(65) 公表番号	特表2016-538240 (P2016-538240A)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 940
(43) 公表日	平成28年12月8日 (2016.12.8)		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,
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/057523		スイート 400
(87) 国際公開番号	W02015/048329	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成27年4月2日 (2015.4.2)		弁理士 青木 篤
審査請求日	平成29年9月25日 (2017.9.25)	(74) 代理人	100123582
審判番号	不服2019-12676 (P2019-12676/J1)		弁理士 三橋 真二
審判請求日	令和1年9月24日 (2019.9.24)	(74) 代理人	100092624
(31) 優先権主張番号	61/882,377		弁理士 鶴田 準一
(32) 優先日	平成25年9月25日 (2013.9.25)	(74) 代理人	100114018
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		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 14 のアミノ酸配列を含む、切断可能部分 (C M) を含む単離ポリペプチドであって、ここで、前記切断可能部分が、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 C M が、M M P 14 により切断される、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 (A B) を含み、

任意には、前記抗原結合フラグメントは、F a b フラグメント、F ( a b )<sub>2</sub> フラグメント、s c F v、s c A b、d A b、単ドメイン重鎖抗体、及び単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 C M 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 A B を含むとき、前記 A B が、前記 C M に連結され、

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、前記 C M 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】

50

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断することにより、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、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、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ISSGLSSS(配列番号14)；QNQALRMA(配列番号15)；AQNL LGMV(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)；RPSPMWAY(配列番号21)；WATPRPMR(配列番号22)；FRLLDWQW(配列番号23)；LKAA PRWA(配列番号24)；GPSHLVLT(配列番号25)；LPGGLSPW(配列番号26)；MGLFSEAG(配列番号27)；SPLPLRVP(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ISSGLSSS(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ISSGLSSS(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

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 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

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 (A B) 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、M M P に暴露される場合、切断され、そして剤が A B 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 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 - C M - A B 又は A B - M - 剤。いくつかの実施形態によれば、抗体は、A B と C M 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、C M 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 (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 - L P 1 - C M - L P 2 - A B 又は A B - L P 2 - C M - L P 1 - 剤。いくつかの実施形態によれば、各 L P 1 及び L P 2 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、L P 1 又は L P 2 の少なくとも 1 つは、(G S)<sub>n</sub>、(G G S)<sub>n</sub>、(G S G G S)<sub>n</sub> (配列番号 1) 及び (G G G S)<sub>n</sub> (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、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。

#### 【0013】

50

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 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 100 n M 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、F a b フラグメント、F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメント、s c F v、s c A b、d A b、単ドメイン H 鎖抗体、及び単ドメイン 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、M M P プロテアーゼは、組織において標的と共同在化され、そして M M P 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 C M を切断する。

20

【0018】

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。

【0019】

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 (M M P) のための基質である。M M P の例としては、次のものを包含する：M M P 1；M M P 2；M M P 3；M M P 7；M M P 8；M M P 9；M M P 10；M M P 11；M M P 12；M M P 13；M M P 14；M M P 15；M M P 16；M M P 17；M M P 19；M M P 20；M M P 23；M M P 24；M M P 26；及び M M P 27。いくつかの実施形態によれば、C M は、M M P 9、M M P 14、M M P 1、M M P 3、M M P 13、M M P 17、M M P 11、及び M M P 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、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 は、M M P 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 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 は、少なくとも M M P 9 及び M M P 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 M M P 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 M M P 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 M M P 14 基質を含む。

30

40

【0020】

いくつかの実施形態によれば、C M 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 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

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。

#### 【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。

#### 【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。

#### 【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 CM コンセンサス配列を含む。いくつかの実

10

20

30

40

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 C M 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 C M 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 C M 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 C M 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 C M 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 C M 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 C M 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.MMP 9 切断可能コアー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, 又はS; $X_{46}$ はA, F, R, S, 又はT; $X_{47}$ はG, H, T 又はY; $X_{48}$ はG, I, M, V, 又はW; 及び $X_{49}$ はF, L, 又はSであ る。)
	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、 $X_{42}$ はL, M, 又はS; $X_{43}$ はS 又はT; $X_{44}$ はF 又はL; $X_{45}$ はP; $X_{46}$ はA, F, 又はT; $X_{47}$ はG, H, T 又はY; $X_{48}$ はI, M, 又はW; 及び $X_{49}$ は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、 $X_{42}$ はL, M, 又はS; $X_{43}$ はS 又はT; $X_{44}$ はF ; $X_{45}$ はP; $X_{46}$ はA, F, 又はT; $X_{47}$ はG, H, 又はY; $X_{48}$ はI, M, 又はW; 及び $X_{49}$ は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、 $X_{42}$ はL 又はM; $X_{43}$ はS 又はT; $X_{44}$ はF; $X_{45}$ はP; $X_{46}$ はA 又はT; $X_{47}$ はH 又はY; $X_{48}$ はI 又はW; 及 び $X_{49}$ はFである。)
	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、 $X_{42}$ はG, I, R, 又はS; $X_{43}$ はH 又はT; $X_{44}$ はF, L, S, 又はV; $X_{45}$ はL, P, 又はR; $X_{46}$ はF, L , 又はS; $X_{47}$ はA, C, 又はG; $X_{48}$ はI, M, 又はV; 及 び $X_{49}$ はF 又は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、 $X_{42}$ はS; $X_{43}$ はT; $X_{44}$ はF 又はV; $X_{45}$ はL 又は P; $X_{46}$ はF 又はL; $X_{47}$ はG; $X_{48}$ はI 又はM; 及び $X_{49}$ はF である。)

【0031】

表 8 D. M M P 9 切断可能コアー C M 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。)
	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。)
	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。)
	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。)

10

20

30

【0032】

表 8 E . M M P 1 4 切断可能コアー C M 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, 又は Y; $X_{68}$ はA, F, H, I, L, M, N, P, R, S, 又は T; 及び $X_{69}$ はA, C, G, H, I, L, N, P, Q, R, S, T, V, 又は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, 又はS; $X_{65}$ はD又はG; $X_{66}$ はI又はL; $X_{67}$ はE, I, L, M, Q, R, 又はY; $X_{68}$ はF, H, L, M, R, 又はS; 及び $X_{69}$ はA, G, H, L, N, P, Q, 又はSである。)
	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又はT; $X_{63}$ はL, Q, S, 又は V; $X_{64}$ はA, L, R, 又はS; $X_{65}$ はG; $X_{66}$ はI又はL; $X_{67}$ はE, L, R, 又はY; $X_{68}$ はF, H, L, R, 又はS; 及び $X_{69}$ はH, L, P, 又は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又はT; $X_{63}$ はL, S, 又はV; $X_{64}$ はA, R, 又はS; $X_{65}$ はG; $X_{66}$ はL; $X_{67}$ はE, L, 又 はR; $X_{68}$ はF, H, 又はS; 及び $X_{69}$ はL, P, 又はSであ る。)
	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又はT; $X_{63}$ はL, S, 又はV; $X_{64}$ はR又はS; $X_{65}$ はG; $X_{66}$ はL; $X_{67}$ はL又はR; $X_{68}$ は F, H, 又はS; 及び $X_{69}$ はP又は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又はT; $X_{63}$ はL, S, 又はV; $X_{64}$ はR又はS; $X_{65}$ はG; $X_{66}$ はL; $X_{67}$ はL又はR; $X_{68}$ は S; 及び $X_{69}$ はP又はSである。)
	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, 又は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。)

10

20

30

【 0 0 3 3 】

【表 6】

コアCMコンセンサス 5	コアCMコンセンサス 5 (subgenus)
	Subgenus 5. 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。)
	Subgenus 5. 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, 又はR ; $X_{68}$ はS ; 及び $X_{69}$ はA, H, N, Q, 又はSである。)
	Subgenus 5. 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。)
	Subgenus 5. 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又はR ; $X_{68}$ はS ; 及び $X_{69}$ はH, 又はSである。)
	Subgenus 5. 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又はR ; $X_{68}$ はS ; 及び $X_{69}$ はH, 又はSである。)

10

20

【 0 0 3 4 】

表 8 F - 1 . M M P 1 4 切断可能コア - C M 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, 又は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又はM; $X_{77}$ はA, I, K, L, P, R, 又はV; $X_{78}$ はA, D, I, L, M, R, T, 又はV; 及び $X_{79}$ はA, F, G, H, I, L, P, Q, R, 又はSである。)
	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又はL; $X_{74}$ はA, E, N, Q, 又はS; $X_{75}$ はA, E, N, S, 又はT; $X_{76}$ はL又はM; $X_{77}$ はL又はR; $X_{78}$ はA, L, 又はT; 及び $X_{79}$ はF, G, L, R, 又は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又はL; $X_{74}$ はE, N, Q, 又はS; $X_{75}$ はA又はS; $X_{76}$ はL又はM; $X_{77}$ はR; $X_{78}$ はA又はT; 及び $X_{79}$ はF, L, 又はRである。)
	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又はL; $X_{74}$ はE, N, Q, 又はS; $X_{75}$ はA又はS; $X_{76}$ はL又はM; $X_{77}$ はR; $X_{78}$ はA; 及び $X_{79}$ はL又はRである。)

10

20

30

【 0 0 3 5 】

表 8 F - 2 . M M P 1 4 切断可能コアー C M 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, 又は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; 及び $X_{78}$ はA, C, D, E, G, I, L, M, Q, R, S, T, 又は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.MMP14 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。)	Subgenus 7.1: $X_{82} X_{83} X_{84} X_{85} X_{86} X_{87} X_{88} X_{89}$ (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。)
	Subgenus 7.2: $X_{82} X_{83} X_{84} X_{85} X_{86} X_{87} X_{88} X_{89}$ (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, 又は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, 又はSで ある。)
	Subgenus 7.3: $X_{82} X_{83} X_{84} X_{85} X_{86} X_{87} X_{88} X_{89}$ (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。)
	Subgenus 7.4: $X_{82} X_{83} X_{84} X_{85} X_{86} X_{87} X_{88} X_{89}$ (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, 又はT; $X_{86}$ はA, P, 又はR; $X_{87}$ は A, L, M, R, V, 又はY; $X_{88}$ はC, H, R, T, 又は W; 及び $X_{89}$ はA, F, L, R, S, 又はTである。)
	Subgenus 7.5: $X_{82} X_{83} X_{84} X_{85} X_{86} X_{87} X_{88} X_{89}$ (配列番号399) , (式中、 $X_{82}$ はF又はL; $X_{83}$ はG, K, Q, 又はY; $X_{84}$ はA, G, S, 又はV; $X_{85}$ はA, I, 又はL; $X_{86}$ はP; $X_{87}$ はA, R, 又はV; $X_{88}$ はR又はW; 及び $X_{89}$ はA, F, L , 又はRである。)
	Subgenus 7.6: $X_{82} X_{83} X_{84} X_{85} X_{86} X_{87} X_{88} X_{89}$ (配列番号400) , (式中、 $X_{82}$ はL; $X_{83}$ はK又はY; $X_{84}$ はA又はS; $X_{85}$ はA, I, 又はL; $X_{86}$ はP; $X_{87}$ はA, R, 又はV; $X_{88}$ は W; 及び $X_{89}$ はA又はFである。)
	Subgenus 7.7: $X_{82} X_{83} X_{84} X_{85} X_{86} X_{87} X_{88} X_{89}$ (配列番号401) , (式中、 $X_{82}$ はL; $X_{83}$ はK又はY; $X_{84}$ はA; $X_{85}$ はA又は I; $X_{86}$ はP; $X_{87}$ はR又はV; $X_{88}$ はW; 及び $X_{89}$ はA又はF である。)

【0037】

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

10

20

30

40

【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、 $X_{92}$ 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。) 10	Subgenus 8.1: $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98}$ (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。) 20
	Subgenus 8.2: $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98}$ (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。) 30
	Subgenus 8.3: $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98}$ (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。) 40
	Subgenus 8.4: $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98}$ (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, 又はM; $X_{97}$ はL, S, 又はV; 及び $X_{98}$ はF, L, 又はTである。) 50
	Subgenus 8.5: $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98}$ (配列番号415), (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; 及び $X_{98}$ はLである。) 60
	Subgenus 8.6: $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98}$ (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; $X_{95}$ はG; $X_{96}$ はI, L, 又はM; $X_{97}$ はL又はV; 及び $X_{98}$ はLである。) 70
	Subgenus 8.7: $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98}$ (配列番号417), (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; 及び $X_{98}$ はA, G, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, 又はYである。) 80
	Subgenus 8.8: $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98}$ (配列番号418), (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; 及び $X_{98}$ はA, L, 又はQである。) 90
	Subgenus 8.9: $X_{92} X_{93} X_{94} X_{95} X_{96} X_{97} X_{98}$ (配列番号419), (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 又はL; $X_{97}$ はV; 及び $X_{98}$ はLである。) 100

【0038】

表 8 H - 2 . M M P 1 4 切断可能拡張コアー 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。) 
	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。) 
	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, 又はT; 及び $X_{99}$ はA, R, 又 はTである。) 
	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。) 

10

20

30

【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, 又はQ ; 及び $X_{99}$ はL, T, V, 又は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 又はL ; $X_{97}$ はV ; $X_{98}$ はL ; 及び $X_{99}$ はL 又はVである。)

10

20

【 0 0 4 0 】

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 13】

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。)	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。)
	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。)
	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。)
	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; $X_{104}$ はA又はH; $X_{105}$ はA又はD; $X_{106}$ はG; $X_{107}$ はL又はV; $X_{108}$ はR; 及び $X_{109}$ はA, S, 又はVである。)
	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, 又はT; $X_{106}$ はA, G, R, 又はT; $X_{107}$ はC, L, M, S, V, 又はW; $X_{108}$ はA, E, F, G, L, R, S, 又はW; 及び $X_{109}$ はA, G, L, P, R, S, 又はVである。)
	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, 又はS; $X_{103}$ はE, L, R, 又はV; $X_{104}$ はH; $X_{105}$ はD, M, R, 又はT; $X_{106}$ はA又はG; $X_{107}$ はL, M, S, 又はV; $X_{108}$ はE, R, 又はS; 及び $X_{109}$ はA, P, S, 又はVである。)
	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、 $X_{102}$ はI又はR; $X_{103}$ はE, R, 又はV; $X_{104}$ はH; $X_{105}$ はD, M, R, 又はT; $X_{106}$ はA又はG; $X_{107}$ はL又はV; $X_{108}$ はR又はS; 及び $X_{109}$ はA, P, S, 又はVである。)
	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、 $X_{102}$ はI又はR; $X_{103}$ はR; $X_{104}$ はH; $X_{105}$ はD; $X_{106}$ はA又はG; $X_{107}$ はL又はV; $X_{108}$ はR又はS; 及び $X_{109}$ はA又はSである。)

【0041】

表8 J. MMP 14 切断可能コアーCMコンセンサス配列10

【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; $X_{114}$ はA, H, K, L, N, S, 又はT; $X_{115}$ はG, H, I, L, S, 又はV; $X_{116}$ はI, L, 又はV; $X_{117}$ はA, F, G, K, R, S, 又はW; $X_{118}$ はD, H, L, M, N, Q, R, 又はV; 及び $X_{119}$ はA, I, L, 又はVである。)
	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、 $X_{112}$ はA, I, T, 又はV; $X_{113}$ はA, L, M, Q, R, V, 又はY; $X_{114}$ はA, N, S, 又はT; $X_{115}$ はG, L, S, 又はV; $X_{116}$ はL又はV; $X_{117}$ はA, F, G, K, 又はS; $X_{118}$ はM, N, Q, R, 又はV; 及び $X_{119}$ はI, L, 又は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、 $X_{112}$ はA, I, T, 又はV; $X_{113}$ はM, Q, 又はY; $X_{114}$ はA, N, 又はS; $X_{115}$ はG, L, S, 又はV; $X_{116}$ はL又はV; $X_{117}$ はA, F, G, 又はS; $X_{118}$ はM, N, Q, 又はR; 及び $X_{119}$ はI, L, 又はVである。)
	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、 $X_{112}$ はA, I, 又はV; $X_{113}$ はY; $X_{114}$ はN又はS; $X_{115}$ はG, L, 又はV; $X_{116}$ はL; $X_{117}$ はA, G, 又はS; $X_{118}$ はM, Q, 又はR; 及び $X_{119}$ はL又は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、 $X_{112}$ はA, I, 又はV; $X_{113}$ はY; $X_{114}$ はN又はS; $X_{115}$ はG, L, 又はV; $X_{116}$ はL; $X_{117}$ はG又はS; $X_{118}$ はM又はR; 及び $X_{119}$ はL又はVである。)
	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、 $X_{112}$ はA, I, 又はV; $X_{113}$ はY; $X_{114}$ はN又はS; $X_{115}$ はG, L, 又はV; $X_{116}$ はL; $X_{117}$ はS; $X_{118}$ はM又はR; 及び $X_{119}$ はL又はVである。)

10

20

30

【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, 又はT; $X_{115}$ はH, I, L, 又はV; $X_{116}$ はL; $X_{117}$ はA, G, K, 又はS; $X_{118}$ はL, M, Q, R, 又はV; 及び $X_{119}$ はA, L, 又は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又はI; $X_{113}$ はA, L, 又はQ; $X_{114}$ はN, S, 又はT; $X_{115}$ はL又はV; $X_{116}$ はL; $X_{117}$ はA, G, K, 又はS; $X_{118}$ はM, R, 又はV; 及び $X_{119}$ はL又は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又はI; $X_{113}$ はA, L, 又はQ; $X_{114}$ はN又はS; $X_{115}$ はL又はV; $X_{116}$ はL; $X_{117}$ はA又はS; $X_{118}$ はM又はR; 及び $X_{119}$ はL又は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、 $X_{112}$ はI; $X_{113}$ はA, L, 又はQ; $X_{114}$ はN; $X_{115}$ はL又はV; $X_{116}$ はL; $X_{117}$ はA又はS; $X_{118}$ はM又はR; 及び $X_{119}$ はL又は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、 $X_{112}$ はI; $X_{113}$ はA, L, 又はQ; $X_{114}$ はN; $X_{115}$ はL又はV; $X_{116}$ はL; $X_{117}$ はS; $X_{118}$ はM; 及び $X_{119}$ はL又はVである。)

【0043】

表8 K.M.M.P.1.4 切断可能コアーCMコンセンサス配列 1 1

10

20

30

40

【表 16】

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.MMP14 切断可能コアーCMコンセンサス配列12

【表 17】

コアCMコンセンサス12	コアCMコンセンサス12 (subgenus)
$X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (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: $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (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: $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (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: $X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9$ (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。) 20

10

20

【 0 0 4 5 】

【表 18】

コアCMコンセンサス12	コアCMコンセンサス12 (subgenus)
<p><math>X_6</math>はI, L, M, Q, T, V, W, 又はY;  <math>X_7</math>はA, D, G, H, K, L, N, P, Q, R, S, T, 又はV;  <math>X_8</math>はA, D, E, F, G, I, K, L, M, P, Q, R, S, V, W, 又はY;  及び  <math>X_9</math>はA, F, G, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V又はYである。)</p>	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, 又はS; $X_6$ はL; $X_7$ はA, G, R, 又はS; $X_8$ はF, I, M, 又はP; 及び $X_9$ はP又は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。)

【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。)
	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。)
	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 $A, L$ , 又はS; $X_{15}$ はP; $X_{16}$ はL又はV; $X_{17}$ はH, L, 又はQ; $X_{18}$ はG又はS; 及び $X_{19}$ はG, R, 又はSである。 )
	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又はV; $X_{13}$ はA又はL; $X_{14}$ はL又は $S$ ; $X_{15}$ はP; $X_{16}$ はL又はV; $X_{17}$ はH又はL; $X_{18}$ はG又は $S$ ; 及び $X_{19}$ はR又はSである。)
	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、 $X_{12}$ はL又はV; $X_{13}$ はA又はL; $X_{14}$ はL又は $S$ ; $X_{15}$ はP; $X_{16}$ はL; $X_{17}$ はH又はL; $X_{18}$ はG; 及び $X_{19}$ はSである。)
	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、 $X_{12}$ はF, I, L, M, S, T, 又はV; $X_{13}$ はA, E, G, H, L, M, S, V, W, 又はY; $X_{14}$ はA, $D, E, G, K, L, M, N, Q, R, S, T$ , 又はV; $X_{15}$ はE, G, N, P, S, T, 又はV; $X_{16}$ はA, F, G, $L, N, P, Q, R, S, V$ , 又はY; $X_{17}$ はA, E, H, $P, Q$ , 又はR; $X_{18}$ はD, E, G, N, R, S, 又はT; 及び $X_{19}$ はA, D, G, Q, S, T, 又はVである。)
	Subgenus13.: $X_{12} X_{13} X_{14} X_{15} X_{16} X_{17} X_{18} X_{19}$ (配列番号481) ), (式中、 $X_{12}$ はL, M, 又はV; $X_{13}$ はA又はL; $X_{14}$ はA, $L, Q$ , 又はS; $X_{15}$ はG, P, 又はT; $X_{16}$ はA, S, 又 はY; $X_{17}$ はH又はP; $X_{18}$ はD又はG; 及び $X_{19}$ はA, G又 はSである。)
	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、 $X_{12}$ はL又はM; $X_{13}$ はA又はL; $X_{14}$ はL; $X_{15}$ はG又はP; $X_{16}$ はA又はS; $X_{17}$ はH; $X_{18}$ はG; 及び $X_{19}$ はA又はGである。)

【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

10

20

30

40

50

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。

10

**【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。

20

**【0049】**

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）を含むコア-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WDHPISLL（配列番号328）を含むコア-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WATPRPMR（配列番号22）を含むコア-CMコンセンサス2配列を含む。

30

**【0051】**

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列LTFPTYIF（配列番号336）を含むコア-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MTFPTYIF（配列番号337）を含むコア-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LTFPTYWF（配列番号338）を含むコア-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MTFPTYWF（配列番号339）を含むコア-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STFPFGMF（配列番号17）を含むコア-CMコンセンサス3配列を含む。

40

**【0052】**

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列DWLYWMGI（配列番号348）を含むコア-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DWLYWPGI（配列番号19）を含むコア-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DWLYWMSI（配列番号349）を含むコア-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DWLYWPSI（配列番号350）を含むコア-CMコンセンサ

50

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 3 5 1) を含むコアー CM コンセンサス 4 配列を含む。

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列ISSGLLS（配列番号14）を含むコア-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SVSGLLSH（配列番号364）を含むコア-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SVSGLLS（配列番号365）を含むコア-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SVSGLRSH（配列番号366）を含むコア-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SVSGLRSS（配列番号367）を含むコア-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TSLGLRSP（配列番号368）を含むコア-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TSSGLRSP（配列番号369）を含むコア-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TVSGLRSP（配列番号370）を含むコア-CMコンセンサス5配列を含む。

【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列AFQALRM（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AHQALRM（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ANQALRM（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ANQALRMA（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LLEALRAL（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LLNALRAL（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LLQALRAL（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LLSALRAL（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LLES LRAL（配列番号387）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LLNS LRAL（配列番号388）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LLQS LRAL（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LLSS LRAL（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QFQALRM（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QHQALRM（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QNQALRM（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QNQALRMA（配列番号15）を含むコアーCMコンセンサス6配列を含む。

【 0 0 5 5 】

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LKAAPVWA（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LKAAPRWF（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LKAAPVWF（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LYAAPRWA

(配列番号 406) 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LYAAPVWA (配列番号 407) 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LYAAPRWF (配列番号 408) 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LYAAPVWF (配列番号 409) を含むコアーCMコンセンサス7配列を含む。

【0056】

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) を含むコアーCM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、CMは、アミノ酸配列LPAGLLL (配列番号 402) を含むコアーCM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、CMは、アミノ酸配列LPAGLLLR (配列番号 420) を含むコアーCM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、CMは、アミノ酸配列LPAHLVLL (配列番号 421) を含むコアーCM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、CMは、アミノ酸配列LPSHLVLL (配列番号 422) を含むコアーCM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、CMは、アミノ酸配列LPAHLVLV (配列番号 423) を含むコアーCM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、CMは、アミノ酸配列LPSHLVLV (配列番号 424) を含むコアーCMコンセンサス8配列を含む。

【0057】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列RMHLRSLG (配列番号 29) を含むコアーCM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、CMは、アミノ酸配列RRHDGLRA (配列番号 434) を含むコアーCM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、CMは、アミノ酸配列RRHDGLRS (配列番号 435) を含むコアーCMコンセンサス9配列を含む。

【0058】

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) を含むコアーCMコンセンサス10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IANLLSMV (配列番号 450) を含むコアーCMコンセンサス10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ILNLLSMV (配列番号 451) を含むコアーCMコンセンサス10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IQNL LGMV (配列番号 452) を含むコアーCMコンセンサス10配列を含む。

【0059】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列PAGLWLD P (配列番号 33) を含むコアーCMコンセンサス11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PASLWYTQ (配列番号 457) を含むコアーCMコンセンサス11配列を含む。

【0060】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列ALGLRLP (配列番号 470) を含むコアーCMコンセンサス12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ALGLSLP (配列番号 471) を含むコアーCMコンセンサス12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ASGLRFP (配列番号 472) を含むコアーCMコンセンサス12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AVGLLAPP (配列番号 31) を含むコアーCMコンセンサス12配列を含む。

【0061】

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) を含むコアーCMコンセンサス13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LLAPSHRA (配列番号 32) を含むコアーCMコンセンサス13配列を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 2 】

いくつかの実施形態によれば、CMは、アミノ酸配列LLLPAHGG（配列番号474）を含むコア-CMコンセンサス13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LLLPLLG S（配列番号483）を含むコア-CMコンセンサス13配列を含む。

## 【 0 0 6 3 】

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。

## 【 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	システインプロテイナーゼ、 例えば クルジパイン レグマイン 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、 FXIIa) エラスターゼ 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ゼ  ラクトフェリン マラプシン (Marapsin) NS3/4A PACE4
スパラギン酸プロテアーゼ、 例えば BACE レニン	メタロプロテイナーゼ、 例えば メプリン ネプリライシン PSMA BMP-1	プラスミン PSA tPA トロンビン トリプターゼ uPA
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	MMPs、例えば MMP1 MMP2 MMP3  MMP7 MMP8 MMP9 MMP10 MMP11 MMP12 MMP13 MMP14  MMP15 MMP16 MMP17 MMP19 MMP20 MMP23 MMP24 MMP26 MMP27	II型トランスメンブラン セリンプロテアーゼ (TTSPs)、 例えば DESC1 DPP-4 FAP ヘプシン マトリプターゼ-2 MT-SP1/マトリプターゼ TMPRSS2 TMPRSS3 TMPRSS4
カスパーゼ、例えば カスパーゼ 1 カスパーゼ 2 カスパーゼ 3 カスパーゼ 4 カスパーゼ 5  カスパーゼ 6 カスパーゼ 7 カスパーゼ 8 カスパーゼ 9 カスパーゼ 10 カスパーゼ 14		
システイン カテプシン、 例えば カテプシン B カテプシン C カテプシン K カテプシン L カテプシン S カテプシン V/L2 カテプシン X/Z/P		

【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

10

20

30

40

50

- 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、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 ( M M P ) 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 ( M M P )、好中球エステラーゼ、u型プラスミノゲン活性化因子 ( u P A、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、M T - S P 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、A D A M 1 7、B M P - 1、H t r A 1及びT M P R S S、例えばT M P R S S 3又はT M P R S S 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、u P A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、A D A M 1 7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、B M P - 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、H t r A 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、T M P R S S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、T M P R S S 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、T M P R S S 4のための基質である。

30

40

#### 【 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断され、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 (

50

配列番号 51); PLGL (配列番号 52); GPRSFGL (配列番号 315) 及び/又は GPRSFGL (配列番号 316)を含む。

# 【0070】

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 TARGPSFK (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 GGWHTGRN (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 RGP AFNPM (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 RGP ATPIM (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 RGPA (配列番号 45)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列 GGQPSGMWGW (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 VHMP LGFLGP (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 LAPLG LQRR (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 SGGPLGV R (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 GPRSFGL (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 GPRSFGL (配列番号 316)を含む。

# 【0071】

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。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のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM1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。

# 【0072】

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 ISSGL LSS (配列番号 14); QNQALRMA (配列番号 15); AQNL LGMV (配列番号 16); STFPFGMF (配列番号 17); PVGYTSSL (配列番号 18); DWLYWPGI (配列番号 19); MIAPVA



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)を含む。

#### 【0073】

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切断剤及び第2切断剤は、標的組織に共同在される。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。

#### 【0074】

いくつかの実施形態によれば、AB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AB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AB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AB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、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。

#### 【0075】

いくつかの実施形態によれば、剤は抗炎症剤である。

#### 【0076】

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。

#### 【0077】

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 - 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

10

20

30

40

50

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。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Alex 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、ピオチン、アビジン、ストレプトアビジン又は 1 又は 2 以上のハプテンを含む。

#### 【 0 0 7 8 】

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

#### 【 0 0 7 9 】

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 - 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、抗体及び / 又は接合された抗体は、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。

20

#### 【 0 0 8 0 】

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変形は、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変形は、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 - 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。

30

#### 【 0 0 8 1 】

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

#### 【 0 0 8 2 】

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：M M - C M - A B 及び A B - C M - M M。

【 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、M M と C M 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、C M と A B 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 ( 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：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。

【 0 0 8 7 】

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。

【 0 0 8 8 】

20

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。

【 0 0 8 9 】

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 )<sub>n</sub>、( G G S )<sub>n</sub>、( G S G G S )<sub>n</sub> ( 配列番号 1 ) 及び ( G G G S )<sub>n</sub> ( 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、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。

30

【 0 0 9 1 】

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 1 0 )、G S S G G S G G S G G S ( 配列番号 1 1 )、G S S G G S G G S G G S G G S ( 配列番号 1 5 5 )、G S S G G S G G S G ( 配列番号 1 5 6 )、又は G S S G G S G G S G S ( 配列番号 1 5 7 ) を含む。

【 0 0 9 2 】

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 1 5 8 )、G S S G T ( 配列番号 1 2 ) 又は G S S G ( 配列番号 1 3 ) を含む。

【 0 0 9 3 】

40

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 1 0 0 n M 又はそれ以下の平衡解離定数を有する。

【 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、F a b フラグメント、F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメント、s c F v、s c A b、d A b、単ドメイン H 鎖抗体、及び単ドメイン 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

## 【 0 0 9 5 】

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のカップリングが、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。

10

## 【 0 0 9 6 】

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VH CDR 1 配列、VH CDR 2 配列及びVH CDR 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 (AB 1) を少なくとも含み、ここで前記VH CDR 1 配列、VH CDR 2 配列及びVH CDR 3 配列の少なくとも1つは、アミノ酸配列SYAMS (配列番号498) を少なくとも含むVH CDR 1 配列; アミノ酸配列SIDPEGRQTY YADSVK G (配列番号499) を少なくとも含むVH CDR 2 配列; アミノ酸配列DIGGRSAFDY (配列番号500) を含むVH CDR 3 配列; 及びそれらの組合せから選択される。

20

## 【 0 0 9 7 】

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VL CDR 1 配列、VL CDR 2 配列及びVL CDR 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 (AB 1) を少なくとも含み、ここで前記VL CDR 1 配列、VL CDR 2 配列及びVL CDR 3 配列の少なくとも1つは、アミノ酸配列RASQSIS SY (配列番号501) を少なくとも含むVH CDR 1 配列; アミノ酸配列AASSLQS (配列番号502) を少なくとも含むVH CDR 2 配列; アミノ酸配列QQTVVAPPL (配列番号503) を含むVL CDR 3 配列; 及びそれらの組合せから選択される。

30

## 【 0 0 9 8 】

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VH CDR 1 配列、VH CDR 2 配列及びVH CDR 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 (AB 1) を少なくとも含み、ここで前記VH CDR 1 配列、VH CDR 2 配列及びVH CDR 3 配列の少なくとも1つは、アミノ酸配列SYAMS (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VH CDR 1 配列; アミノ酸配列SIDPEGRQTY YADSVK 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VH CDR 2 配列; アミノ酸配列DIGGRSAFDY (配列番号500) に対して、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、9

40

50

6%、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。

【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RASQSISSY（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VH CDR1配列；アミノ酸配列AASSLQS（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VH CDR2配列；アミノ酸配列QQTVVAPPL（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VL CDR3配列；及びそれらの組合せから選択される。

【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SYAMS（配列番号498）を少なくとも含み；VH CDR2配列は、アミノ酸配列SIDPEGRQTYYSVKG（配列番号499）を少なくとも含み；VH CDR3配列は、アミノ酸配列DIGGRSAFDY（配列番号500）を含み；VL CDR1配列は、アミノ酸配列RASQSISSY（配列番号501）を少なくとも含み；VL CDR2配列は、アミノ酸配列AASSLQS（配列番号502）を少なくとも含み；そしてVL CDR3配列はアミノ酸配列QQTVVAPPL（配列番号503）を含む。

【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SYAMS（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み；VH CDR2配列は、アミノ酸配列SIDPEGRQTYYSVKG（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み；VH CDR3配列は、アミノ酸配列DIGGRSAFDY（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み；VL CDR1配列は、アミノ酸配列RASQSISSY（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み；VL CDR2配列は、アミノ酸配列AASSLQS（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 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(E G F R)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 N Y G V H (配列番号 504)を少なくとも含む V H C D R 1 配列；アミノ酸配列 V I W S G G N T D Y N T P F T S (配列番号 505)を少なくとも含む V H C D R 2 配列；アミノ酸配列 A L T Y Y D Y E F A Y (配列番号 506)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。

#### 【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、E G F R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 G T N I H (配列番号 507)を少なくとも含む V H C D R 1 配列；アミノ酸配列 K Y A S E S I S (配列番号 508)を少なくとも含む V H C D R 2 配列；アミノ酸配列 Q Q N N N W P T T (配列番号 509)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。

#### 【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、E G F R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 N Y G V H (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 V H C D R 1 配列；アミノ酸配列 V I W S G G N T D Y N T P F T S (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 V H C D R 2 配列；アミノ酸配列 A L T Y Y D Y E F A Y (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 V H C D R 3 配列；及びそれらの組合せから選択される。

#### 【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、E G F R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 G T N I H (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VIWSGGNTDYNTPTTS（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VIWSGGNTDYNTPTTS（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。

10

#### 【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（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。

20

30

40

#### 【0110】

いくつかの実施形態によれば、MM は、標的への A B の平衡解離定数よりも高い、A B 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 A B の平衡解離定数以下である、A b

50



への結合のための平衡解離定数を有する。

【0112】

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。

【0113】

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。

【0114】

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。

【0115】

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。

【0116】

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。

【0117】

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。

【0118】

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。

【0119】

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。

【0120】

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。

【0121】

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。

【0122】

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

10

20

30

40

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1000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同在化され、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。

【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。

【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。

【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。

【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

10

20

30

40

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。

#### 【0133】

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。

#### 【0134】

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。

#### 【0135】

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。

#### 【0136】

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 L S S (配列番号 159) を包含する。

#### 【0137】

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

10

20

30

40

50

)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MG 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SPLPLRV 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RMHLRLSG (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

#### 【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、但しそれら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、例えばカテプシン、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); GGWHTGRN (配列番号38); HTGRSGAL (配列番号39); PLTGRSGG (配列番号40); AARGPAIH (配列番号41); RGP AFNPM (配列番号42); SSRGPAYL (配列番号43); RGPATPIM (配列番号44); RGA (配列番号45); GGQPSGMWGW (配列番号46); FPRPLGITGL (配列番号47); VHMP L G F L G P (配列番号48); SPLTGRSG (配列番号49); SAGFSLPA (配列番号126); LAPLG L QRR (配列番号50); SGGPLGVR (配列番号51); PLGL (配列番号52); GPRSFGL (配列番号315) 及び/又は GPRSF G (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TARGPSFK (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GGWHTGRN (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RGP AFNPM (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RGPATPIM (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RGA (配列番号45)を含む。いくつかの実施形態によれば、CM2は、アミノ酸配列GGQPSGMWGW (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VHMP 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、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LAPLG L QRR (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GPRSFGL (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GPRSF G (配列番号316)を含む。

30

40

#### 【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のための基質である。いくつかの実施形態によれば、CM1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。

10

## 【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ISSGLSS（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）；MIAPVAYR（配列番号20）；RPSPMWAY（配列番号21）；WATPRPMR（配列番号22）；FRLLDWQW（配列番号23）；LKAAAPRWA（配列番号24）；GPSHLVLT（配列番号25）；LPGGLSPW（配列番号26）；MGLFSEAG（配列番号27）；SPLPLRVP（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。

20

## 【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、標的組織に共同在される。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。

30

## 【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鎖アミノ酸配列を含む。

40

## 【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

50

【 0 1 5 0 】

20

【 0 1 5 1 】

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 S G (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。

10

# 【 0 1 5 2 】

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 56, 57 又は 58 の H 鎖アミノ酸配列、及び配列番号 59 の L 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、活性化可能抗体は、配列番号 56, 57 又は 58 の H 鎖アミノ酸配列、及び配列番号 59 の L 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。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 )<sub>n</sub>、( G G S )<sub>n</sub>、( G S G G S )<sub>n</sub> (配列番号 1) 及び ( G G G S )<sub>n</sub> (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 S G G S G (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。

20

30

# 【 0 1 5 3 】

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 56 の H 鎖アミノ酸配列、及び配列番号 59 の L 鎖アミノ酸配列を含む A B ; 配列番号 160 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 - 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 56 の H 鎖アミノ酸配列、及び配列番号 59 の L 鎖アミノ酸配列を含む A B ; 配列番号 160 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

40

50



10

## 20

30

## 40

50

30

## 40

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 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。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】

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 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 - 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)<sub>n</sub>、(G G S)<sub>n</sub>、(G S G G S)<sub>n</sub> (配列番号 1) 及び (G G G S)<sub>n</sub> (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 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。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】

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、剤は微小管障害剤である。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

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 (MMA D) 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 DM 1 又は DM 4 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。

【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】

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)、シアン蛍光タンパク質 (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 Alex 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、ストレプトアビジン又は 1 又は 2 以上のハプテンを含む。

20

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、スパ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、スパーサーは、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、スパーサーは、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、スパーサーは、スパーサー - 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パーサーの例は、QGQSGQ (配列番号 53) である。いくつかの実施形態によれば、スパーサーは、アミノ酸配列 QGQSGQ (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】

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

50

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-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(プロ-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。

#### 【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(AB)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ABは、ABのその標的を結合する能力を低めるマスキング部分(MM)にカップリングされる。いくつかの実施形態によれば、活性化可能抗体はさらに、少なくとも1つのMMPのための基質である切断可能部分(CM)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、AB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、MM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、AB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

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。いくつかの実施形態によれば、前記化は、約4:1-1:1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 : 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 )、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 ) ( 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、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。

#### 【 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

( 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、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、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

40

#### 【 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 )<sub>2</sub> 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

50



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。いくつかの実施形態によれば、MM は、標的への A B の結合のための平衡解離定数よりも高い、A B 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 A B 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、A B 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性を有さない。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 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 - A B 又は A B - 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)<sub>n</sub>、(GGS)<sub>n</sub>、(GSGGS)<sub>n</sub> (配列番号 1) 及び (GGGS)<sub>n</sub> (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、GSGG (配列番号 3)、GSGGG (配列番号 4)、GSGSG (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。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も有用である。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、フラワ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

10

20

30

40

50

含む細胞を培養し、ここで ( i ) 抗体は切断可能部分 ( C H ) を含み、そして ( ii ) 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。

#### 【 0 1 8 1 】

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 ( M M ) 、切断可能部分 ( C M ) 、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 ( A B ) を含み、ここで ( i ) 前記 C M は M M P 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 ( i i ) C M は、未切断状態で、M M が標的への A B の特異的結合を妨害し、そして切断された状態で、M M が標的への A B 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。

#### 【 0 1 8 2 】

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。

#### 【 0 1 8 3 】

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。

#### 【 0 1 8 4 】

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。

#### 【 0 1 8 5 】

いくつかの実施形態によれば、対象は、哺乳類、例えばヒト、非ヒト霊長類、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。

#### 【 0 1 8 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、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

価するための血液、尿及び／又はス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／又はス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、例えばゲムシタピンである。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ン又はシスプラチンである。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、ペバシズマブ）、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

30

#### 【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。

40

#### 【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

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、その対応する末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 )、シアン蛍光タンパク質 ( 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

こ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Alex Fluor（登録商標）680 又はAlexa Fluor（登録商標）750を含む。こ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、ストレプトアビジン又は1又は2以上のハプテンを含む。

【0195】

こ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。こ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、例えば非ヒト霊長類、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】

こ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。こ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。こ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。こ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】

こ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、こ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、こ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、治療の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。

20

30

【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CISPRGCPDGPYVMY（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）ISSGLLS（配列番号14）を含む切断部分、及び抗-EGFR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-EGFR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CISPRGCPDGPYVMY（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）ISSGLLS（配列番号14）を含む切断部分、及び抗-EGFR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-EGFR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 2 A】図 2 A は、S M P 8 7 として本明細書において呼ばれる基質プールの 5 n M の M M P 9 による切断を示す一連のグラフである。

【図 2 B】図 2 B は、S M P 8 7 として本明細書において呼ばれる基質プールの 5 n M の M M P 9 による切断を示す一連のグラフである。

【図 3 A】図 3 A は、5 n M の M M P 9 による基質配列 V A G R S M R P ( 配列番号 4 8 4 ) の切断を示す一連のグラフである。

【図 3 B】図 3 B は、5 n M の M M P 9 による基質配列 V A G R S M R P ( 配列番号 4 8 4 ) 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 5 A】図 5 A は、6 0 n M の M M P 1 4 による基質プール S M P 3 9 の切断を示す一連のグラフである。

10

【図 5 B】図 5 B は、6 0 n M の M M P 1 4 による基質プール S M P 3 9 の切断を示す一連のグラフである。

【図 6 A】図 6 A は、3 0 n M の M M P 1 4 による基質配列 Q N Q A L R M A ( 配列番号 1 5 ) の切断を示す一連のグラフである。

【図 6 B】図 6 B は、3 0 n M の M M P 1 4 による基質配列 Q N Q A L R M A ( 配列番号 1 5 ) の切断を示す一連のグラフである。

【図 7 A】図 7 A 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 7 A は、「ディスプレイプラットフォーム C Y T X - D P - X X X X X X X X」又は「C Y T X - D P - X X X X X X X X」( 配列番号 5 1 2 ) 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 7 B】図 7 B 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 7 B は、「ディスプレイプラットフォーム S P - C Y T X - D P - X X X X X X X X」又は「S P - C Y T X - D P - X X X X X X X X」( 配列番号 5 1 3 ) 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 S P - C Y T X - D P - X X X X X X X X ( 配列番号 5 1 3 ) は、シグナルペプチドを有する C Y T X - D P - X X X X X X X X ( 配列番号 5 1 2 ) プラットフォームである。

【発明を実施するための形態】

30

【 0 2 0 0 】

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 ( M M P ) のための基質である切断可能部分 ( C M ) を含むアミノ酸配列を提供する。それらの C M 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。

【 0 2 0 1 】

本明細書に提供される実施例は、それらの C M 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 M M P 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 ) 1 5 0 m M の N a C l 、1 0 m M の C a C l <sub>2</sub>、及び 0 . 0 5 % ( w / v ) Brij - 3 5 により補充された、5 0 m M のトリス - H C l ( p H 7 . 4 ) において、3 7 °C で 1 時間、5 0 n M のヒト M M P 9 と共にインキュベートされる場合、少なくとも 2 0 % の切断率を示した C Y T X - D P ディスプレイプラットフォームで試験される M M P 9 - 選択された基質の百分率 ( 5 0 n M の M M P 9 による 2 0 % 以上の切断率 ) ；( b ) 1 0 m M の C a C l <sub>2</sub>、及び 0 . 5 m M の M g C l <sub>2</sub> により補充された、5 0 m M の H E P E S ( p H 6 . 8 ) において、3 7 °C で 1 時間、5 0 n M のヒト M M P 1 4 と共にインキュベートされる場合、少なくとも 2 0 % の切断率を示した C Y T X - D P ディスプレイプラットフォームで試験される M M P 1 4 - 選択された基質の百分率 ( 5 0 n M の M M P 1 4 による 2 0 % 以上の切断率 ) ；及び( c ) 1 0 0 m M の N a C l 、0 . 0 1 % の T w e e n 2 0、及び 1 m M の E D T A により補充された、5 0 m M のトリス - H C l ( p H 7 . 4 ) において、3 7 °C で 1 時間、5 0 0 p M のヒトプラスミンと共にインキュベートされる場合、2 0 % 以

40

50

下の切断率を示したC Y T X - D P ディスプレイプラットフォームで試験されるM M P 9 - 選択された又はM M P 1 4 - 選択された基質の百分率( 5 0 0 p M のプラスミンによる2 0 % 以下の切断率)。

【0202】

いくつかの実施形態によれば、C Y T X - D P プラットフォームで表示される場合、M M P 9 基質は、1 5 0 m M のN a C l、1 0 m M のC a C l<sub>2</sub>及び0 . 0 5 % ( w / v )

のBrij - 3 5 により補充された、5 0 m M のトリス - H C l ( p H 7 . 4 ) において3 7

で1 時間、5 0 n M のヒトM M P 9 と共にインキュベートされる場合、少なくとも2 0

% ノン切断率を示す。いくつかの実施形態によれば、C Y T X - D P プラットフォームで

表示される場合、M M P 9 基質は、1 0 0 m M のN a C l、0 . 0 1 % のT w e e n 2 0

、及び1 m M のE D T A により補充された、5 0 m M のトリス - H C l ( p H 7 . 4 ) に

おいて3 7 で1 時間、5 0 0 p M のヒトプラスミンと共にインキュベートされる場合、

2 0 % 以下の切断率を示す。いくつかの実施形態によれば、C Y T X - D P プラットフォ

ームで表示される場合、M M P 9 基質は、1 5 0 m M のN a C l、1 0 m M のC a C l<sub>2</sub>

及び0 . 0 5 % ( w / v ) のBrij - 3 5 により補充された、5 0 m M のトリス - H C l (

p H 7 . 4 ) において3 7 で1 時間、5 0 n M のヒトM M P 9 と共にインキュベートさ

れる場合、少なくとも2 0 % ノン切断率を示し、そして1 0 0 m M のN a C l、0 . 0 1

% のT w e e n 2 0、及び1 m M のE D T A により補充された、5 0 m M のトリス - H C

l ( p H 7 . 4 ) において3 7 で1 時間、5 0 0 p M のヒトプラスミンと共にインキュ

ベートされる場合、2 0 % 以下の切断率を示す。

【0203】

いくつかの実施形態によれば、M M P 1 4 基質は、1 0 m M のC a C l<sub>2</sub>及び0 . 5 m

M のM a C l<sub>2</sub>により補充された、5 0 m M のH E P E S ( p H 6 . 8 ) において、3 7

で1 時間、5 0 m n M のヒトM M P 1 4 と共にインキュベートされる場合、少なくとも

2 0 % の切断率を示す。いくつかの実施形態によれば、M M P 1 4 基質は、C Y T X - D

P 法プラットフォームで示される場合、1 0 0 m M のN a C l、0 . 0 1 % のT w e e n 2

0 及び1 m M のE D T A により補充された、5 0 m M のトリス - H C l ( p H 7 . 4 ) に

おいて、3 7 で1 時間、5 0 0 p M のヒトプラスミンと共にインキュベートされる場合、

2 0 % 以下の切断率を示す。

【0204】

いくつかの実施形態によれば、M M P 9 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、 $100 M^{-1} s^{-1}$ 以上である。いくつかの実施形態によれば、M M

P 9 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、 $1、000 M$

$^{-1} s^{-1}$ 以上である。いくつかの実施形態によれば、M M P 9 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、 $10、000 M^{-1} s^{-1}$ 以上である。

【0205】

いくつかの実施形態によれば、M M P 1 4 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、 $100 M^{-1} s^{-1}$ 以上である。いくつかの実施形態によれば、M

M P 1 4 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、 $1、00$

$0 M^{-1} s^{-1}$ 以上である。いくつかの実施形態によれば、M M P 1 4 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、 $10、000 M^{-1} s^{-1}$ 以上である。

【0206】

本開示はまた、1 又は2 以上のそれらのM M P - 切断可能基質を含む抗体も提供する。

例えば、それらのM M P - 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、

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MMP - 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。

【0207】

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(AB)を含む。AB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(例えば、成長因子)、可溶性酵素、構造タンパク質(例えば、コラーゲン、フィブロネクチン)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AB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

【0208】

非制限的な例として、AB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。

【0209】



【表 2 1】

表 1 : 典型的な標的

1-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LAG-3	STEAP1
$\alpha$ -4インテグリン	CD56	DLK1	ヒアルロニダーゼ	LIF-R	STEAP2
$\alpha$ -Vインテグリン	CD64	DLL4	ICOS	ルイス X	TAG-72
$\alpha 4 \beta 1$ インテグリン	CD70	DPP-4	IFN $\alpha$	LIGHT	TAPA1
$\alpha 4 \beta 7$ インテグリン	CD71	DSG1	IFN $\beta$	LRP4	TGF $\beta$
AGR2	CD74	EGFR	IFN $\gamma$	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 (Fc $\epsilon$ RI)	メソテリン	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 補体	CD125	ERBB3	IL2	好中球 エラスターゼ	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	TNF $\alpha$
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-12R $\beta$	ノッチ 1	TNFRS12A
CD2	CD166	FGFR1	IL13	ノッチ 2	TRAIL-R1
CD3	CD172A	FGFR2	IL13R	ノッチ 3	TRAIL-R2
CD6	CD248	FGFR3	IL15	ノッチ 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 (wsx1)	PDGF-BB	VCAM-1

【 0 2 1 0 】

【表 2 2】

CD25	コラーゲン	GITR	IL29	PDGFR $\alpha$	VEGF
CD27	Cripto	GLUT1	IL-31R	PDGFR $\beta$	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 ーセリン	VEGFR1
CD40	CXCL10	Gp130	IL6, IL6R	P1GF	VEGFR2
CD40L	CXCL13	GPIIB/IIIA	インスリン 受容体	PSCA	VEGFR3
CD41	CXCR1	GPINMB	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

【0 2 1 1】

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。

【0 2 1 2】

## 【表 2 3】

表 2 : A B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
Erbix (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 $\alpha$
Humira (登録商標) (アダリムマブ)	TNF $\alpha$
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) (オフアツムマブ)	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) (アパタセプト)	CTLA-4
(タネズマブ)	NGF
(バビツキシマブ)	ホスファチジルセリン
(ザルツムマブ)	EGFR
(マパツムマブ)	EGFR
(マツズマブ)	EGFR
(ニモツズマブ)	EGFR
ICR62	EGFR
mAb 528	EGFR
CH806	EGFR

## 【 0 2 1 3 】

【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 $\beta$
	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

## 【0 2 1 4】

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-6R)を結合し、そしてインターロイキン-6受容体(IL-6R)を結合する、「Av1」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。Av1 H鎖及びAv1 L鎖についてのアミノ酸配列が、それぞれ配列番号54及び配列番号55として下記に示されている。

## 【0 2 1 5】

Av1抗体H鎖アミノ酸配列：

## 【化1】

30

QVQLQESGPGLV RPSQTLSTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRGLEWIGYISYSGITTYN PSLKSRVTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCARSLARTTAMDYWGQGLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPPELLGGPSVFL F  
PPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRW SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA  
LPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号54)

## 【0 2 1 6】

Av1抗体L鎖アミノ酸配列：

## 【化2】

40

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSR FSGSGSGTDFTFTISSLPED  
IATYYCQQGNTLPYTFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDYSLSTLTLSK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号55)

## 【0 2 1 7】

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-6R)を結合し、そしてAv1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、A V 1 L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、A V 1 H鎖のN - 末端に、又はA V 1 H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 (E G F R) を結合し、そして「c 2 2 v 5」抗体として、本明細書において言及される抗体、「c 2 2 5 v 4」抗体として、本明細書において言及される抗体、及び「c 2 2 5 v 6」抗体として、本明細書に言及される抗体 (それぞれ、E G F R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。c 2 2 5 v 5抗体、c 2 2 5 v 4抗体及びc 2 2 5 v 6抗体は、「c 2 2 5 L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。c 2 2 5 v 5 H鎖、c 2 2 5 v 4抗体、c 2 2 5 v 6抗体、及びc 2 2 5 L鎖についてのアミノ酸配列が下記に示される。

#### 【0219】

c 2 2 5 v 5 抗体 H 鎖 アミノ酸配列 :

#### 【化3】

QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKLEWLGVWSGGNTDYNT PFTSRLSINKDNKSKQVFFKM  
NSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF  
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK  
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\* (配列番号56)

#### 【0220】

c 2 2 5 v 4 抗体 H 鎖 アミノ酸配列 :

#### 【化4】

QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKLEWLGVWSGGNTDYNT PFTSRLSINKDNKSKQVFFKM  
NSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL F  
PPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY  
SKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\* (配列番号57)

#### 【0221】

c 2 2 5 v 6 抗体 H 鎖 アミノ酸配列 :

#### 【化5】

QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKLEWLGVWSGGNTDYNT PFTSRLSINKDNKSKQVFFKM  
NSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL F  
PPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRW SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA  
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\* (配列番号58)

## 【 0 2 2 2 】

c 2 2 5 抗体 L 鎖 アミノ酸配列：

## 【 化 6 】

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPSR FSGSGSGTDFTLINSVESED  
IADYYCQQNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\* (配列番号 5 9)

## 【 0 2 2 3 】

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。

10

## 【 0 2 2 4 】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 4

## 【 化 7 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSWAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 6 0)

20

## 【 0 2 2 5 】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 4

## 【 化 8 】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 6 1)

## 【 0 2 2 6 】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 5

## 【 化 9 】

30

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 6 2)

## 【 0 2 2 7 】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 5

## 【 化 1 0 】

40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSPPYHGQFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 6 3)

## 【 0 2 2 8 】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 7

【化 1 1】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 6 4)

【0 2 2 9】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 7

【化 1 2】

10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGQGTLLTVSS (配列番号 6 5)

【0 2 3 0】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 8

【化 1 3】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSWAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 6 7)

20

【0 2 3 1】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 8

【化 1 4】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKHIGRTNPFDYWGQGTLLTVSS (配列番号 6 8)

30

【0 2 3 2】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 1 3

【化 1 5】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 6 9)

【0 2 3 3】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 1 3

【化 1 6】

40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGTLLTVSS (配列番号 7 0)

【0 2 3 4】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 1 6

【化 1 7】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 7 1)

【0 2 3 5】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 1 6

【化 1 8】

10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGTQYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSPPYGQFDYWGGTLVTVSS (配列番号 7 2)

【0 2 3 6】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 1 9

【化 1 9】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 7 3)

20

【0 2 3 7】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 1 9

【化 2 0】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGTQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM  
NSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGGTLVTVSS (配列番号 7 4)

【0 2 3 8】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 2 1

【化 2 1】

30

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 7 5)

【0 2 3 9】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 2 1

【化 2 2】

40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGTQYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGGTLVTVSS (配列番号 7 6)

【0 2 4 0】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 2 4



## 【化 2 3】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 7 7)

## 【 0 2 4 1】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 2 4

## 【化 2 4】

10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTLYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 7 8)

## 【 0 2 4 2】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 2 6

## 【化 2 5】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 7 9)

20

## 【 0 2 4 3】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 2 6

## 【化 2 6】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM  
NSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 8 0)

30

## 【 0 2 4 4】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 2 7

## 【化 2 7】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 8 1)

## 【 0 2 4 5】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 2 7

## 【化 2 8】

40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSPFYGQFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 8 2)

## 【 0 2 4 6】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 2 8

【化 2 9】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 8 3)

【0 2 4 7】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 2 8

【化 3 0】

10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGGTLVTVSS (配列番号 8 4)

【0 2 4 8】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 3 0

【化 3 1】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 8 5)

20

【0 2 4 9】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 3 0

【化 3 2】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTLA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYAKSAAAFDYWGQTLVTVSS (配列番号 8 6)

30

【0 2 5 0】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 3 1

【化 3 3】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSWAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 8 7)

【0 2 5 1】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 3 1

【化 3 4】

40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGGTLVTVSS (配列番号 8 8)

【0 2 5 2】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 3 2

【化 3 5】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 8 9)

【0 2 5 3】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 3 2

【化 3 6】

10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGWQTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 9 0)

【0 2 5 4】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 3 7

【化 3 7】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 9 1)

20

【0 2 5 5】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 3 7

【化 3 8】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSPPHNGQFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 9 2)

30

【0 2 5 6】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 3 9

【化 3 9】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 9 3)

【0 2 5 7】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 3 9

【化 4 0】

40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTEYADSKGRF ISRDN SKNTLYLQMN  
SLRAED A YYCAKSAAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 9 4)

【0 2 5 8】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 4 0

【化 4 1】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGGGTKVEIKR (配列番号 9 5)

【0 2 5 9】

H 鎖 アミノ配列 H c 4 0

【化 4 2】

10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 9 6)

【0 2 6 0】

可変 L 鎖 アミノ酸配列 L c 4 7

【化 4 3】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQSVVAPLTFGGGTKVEIKR (配列番号 9 7)

20

【0 2 6 1】

可変 H 鎖 アミノ酸配列 H c 4 7

【化 4 4】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTEYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 9 8)

30

【0 2 6 2】

可変 4 B 2 L 鎖

【化 4 5】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQTLDAPPQFGGTKVEIKR (配列番号 9 9)

【0 2 6 3】

可変 4 B 2 H 鎖

【化 4 6】

40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 1 0 0)

【0 2 6 4】

可変 4 D 1 1 L 鎖

【化 4 7】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQTWAPPLFGQGTKVEIKR (配列番号 1 O 1)

【0 2 6 5】

可変 4 D 1 1 H 鎖

【化 4 8】

10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGGTLVTVSS (配列番号 1 O 2)

【0 2 6 6】

可変 4 E 7 L 鎖

【化 4 9】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQLVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 1 O 3)

20

【0 2 6 7】

可変 4 E 7 H 鎖

【化 5 0】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTKYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQTLVTVSS (配列番号 1 O 4)

30

【0 2 6 8】

可変 4 E 1 1 L 鎖

【化 5 1】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQALDAPLMFGQGTKVEIKR (配列番号 1 O 5)

【0 2 6 9】

可変 4 E 1 1 H 鎖

【化 5 2】

40

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEPMGQLTEYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGGTLVTVSS (配列番号 1 O 6)

【0 2 7 0】

可変 6 B 7 L 鎖

【化 5 3】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQALVAPLTFGGGTKVEIKR (配列番号 107)

【0271】

可変 6 B 7 H 鎖

【化 5 4】

10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM  
NSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGLVTVSS (配列番号 108)

【0272】

可変 6 F 8 L 鎖

【化 5 5】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQALVAPLTFGGGTKVEIKR (配列番号 109)

20

【0273】

可変 6 F 8 H 鎖

【化 5 6】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGLVTVSS (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 5 7】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQTIVAPPLFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDYSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号 111)

40

【0276】

4D11 H 鎖配列:

【化 5 8】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA  
LTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL F  
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN  
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1 1 2)

【 0 2 7 7】

4 D 1 1 v 2 H 鎖配列 :

【化 5 9】

EVHLLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM  
NSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
SGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP  
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA  
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTV  
DKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1 1 3)

【 0 2 7 8】

4 D 1 1 v 2 L 鎖配列 :

【化 6 0】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPED  
FATYYCQQTIVAPPLFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDSSTYSSTLT LXK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号 1 1 4)

【 0 2 7 9】

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。

【 0 2 8 0】

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

10

20

30

40

50

(配列番号 181); CNHFTLTTCGCGISPRGCPG (配列番号 182); CHHFTLTTCGCGISPRGCPG (配列番号 183); YNPCATPMCCISPRGCPG (配列番号 184); CNHHYFYTCGCGISPRGCG (配列番号 185); CNHHYHYCYCGCGISPRGCG (配列番号 186); CNHVYFGTCGCGISPRGCG (配列番号 187); CHHVYWGHC GCGISPRGCG (配列番号 188); CPHFTTTSCGCGISPRGCG (配列番号 189); CNHFTLTTCGCGISPRGCG (配列番号 190); CHHFTLTTCGCGISPRGCG (配列番号 191); CPYYTLSYCGCGISPRGCG (配列番号 192); CPHVSFGSGCGISPRGCG (配列番号 193); ADHVFWSYGCISPRGCG (配列番号 194); YNPCATPMCCISPRGCG (配列番号 195); CHHVYWGHC GCGISPRGCG (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)CGCGISPRGCG (配列番号 197); CISPRGCGQP IPSVK (配列番号 198); CISPRGCTQPYHVS R (配列番号 199); 及び/又は CISPRGCGNAVSG LGS (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QGQSGQCNIWL VGGDCRGWQG (配列番号 496); QGQSGQGQGW CNIWINGGDCRGWNG (配列番号 201); PWC MQRQDFLRCPQP (配列番号 202); QLG L P A Y M C T F E C L R (配列番号 203); C N L W V S G G D C G G L Q G (配列番号 204); S C S L W T S G S C L P H S P (配列番号 205); Y C L Q L P H Y M 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); P W C M Q R Q D Y L R C P Q P (配列番号 208); C N L W I S G G D C R G L A G (配列番号 209); C N L W V S G G D C R G V Q G (配列番号 210); C N L W V S G G D C R G L R G (配列番号 211); C N L W I S G G D C R G L P G (配列番号 212); C N L W V S G G D C R D A P W (配列番号 213); C N L W V S G G D C R D L L G (配列番号 214); C N L W V S G G D C R G L Q G (配列番号 215); C N L W L H G G D C R G W Q G (配列番号 216); C N I W L V G G D C R G W Q G (配列番号 217); C T T W F C G G D C G V M R G (配列番号 218); C N I W G P S V D C G A L L G (配列番号 219); C N I W V N G G D C R S F E G (配列番号 220); Y C L N L P R Y M Q D M C W A (配列番号 221); Y C L A L P H Y M Q A D C A R (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); C Y L Y S C T D S A F W N N R (配列番号 224); C Y L Y S C N D V S Y W S N T (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); C Y L Y S C T D G S Y W N S T (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); G C N I W L N G G D C R G W V D P L Q G (配列番号 238); G C N I W L V G G D C R G W I G D T N G (配列番号 239); G C N I W L V G G D C R G W I E D S N G (配列番号 240); G C N I W A N G G D C R G W I D N I D G (配列番号 241); G C N I W L V G G D C R G W L G E A V G (配列番号 242); G C N I W L V G G D C R G W L E E A V G (配列番号 243); G G P A L C N I W L N G G D C R G W S G (配列番号 244); G A P V F C N I W L N G G D C R G W M G (配列番号 245); G Q Q W C N I W I N G G D C R G W N G (配列番号 246); G K S E F C N I W L N G G D C R G W I G (配列番号 247); G T P G G C N I W A N G G D C R G W E G (配列番号 24

10

20

30

40

50



8); GASQYCNLWINGGDCRGWRG (配列番号 249); GCNIWLVG  
 GDCRPWVEGG (配列番号 250); GCNIWAVGGDCRPFVDGG (配  
 列番号 251); GCNIWLNGGDCRAWVDTG (配列番号 252); GCNI  
 WIVGGDCRPFINDDG (配列番号 253); GCNIWLNGGDCRPVVF  
 GG (配列番号 254); GCNIWLSGGDCRMFMNEG (配列番号 255);  
 GCNIWVNGGDCRSFVYSG (配列番号 256); GCNIWLNGGDCR  
 GWEASG (配列番号 257); GCNIWAHGGDCRGFIEPG (配列番号 2  
 58); GCNIWLNGGDCRTFVASG (配列番号 259); GCNIWAHGG  
 DCRGFIEPG (配列番号 260); GFLENCNIWLNGGDCRTG (配  
 列番号 261); GIYENCNIWLNGGDCRMG (配列番号 262); 及び/又  
 はGIPDNCNIWINGGDCRYG (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(IL-6R)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QGQSG  
 QYGSCSWNYVHIFMDC (配列番号264); QGQSGQGDFDIPFP  
 AHWVPIT (配列番号265); QGQSGQMGVPAGCVWNYAHIFMDC  
 (配列番号266); YRSCNWNYSIFLDC (配列番号267); PGAFDI  
 PFP AHWVPNT (配列番号268); ESSCVWNYVHIYMDC (配列番号2  
 69); YPGCKWNYDRIFLDC (配列番号270); YRTCSWNYVGIF  
 LDC (配列番号271); YGSCSWNYVHIFMDC (配列番号161); YGS  
 CSWNYVHIFLDC (配列番号272); YGSCNWNYSVHIFLDC (配列  
 番号273); YTSCNWNYSVHIFMDC (配列番号274); YPGCKWNYD  
 RIFLDC (配列番号275); WRSCNWNYSVHIFLDC (配列番号276);  
 WSNCHWNYVHIFLDC (配列番号277); DRSCNWNYSVHIFLDC  
 (配列番号278); SGSCKWDYVHIFLDC (配列番号279); SRSCIW  
 NYAHIFLDC (配列番号280); SMSCYWQYERIFLDC (配列番号2  
 81); YRSCNWNYSVHIFLDC (配列番号282); SGSCKWDYVHIF  
 LDC (配列番号283); YKSCNWNYSVHIFLDC (配列番号284); YGS  
 CTWNYVHIFMEC (配列番号285); FSSCNWNYSVHIFLDC (配列  
 番号286); WRSCNWNYSVHIFLDC (配列番号287); YGSCQWNYV  
 HIFLDC (配列番号288); YRSCNWNYSVHIFLDC (配列番号289);  
 NMSCHWDYVHIFLDC (配列番号290); FGPCNWNYSVHIFLDC  
 (配列番号291); XXsCXWXYvhlfxdc (配列番号292); MGVPAG  
 CVWNYAHIFMDC (配列番号163); RDTGGQCRWDYVHIFMDC  
 (配列番号293); AGVPAGCTWNYVHIFMEC (配列番号294); VGV  
 PNGCVWNYAHIFMEC (配列番号295); DGGPAGCSWNYVHIFM  
 EC (配列番号296); AVGPAGCWWNYVHIFMEC (配列番号297); C  
 TWNYVHIFMDCGEGEGP (配列番号298); GGVPEGCTWNYAH  
 IFMEC (配列番号299); AEVPAGCWWNYVHIFMEC (配列番号300  
 ); AGVPAGCTWNYVHIFMEC (配列番号301); SGASGGCKWNY  
 VHIFMDC (配列番号302); TPGCRWNYVHIFMECEAL (配列番号3  
 03); VGVPNGCVWNYAHIFMEC (配列番号304); PGAFDIPFP  
 AHWVPNT (配列番号305); RGACDIPFP AHWVPNT (配列番号30  
 6); QGDFDIPFP AHWVPIT (配列番号162); XGafDIPFP AHW  
 vPnT (配列番号307); RGDGNDSDIPFP AHWVPRT (配列番号30  
 8); SGVGRDRDIPFP AHWVPRT (配列番号309); WAGGNDCDI  
 PFP AHWVPNT (配列番号310); WGDGMDVDIPFP AHWVPVT (配  
 列番号311); AGSGNDSDIPFP AHWVPRT (配列番号312); ESR  
 SGYADIPFP AHWVPRT (配列番号313); 及び/又は RECGRCGDI

20

30

40

50

【 0 2 8 3 】

【 0 2 8 4 】

30

【 0 2 8 5 】

40

【 0 2 8 6 】

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、インピボ又はインピ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。

10

#### 【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。

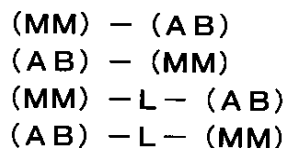
20

#### 【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、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、10-10,000,000、10-100,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、100-100,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000、000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000、10,000-100,000,000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、10-100,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1000-10,000、000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000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)の存在下でない場合、ABのその標的への特異的結合は、MM及び

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C M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C 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、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C M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C M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C M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、C M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C M及びA Bは、A Bが所定の標的のための結合部分を表し、そしてC Mが対象における治療部位又は診断部位で標的と共局在される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、C M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、A B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1A B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1A B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A Bのマスキング、又はA B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】

(MM) - (CM) - (AB)

(AB) - (CM) - (MM)

#### 【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

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

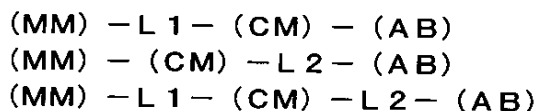
#### 【0309】

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、次のものを挙げることができるが、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  $0.001 - 1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  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  $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  の速度で少なくとも1つのMMPにより特異的に切断される。

40

#### 【0313】

酵素による特異的切断のためには、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は切断され得る。十分な酵素活性とは、CMと接触し、そして切断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断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の結合の障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）<sub>n</sub>、グリシン-セリンポリマー（例えば、（GS）<sub>n</sub>、（GSGGS）<sub>n</sub>（配列番号 1）及び（GGGS）<sub>n</sub>（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・プ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、但しそれら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トアビジン）により検出され得る 1 又は 2 以上のピオチニル部分、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、MMAD、MAAF、MAAE）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（MAAE）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、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、



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 DM 1 又は DM 4 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。

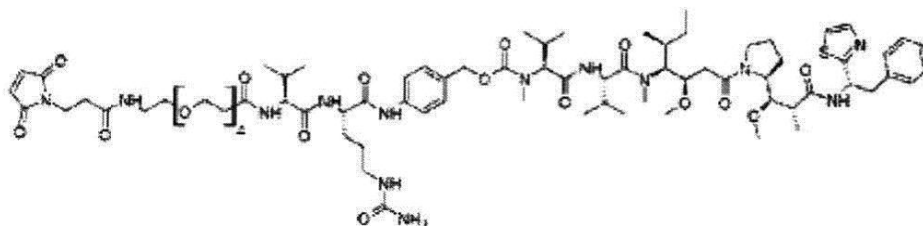
#### 【0320】

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、A B 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、A B 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、A B 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、A B 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、A B 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：

#### 【0321】

##### 【化64】

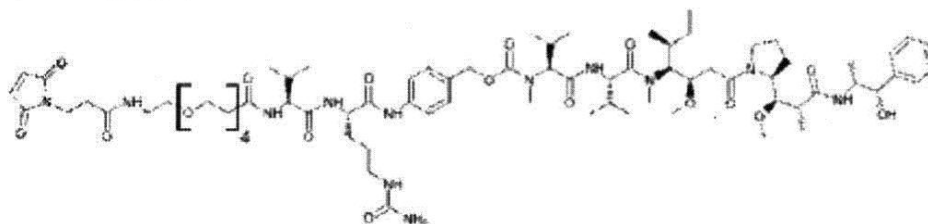
vc-MMAD :



#### 【0322】

##### 【化65】

vc-MMAE :



#### 【0323】

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 (緑膿菌からの)、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 (Phytolacca americana) タンパク質 (PAPI、PAPII 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 (*Saponaria 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、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{131}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、及び $^{186}\text{Re}$ 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、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビス - アジド化合物 (例えば、ビス(p - アジドベンゾイル) ヘキサンジアミン)、ビス - ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス - (p - ジアゾニウムベンゾイル) - エチレンジアミン)、ジイソシアネート (例えば、トルエン 2, 6 - ジイソシアネート)、及びビス - 活性フッ素化合物 (例えば、1, 5 - ジフルオロ - 2, 4 - ジニトロベンゼン) 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。 $^{14}\text{C}$  - 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)。

10

【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举するが、しかし決して網羅的な列举を意味するものではない。

20

【0326】

## 【表 2 5】

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)	スポンギスタチン 5	
デスメチルアウリスタチン E (DMAE)	スポンギスタチン 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	
デスメ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	
$\alpha$ -アマニチン	ZJ-101	
アントラサイクリン	OSW-1	
ドキシソルビシン	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 (Hemiasterlin)	
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	官能化ピロロベンゾジアゼピン	
プトテシン		
コンプレタスタチン	カリケアマイシン	
デプロモアプリーシアトキシン	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		

## 【 0 3 2 7 】

40

## 【表 2 6】

**抗ウイルス薬**

アシクロビル

ビラ A

シンメトレル

**抗真菌剤**

ナイスタチン

**追加の抗腫瘍薬**

アドリアマイシン

セルビジン (Cerubidine)

ブレオマイシン

アルケラン

ベルバン

オンコピン

フルオロウラシル

メトトレキサート

チオデパ

ビスアントレン

ノバントロン

チオグアニン

プロカルバジン

シタラビン

**抗菌薬**

アミノグリコシド

ストレプトマイシン

ネオマイシン

カナマイシン

アミカシン

ゲンタマイシン

トブラマイシン

S ストレプトマイシン B

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

**接合可能な検出試薬**

フルオレセイン及びその誘導体

フルオレセインイソチオシアネート (FITC)

**放射性医薬** $^{125}\text{I}$  $^{131}\text{I}$  $^{89}\text{Zr}$  $^{111}\text{In}$  $^{123}\text{I}$  $^{131}\text{I}$  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  $^{201}\text{Tl}$  $^{133}\text{Xe}$  $^{11}\text{C}$  $^{62}\text{Cu}$  $^{18}\text{F}$  $^{68}\text{Ga}$  $^{13}\text{N}$  $^{15}\text{O}$  $^{38}\text{K}$  $^{82}\text{Rb}$  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (テクネチウム)**重金属**

バリウム

金

白金

**抗-マイコプラズマ**

タイロシン

スペクチノマイシン

## 【0 3 2 8】

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）。

## 【0 3 2 9】

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、インターカレーション、配位結合及び錯

10

20

30

40

50

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、SMCC、スルホ-SMCC、SPDB又はスルホ-SPDBを包含するが、但しそれらだけに

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することができる基（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ステル、4-ニトロフェニルカルボン酸又は炭酸エステル、ペンクフルオロフェニルカルボン酸又は炭酸エステル、アシルイミダゾール、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。

【 0 3 3 9 】

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。

【 0 3 4 0 】

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、A 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。

【 0 3 4 1 】

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、補体カ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。

【 0 3 4 2 】

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。

【 0 3 4 3 】

10

20

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>プラスミン切断可能配列</u>		
プロウロキナーゼ	PRFKI IGG (配列番号 127)	
	PRFRI IGG (配列番号 128)	
TGF $\beta$	SSRHRRALD (配列番号 129)	
プラスミノゲン	RKSSIIIRMRDVVL (配列番号 130)	10
スタフィロキナーゼ	SSSFDKGKYYKGGDDA (配列番号 131)	
	SSSFDKGKYYKRGDDA (配列番号 132)	
<u>第Xa因子切断可能配列</u>		
	IEGR (配列番号 133)	
	IDGR (配列番号 134)	
	GGSIDGR (配列番号 135)	
<u>MMP 切断可能配列</u>		
ゼラチナーゼA	PLGLWA (配列番号 136)	
<u>コラゲナーゼ切断可能配列</u>		
ウシ皮膚コラーゲン( $\alpha 1(I)$ 鎖)	GPQGIAGQ (配列番号 137)	20
ウシ皮膚コラーゲン( $\alpha 2(I)$ 鎖)	GPQGILLGA (配列番号 138)	
ウシ軟骨コラーゲン( $\alpha 1(II)$ 鎖)	GIAGQ (配列番号 139)	
ヒト肝臓コラーゲン( $\alpha 1(III)$ 鎖)	GPLGIAGI (配列番号 140)	
ヒト $\alpha_2M$	GPEGLRVG (配列番号 141)	
ヒト PZP	YGAGLGVV (配列番号 142)	
	AGLGVVER (配列番号 143)	
	AGLGISST (配列番号 144)	
ラット $\alpha_1M$	EPQALAMS (配列番号 145)	
	QALAMSAI (配列番号 146)	
ラット $\alpha_2M$	AAYHLVSQ (配列番号 147)	30
	MDAFLESS (配列番号 148)	
ラット $\alpha_1I_3$ (2J)	ESLPVVAV (配列番号 149)	
ラット $\alpha_1I_3$ (27J)	SAPAVESE (配列番号 150)	
ヒト線維芽細胞コラゲナーゼ	DVAQFVLT (配列番号 151)	
(自己分解切断)	VAQFVLTE (配列番号 152)	
	AQFVLTEG (配列番号 153)	
	PVQPIGPQ (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。

40

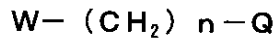
## 【0345】

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 6 6】



【0347】

ここで、Wは、 $-N-CH_2-$ 又は $-CH_2-$ 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にABのコアから離れて、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ビ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Val - Cit、Val - Ala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	高い安定性	11.2 Å	10
	スルフヒドリル			
SPDP	第一アミン	チオール化	6.8 Å	
	スルフヒドリル	切断可能な架橋		
LC-SPDP	第一アミン	拡張スペーサーアーム	15.6 Å	
	スルフヒドリル			
スルホ-LC-SPDP	第一アミン	エキステンダースペーサーアーム	15.6 Å	
	スルフヒドリル	水溶性		
SMCC	第一アミン	安定したマレイミド反応基	11.6 Å	
	スルフヒドリル	酵素 - 抗体接合		
		ハプテン - キャリアタンパク質接合		20
スルホ-SMCC	第一アミン	安定したマレイミド反応基	11.6 Å	
	スルフヒドリル	水溶性		
		酵素 - 抗体接合		
MBS	第一アミン	酵素 - 抗体接合	9.9 Å	
	スルフヒドリル	ハプテン - キャリアタンパク質接合		
スルホ-MBS	第一アミン	水溶性	9.9 Å	
	スルフヒドリル			
SIAB	第一アミン	酵素 - 抗体接合	10.6 Å	
	スルフヒドリル			
スルホ-SIAB	第一アミン	水溶性	10.6 Å	
	スルフヒドリル			
SMPB	第一アミン	拡張スペーサーアーム	14.5 Å	30
	スルフヒドリル	酵素 - 抗体接合		
スルホ-SMPB	第一アミン	拡張スペーサーアーム	14.5 Å	
	スルフヒドリル	水溶性		
EDE/スルホ-NHS	第一アミン	ハプテン - キャリア接合	0	
	カルボキシル基			
ABH	炭水化物	糖基と反応する	11.9 Å	
	非選択性			

## 【0358】

非切断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、直接的に又は非切断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。

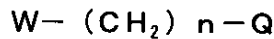
40

## 【0359】

それらの非切断リンカーは、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 6 7】



【0361】

ここで、Wは、 $-N-CH_2-$ 又は $-CH_2-$ 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。

【0363】

本明細書に開示される抗体はまた、免疫リボソームとして製剤化され得る。抗体を含むリボソームは、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ボソームが、米国特許第5,013,556号に開示されている。

【0364】

特に有用なリボソームは、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。リボソームは、所望する直径を有するリボ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)に記載されるリボ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、単数形の実体は、複数形も含み、そして複数形の実体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

10

20

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)<sub>2</sub>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。

【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25 kDa)及び1つの「H鎖」(約50 - 70 kDa)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変領域を定義する。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IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、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。

【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。

【0370】

用語「抗原 - 結合部位 (antigen-binding site)」又は「結合部分 (binding portion)」とは、抗原結合に関与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キ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て配置される。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。

【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

10

20

30

40

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  $1 \mu\text{M}$ である場合、例えば、いくつかの実施形態によれば、 $100 \text{ nM}$ 、及びいくつかの実施形態によれば、 $10 \text{ nM}$ 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、 $1 \mu\text{M}$ 、例えば、いくつかの実施形態によれば、 $100 \text{ nM}$ 、いくつかの実施形態によれば、 $10 \text{ nM}$ 、及びいくつかの実施形態によれば、 $100 \text{ pM}$  - 約  $1 \text{ pM}$ 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に連結されるか、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せず、(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、例えばカップ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。

【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。

【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。

【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、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニラデート、ホスホロ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

10

20

30

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, Sunderland7 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



）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。

#### 【 0 3 8 6 】

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、単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。

#### 【 0 3 8 7 】

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

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み込み、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トアビジン) 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み込みを意味する。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、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ )、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、 $\alpha$ -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。

【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。

【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。

【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

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

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のカップリングが、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。

#### 【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、多抗原標的化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。

#### 【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のカップリングは、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、

10

20

30

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単核細胞である。

#### 【 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。

10

#### 【 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。

20

30

#### 【 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 (NK) 細胞、骨髄単核細胞、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 NK 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 NK - 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

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、NKGD2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、腫瘍関連プロテアーゼにより活性化されると、任意の腫瘍抗原に应答する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。それらの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。

10

【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：BTLA、CTLA-4、LAG3、PD-1、TIGIT、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-標的化抗原に应答する自己反応性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。

20

30

【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（CD3、またCD3e及びCD3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-CD3scFv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CD3scFv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

40

50

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) を含み、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。

#### 【0406】

いくつかの実施形態によれば、T - 細胞系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) を含み、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) を含み、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。

#### 【0407】

いくつかの実施形態によれば、T - 細胞系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) を含み、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) を含み、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。

#### 【0408】

いくつかの実施形態によれば T - 細胞系合多重特異的活性化可能抗体は、O K T 3 由来の抗 - 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 - 由来の 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 s c F v又はOKT3 - 由来のs c F v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 s c F v又はOKT3 - 由来のs c F v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。

10

**【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 s c F v又はOKT3 - 由来の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OKT3 s c F v又はOKT3 - 由来の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OKT3 s c F v又はOKT3 - 由来のs c F v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 s c F v又はOKT3 - 由来のs c F v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。

20

30

**【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 s c F v又はOKT3 - 由来のs c F v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 s c F v又はOKT3 - 由来のs c F v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 s c F v又はOKT3 - 由来のs c F v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 s c F v又はOKT3 - 由来のs c F v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。

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、複数の異なった標的を結合する。いくつか

10

20

30

40

50

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)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>;(VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>;(MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH\*-L3-VL\*)<sub>2</sub>;(MM-L1

40

## 50

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、それら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、それら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】

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】

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 2 0 0 9 / 0 2 5 8 4 6 号、国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 1 1 7 3 号を参照のこと)。

#### 【0420】

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 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 5 1 0  
)

#### 【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 5 1 0 のアミノ酸配列に対して、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 S G S G G G S 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

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 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 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 s c F v 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、s c F v 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、s c F v 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。

【0430】

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。

【0431】

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(AB1)、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(AB2)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AB1がマスキング部分(MM1)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、MM1のカップリングが、AB1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、MM1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AB1の標的と共局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(CM1)配列を介してAB1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AB1の標的への結合を示す。

【0432】

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、MM1とCM1との間に連結ペプチドを含む。

【0433】

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、CM1とAB1との間に連結ペプチドを含む。

【0434】

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：MM1-LP1-CM1-LP2-AB1又はAB1-LP2-CM1-LP1-MM1。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。

【0435】

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)<sub>n</sub>、(GGS)<sub>n</sub>、(GSGGS)<sub>n</sub>(配列番号1)及び(GGGS)<sub>n</sub>(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(配列番号3)、GGS(配列番号4)、GSGSG(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。

【0436】

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(AB1)、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(AB2)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AB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')<sub>2</sub>フラグメント、scFv、scAb、dAb、単ドメインH鎖抗体、及び単ドメイン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AB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。

## 【0437】

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AB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100nM又はそれ以下の平衡解離定数を有する。

## 【0438】

いくつかの実施形態によれば、MM1は、AB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ABへの結合のための平衡解離定数を有する。

## 【0439】

いくつかの実施形態によれば、MM1は、AB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ABへの結合のための平衡解離定数を有する。

10

## 【0440】

いくつかの実施形態によれば、MM1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ABを阻止しないか、又はそれと競争しない。

## 【0441】

いくつかの実施形態によれば、MM1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。

20

## 【0442】

いくつかの実施形態によれば、MM1は、その対応するABの標的の配列とは異なるポリペプチド配列を有する。

## 【0443】

いくつかの実施形態によれば、MM1は、その対応するABの任意の天然結合パートナーに対して50%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、MM1は、その対応するABの任意の天然結合パートナーに対して25%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、MM1は、その対応するABの任意の天然結合パートナーに対して10%以下、同一であるポリペプチド配列を有する。

30

## 【0444】

いくつかの実施形態によれば、MM1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MM1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MM1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。

## 【0445】

いくつかの実施形態によれば、MM1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MM1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MM1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

## 【0446】

いくつかの実施形態によれば、MM1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MM1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MM1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。

## 【0447】

いくつかの実施形態によれば、MM1のカップリングは、その対応するAB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

30

【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】

40

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1000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ISSGLLS (配列番号14); QNQALRMA (配列番号15); AQNL LGMV (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); RPSPMWAY (配列番号21); WATPRPMR (配列番号22); FRLLDWQW (配列番号23); LKAAPRWA (配列番号24); GPSHLVLT (配列番号25); LPGGLSPW (配列番号26); MGLFSEAG (配列番号27); SPL

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 の標的と共局在し、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局在され、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。

【0473】

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

【0474】

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。

【0475】

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

【0476】

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。

【0477】

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

【0478】

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。

【0479】

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つの標的と共有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、レグマイン及びノ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

50

; 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 (配列番号51); 及び/又は P L G L (配列番号52)。

#### 【0480】

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CMは、少なくとも1つのMMP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CM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、uPA、レグマイン、マトリプターゼ、ADAM17、BMP-1、TMPRSS3、TMPRSS4、好中球エラスターゼ、MMP-7、MMP-9、MMP-12、MMP-13及びMMP-14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CMは、uPA（ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子）、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、uPA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、マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）を包含する。

#### 【0481】

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CM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CM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、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、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CM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少なくとも2種のプロテアーゼのための基質である。

#### 【0482】

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1CM（CM1）及び第2CM（CM2）を少なくとも含む。いくつかの実施形態によれば、CM1及びCM2は、MMをAB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、CM1は、MM1をAB1に連結する切断可能リンカーの一部であり、そしてCM2は、MM2をAB2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CM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CM及び2つ以上のMMを含む。いくつかの実施形態によれば、CM1及びCM2は、それぞれ、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、第1CM及び第2CM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1CM及び第2CMの少なくとも1つは、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1CMは、標的組織において、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第1切断剤により切断され、そして第2CMは、標的

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。

10

**【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部を含む鎖アミノ酸配列を含む。

**【0484】**

20

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。

30

**【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；そ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

40

50

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。

【 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。

【 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して使用される場合、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 5 0 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、交換可能的使用され、そしてポリペプチドがより長いもの、例えば 5 0 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、交換可能的使用される。

【 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、 5 0 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： 1 5 個までの長さのアミノ酸、 2 0 個までの長さのアミノ酸、 2 5 個までの長さのアミノ酸、 3 0 個までの長さのアミノ酸、 3 5 個までの長さのアミノ酸、 4 0 個までの長さのアミノ酸、 4 5 個までの長さのアミノ酸、 5 0 個ま

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(NB)；切断可能リンカー(CL)；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(AB)を含み、ここで(i)NBは、ABに対して特異的に結合しないポリペプチドであり；(ii)CLは、酵素のための基質(S)を含むポリペプチドであり；(iii)CLは、切断されていない状態で、NBがその標的へのABの結合を妨害し、そして切断された状態で、NBがABのその標的への結合を妨害しないよう位置決定され；(iv)NBは、酵素によるCL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：NB - CL - AB又はAB - CL - NB。

#### 【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(NB)；切断可能リンカー(CL)；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(AB)を含み、ここで(i)NBは、ABに対して特異的に結合しないポリペプチドであり；(ii)CLは、酵素のための基質(S)を含むポリペプチドであり；(iii)CLは、切断されていない状態で、NBがその標的へのABの結合を妨害し、そして切断された状態で、NBがAB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NBが、切断されたABのその標的を結合する能力に比べて、AB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)NBは、酵素によるCLの切断を阻害しない。AB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。

30

#### 【0492】

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(NB)のための結合パートナー(BP)；切断可能リンカー(CL)；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(AB1)を含み、ここでBPは、NBに暴露される場合、そのNBに結合するポリペプチドであり；NBは、ABに対して特異的に結合しないポリペプチドであり；CLは、酵素のための基質(S)を含むポリペプチドであり；CLは、NBの存在下で、切断されていない状態で、NBがその標的へのAB1の結合を妨害し、そして切断された状態で、NBがAB1のそ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NB及びBPは、酵素によるCL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BPは、任意には、NBに結合される。1つの実施形態によれば、NBは、インビボで、活性化可能抗体のBPによりリクルートされる。

40

#### 【0493】

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、NBも含み、ここでNBは、BP、CL及びAB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、免疫グロブリンド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、免疫グロブリンド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、プロテア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、その標的と共局在され、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「:

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 a bフラグメント、F ( a b )<sub>2</sub>フラグメント、s c F v、s c a b、d A b、単一のドメインH鎖抗体、及び単一のドメイン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、微小管障害剤である。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、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、スパーサーも含む。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、スパ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、スパーサーは、活性化可能抗体のMMに直接、結合される。

#### 【0502】

30

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、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

40

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、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。

【 0 5 0 3 】

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。

【 0 5 0 4 】

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、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、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1,000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000又は100,000-10,000,000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、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、10-10,000,000、100-1,000、100-10,000、100-100,000、100-1,000,000、100-10,000,000、1,000-10,000、1,000-100,000、1,000-1,000,000、1,000-10,000,000、10,000-100,000、10,000-1,000,000、10,000-10,000,000

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、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

#### 【 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、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。

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、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 (MMA D) 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 DM 1 又は DM 4 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 A b 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 A B 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同在される切断剤により切断できる C L 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 A B を有する二重標的結合活性化可能抗体は、複数の C L を有するよう企画され得、ここで第 1 C L 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 2 C L 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 A B 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 ( N B ) ; ( ii ) 切断可能リンカー ( C L ) ; 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 ( A B ) を含み、ここで ( 1 ) N B は A B に対して特異的に結合せず ; ( 2 ) C L は、酵素のための基質 ( S ) を含むポリペプチドであり ; ( 3 ) C L は、切断されていない状態で、N B が A B の標的への結合を妨害し、そして切断された状態で、N B 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 ( 4 ) N B が酵素による C L 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 ( N B ) のための結合パートナー ( B P ) ; ( ii ) 切断可能リンカー ( C L ) ; 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 ( A B ) を含み、ここで ( 1 ) N B は A B に対して特異的に結合せず ; ( 2 ) C L は、酵素のための基質 ( S ) を含むポリペプチドであり ; ( 3 ) C L は、切断されていない状態で、及び N B の存在下で、N B が A B の標的への結合を妨害し、そして切断された状態で、N B が A B 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 ( 4 ) N B が酵素による C L 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 B P は、N B に結合される。

40

50

## 【 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み込まれる、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 (15th 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、標的は、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、標的は、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、標的発現及び／又は活性、例えば異常標的発現及び／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、対象における標的発現及び／又は活性、例えば異常標的発現及び／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.

【 0 5 1 7 】

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、治療される特定の徴候のために必要な複数の活性化化合物、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。

【 0 5 1 8 】

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。

【 0 5 1 9 】

インビボ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。

【 0 5 2 0 】

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 - グルタミン酸及びエチル - 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。

【 0 5 2 1 】

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)<sub>2</sub>)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。間接的標識化の例は、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トアビジ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

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ボ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)、ウエスタンブロット、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ボ技法は、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。

10

#### 【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。

20

#### 【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。

30

#### 【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。

40

#### 【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。

50

## 【 0 5 2 7 】

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。

## 【 0 5 2 8 】

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）を発現することのみならず、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。

## 【 0 5 2 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。

## 【 0 5 3 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。

#### 【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AB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。切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 - AB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、及び増幅試薬、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。

#### 【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ブターゼ（MT-SP1）に対して特異的であり、そしてマトリブ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。

30

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。

【0538】

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。

【0539】

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

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( 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、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 )、切断剤により切断される切断部分( 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、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；そして検出可能標識が、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し；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

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。

#### 【0542】

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。

#### 【0543】

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。

#### 【0544】

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

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。

#### 【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、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。

#### 【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、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 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、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、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。

#### 【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、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。

#### 【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、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 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 ( 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。

10

#### 【 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、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する。検出可能標識の低められたレベルは、例えば約 5 %、約 1 0 %、約 1 5 %、約 2 0 %、約 2 5 %、約 3 0 %、約 3 5 %、約 4 0 %、約 4 5 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、約 9 5 % 及び/又は 約 1 0 0 % の低減率である。

20

#### 【 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 )、シアン蛍光タンパク質 ( 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 Alex 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、ストレプトアビジン又は 1 又は 2 以上のハプテンを含む。

30

40

#### 【 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

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、例えば非ヒト霊長類、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。

【 0 5 5 2 】

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

【 0 5 5 3 】

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。

【 0 5 5 4 】

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

30

【 0 5 5 5 】

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。

40

【 0 5 5 6 】

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

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、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。

10

#### 【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。

20

30

#### 【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

40

50

らの方法及びキットのいくつかの実施形態によれば、L 1 及び L 2 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、(SGGS) 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、L 1 及び L 2 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、L 1 及び L 2 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同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。

**【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。

30

**【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。

#### 【0567】

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。

#### 【0568】

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。

#### 【0569】

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抗体の蓄積が、非疾患組織と比較して増強される。

#### 【0570】

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】

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AB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。切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-AB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。

#### 【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】

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、及び増幅試薬、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】

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。

10

20

30

40

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、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。

## 【 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。例えば、標的、及び試験される活性化可能抗体（例えば、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。

## 【 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（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。

## 【 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、コーティング、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

10

20

30

40

50

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、リンゲル液、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、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレング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、例えば塩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、プロピレングリコール及び液体ポリエチレング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クル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、そしてスウィッシュされ、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

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、プリモゲル又はコーンスターチ；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。

#### 【0586】

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、又はネブライザーからエアロゾル噴霧の形で送達される。

10

#### 【0587】

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。

#### 【0588】

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

#### 【0589】

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

#### 【0590】

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

#### 【0591】

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。

#### 【0592】

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】

#### 【0593】

実施例1．本開示の基質を含むクエンチされたプローブ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、M M P 切断可能配列を、評価されるM M P 切断可能配列を含むリンカー領域を介して、抗 - I L - 6 R 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関して試験した。

【 0 5 9 4 】

次のM M P - 切断可能抗体を、滑液と共にインキュベートした：

【 0 5 9 5 】

<sub>4792</sub> 1 0 4 1 <sub>9</sub> <sub>AV1</sub> アミノ酸

【 化 6 8 】

QQQSGQYGSCSWNYVHIFMDCGS SGGSGGSGGSGISSGLSSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSYLNWYQQ  
KPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS  
DEQLKSGTASWCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV  
TKSFNRGEC (配列番号 1 1 5)

10

【 0 5 9 6 】

<sub>4792</sub> <sup>10419</sup> A V 1 ヌクレオチド

【 化 6 9 】

Caaggccagtctggccagtatgggtcctgcagttggaactatgtacacatatcatggatt gcggctcgagcgggtggcagcg  
gtggctctggtggctcaggtattagtagtggtcttagcag tggcggttctgacatocagatgactcagtcctctagctccct  
gtccgcctctgtgggggac cgagtcaccatcacatgcagagccagccaggatatttctagttacctgaactggatcagc a  
gaagcccgaaaagcacctaagctgctgatctactatacctccaggctgcactctggcgt gccagtcggttcagtggtca  
gggagcggaaccgacttcaacttttaccatctcaagcctg cagccagaggatattgccacatactattgtcagcagggcaata  
cactgccctacacttttg gccaggggaccaaggtggaaatcaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttccc gc  
catctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttc tatccagagaggccaaagtaca  
gtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccc aggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagc  
ctcagcagcaccctgac gotgagcaaagcagactacgagaaacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc ctg  
agctcgcccggtcacaagagcttcaacaggggagagtgt (配列番号 1 1 6)

20

【 0 5 9 7 】

<sub>4792</sub> <sup>559</sup> A V 1 アミノ酸

【 化 7 0 】

QQQSGQYGSCSWNYVHIFMDCGSSGGSGGSGGSONQALRMAGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISSYLNWYQQ  
KPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSL QPEDIAITYCQQGNTLPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASWCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS  
PVTLSFNREGC (配列番号 1 1 7)

30

【 0 5 9 8 】

<sub>4792</sub> <sup>559</sup> A V 1 ヌクレオチド

40



## 【化 7 1】

caagccagtcctggccagtatgggtcctgcagttggaactatgtacacatattcatggatt gggctcgagcgggtggcagcg  
gtggctctggtggctcacagaatcaggcattacgtatggc aggcggttctgacatccagatgactcagtccttagctccct  
gtccgcctctgtgggggac cgagtcaccatcacatgcagagccagcaggatatttctagttacctgaactggatcagc a  
gaagcccggaaaagcacctaagctgctgatctactatacctccaggctgcactctggcgt gccagtcggttcagtggtca  
gggagcggaaccgacttcacttttaccatctcaagcctg cagccagaggatattgccacatactattgtcagcaggggaata  
cactgccctacacttttg gccaggggaccaaggtggaatcaaactacgggtggctgcaccatctgtcttcattctccc gc  
catctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttc tatcccagagaggccaaagtaca  
gtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccc aggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagc  
ctcagcagcacctgac gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc ctg  
agctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt (配列番号 1 1 8)

10

## 【 0 5 9 9】

4 7 9 2<sup>601</sup> A V 1 アミノ酸

## 【化 7 2】

QQSGQYGSQSWNYVHIFMDCGSSGGSGGSGGSAQNLLGMVGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISSYLNWYQQ  
KPGKAPKLLIYYTSLRHSQVPSRFSGSGSGTDFTFITSSL QPEDIATYYCQQGNTLPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQG L  
SSPVTKSFNRGEC (配列番号 1 1 9)

20

## 【 0 6 0 0】

4 7 9 2<sup>601</sup> A V 1 ヌクレオチド

## 【化 7 3】

Caagccagtcctggccagtatgggtcctgcagttggaactatgtacacatattcatggatt gggctcgagcgggtggcagcg  
gtggctctggtggctcagcacagaatctgttaggtatggc aggcggttctgacatccagatgactcagtccttagctccct  
gtccgcctctgtgggggac cgagtcaccatcacatgcagagccagcaggatatttctagttacctgaactggatcagc a  
gaagcccggaaaagcacctaagctgctgatctactatacctccaggctgcactctggcgt gccagtcggttcagtggtca  
gggagcggaaccgacttcacttttaccatctcaagcctg cagccagaggatattgccacatactattgtcagcaggggaata  
cactgccctacacttttg gccaggggaccaaggtggaatcaaactacgggtggctgcaccatctgtcttcattctccc gc  
catctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttc tatcccagagaggccaaagtaca  
gtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccc aggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagc  
ctcagcagcacctgac gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc ctg  
agctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt (配列番号 1 2 0)

30

## 【 0 6 0 1】

4 7 9 2<sup>3457</sup> A V 1 アミノ酸

## 【化 7 4】

40

QQSGQYGSQSWNYVHIFMDCGSSGGSGGSGGSTTFPFMGFGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISSYLNWYQQ  
KPGKAPKLLIYYTSLRHSQVPSRFSGSGSGTDFTFITSSL QPEDIATYYCQQGNTLPYTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASWCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS  
PVTKSFNRGEC (配列番号 1 2 1)

## 【 0 6 0 2】

4 7 9 2<sup>3457</sup> A V 1 ヌクレオチド

【化 7 5】

Caagccagtcctggccagtatgggtcctgcagttggaactatgtacacatattcatggatt gcggctcgagcgggtggcagcg  
gtggctctggtggctcaagtacatttccattcgggtatgtt cggcggttctgacatccagatgactcagtccttagctccct  
gtccgcctctgtgggggac cgagtcaccatcacatgcagagccagccaggatatttctagttacctgaactgggtatcagc a  
gaagcccggaagacacctaagctgctgatctactatacctccaggctgcactctggcgt gccagtcgggtcagtggtcga  
gggagcggaaccgacttcactttttaccatctcaagcctg cagccagaggatattgccacatactattgtcagcagggcaata  
cactgccctacacttttg gccaggggaccaaggtggaaatcaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttccc gc  
catctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttc tatccagagaggccaaagtaca  
gtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccc aggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagc  
ctcagcagcacctgac gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc ctg  
agctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt (配列番号 1 2 2)

10

【 0 6 0 3】

4 7 9 2<sup>3458</sup> A V 1 アミノ酸

【化 7 6】

QQSGQYGSWNYVHIFMDGSSGGSGGSGSPVGYTSSLGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISSYLNWYQQ  
KPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSL QPEDIATYYCQGNLTPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG L  
SSPVTKSFNRGEC (配列番号 1 2 3)

20

【 0 6 0 4】

4 7 9 2<sup>3458</sup> A V 1 ヌクレオチド

【化 7 7】

Caagccagtcctggccagtatgggtcctgcagttggaactatgtacacatattcatggatt gcggctcgagcgggtggcagcg  
gtggctctggtggctcacctgttggatatacagtagtct gggcggttctgacatccagatgactcagtccttagctccct  
gtccgcctctgtgggggac cgagtcaccatcacatgcagagccagccaggatatttctagttacctgaactgggtatcagc a  
gaagcccggaagacacctaagctgctgatctactatacctccaggctgcactctggcgt gccagtcgggtcagtggtcga  
gggagcggaaccgacttcactttttaccatctcaagcctg cagccagaggatattgccacatactattgtcagcagggcaata  
cactgccctacacttttg gccaggggaccaaggtggaaatcaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttccc gc  
catctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttc tatccagagaggccaaagtaca  
gtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccc aggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagc  
ctcagcagcacctgac gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc ctg  
agctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt (配列番号 1 2 4)

30

【 0 6 0 5】

4 7 9 2<sup>3463</sup> A V 1 アミノ酸

【化 7 8】

40

QQSGQYGSWNYVHIFMDGSSGGSGGSGSDWLYWPGIGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDISSYLNWYQQ  
KPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSL QPEDIATYYCQGNLTPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG L  
SSPVTKSFNRGEC (配列番号 1 2 5)

【 0 6 0 6】

4 7 9 2<sup>3463</sup> A V 1 ヌクレオチド

## 【化 7 9】

Caagccagtcctggccagtatgggtcctgcagttggaactatgtacacatattcatggatt gcggtcgcagcggtggcagcg  
 gtggctctgtggctcagactgggttatactggcctggat tggcggttctgacatccagatgactcagtccttagctccct  
 gtccgcctctgtgggggac cgagtcacatcacatgcagagccagcagcatatcttagttacctgaactggatcagc a  
 gaagcccgaaaagcacctaagctgctgatctactatacctccaggctgcactctggcgt gccagtcggttcagtggtca  
 gggagcggaaccgacttcactttttaccatctcaagcctg cagccagaggatattgccacatactattgtcagcagggcaata  
 cactgccctacacttttg gccaggggaccaaggtggaaatcaaacgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatttccc gc  
 catctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttc tatccagagaggccaaagtaca  
 gtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactccc aggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagc  
 ctgagcagcaccctgac gctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggc ctg  
 agctcgcctgcacaaagagcttcaacaggggagagtgt (配列番号 6 6)

10

## 【0 6 0 7】

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、I L 6 R  
 への抗 - I L 6 R 親抗体の結合に比較して、ヒト I L 6 R に結合する活性化可能抗体の能  
 力を評価する E L I S A 形式により決定した。手短に言えば、Nunc Maxisorp プレートを  
 、P B S ( p H 7 . 4 ) 中、ヒト I L 6 R ( R and D Systems、カタログ番号 227-SR/CF )  
 の 5 0 0 - n g / m l 溶液 1 0 0 μ l ( ウェル当たり ) により、4 で一晩、被覆した。  
 プレートを、P B S T ( P B S 、 p H 7 . 4 、 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 ) により 3 度 20  
 、洗浄した。次に、ウェルを、P B S T 中、2 % N F D M ( 脱脂粉乳 ) 2 0 0 μ l ( ウェ  
 ル当たり ) により、室温で 2 時間、ブロックした。I L 6 R - 被覆されたプレートを、P  
 B S T ( P B S 、 p H 7 . 4 、 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 ) 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 - I L 6 R 抗体の希釈系を、I L  
 6 R - 被覆された E L I S A 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、P B S T ( P B S , p H 7 . 4 0 . 0 5 % T w e e  
 n - 2 0 ) により 3 度、洗浄した。2 % N F D M - P B S T 中、ヤギ - 抗 - ヒト I g G (   
 F a b 特異的、S i g m a カタログ番号 A 0 2 9 3 ) の 1 : 3 0 0 0 希釈溶液 1 0 0 μ l  
 ( 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、P B S T ( P B S 、 p H 7 . 4 、 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 ) により 6 度、 30  
 洗浄し、そして次に、T M B 及び 1 N の H C l により展開した。

## 【0 6 0 8】

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 - I L 6 R  
 活性化可能抗体が、R A 患者から得られた少なくともいくつかの滑液サンプル ( S y F )  
 により切断されることを示唆する。

## 【0 6 0 9】

## 【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	S y Fでの活性化	S y Fでの発生
10419 I S S G L S S (配列番号 159)	< 5 %	> 30 %	3/3
559 Q N Q A L R M A (配列番号 15)	< 5 %	20 %	3/3
601 A Q N L L G M V (配列番号 16)	< 5 %	> 30 %	3/3
3457 S T F P G M F (配列番号 17)	10 %	> 50 %	3/3
3458 P V G Y T S S L (配列番号 18)	10 %	20 %	3/3
3463 D W L Y W P G I (配列番号 19)	< 5 %	> 30 %	3/3

10

## 【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 - E G F R 抗体

この実施例は、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、MMP 14 基質 520 (本明細書においては、MN 520 とも呼ばれる) 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 C 225 v 5 (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 P b - M N 520 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 - E G F R 抗体の、H 292 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 - C 225 v 5 の L 鎖であった。

20

## 【0611】

図 1 A は、異なった時間で投与される、P b - 520 (12.5 mg / kg、青の実線) 及び I V I G (12.5 mg / kg、緑の点線) を用いて処置された H 292 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 ± S E M として表される。図 1 B は、H 292 腫瘍担持マウスにおける P b - 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 (G X I I : Caliper Life Sciences) による I g G プル - 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 Life Sciences) を用いて決定した。

30

## 【0612】

実施例 3. 材料及び方法

試薬及び菌株: ストレプトタビジン - 接合フィコエリトリン (S A - P E) (Invitrogen, Life Technologies) を、変性しないで使用した。ヒト MMP 9 (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 MMP 14 (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 t P A (Molecular Innovations) を、変性しないで使用した。M o n a (単球アダプタータンパク質) の S H 3 ドメインに融合される Y P e を、Y P e を、CytamX Therapeutics で製造し、そして変性しないで使用した。MMP 14 緩衝液 H C M (50 mM の H E P E S (pH 6.8)、10 mM の C a C l<sub>2</sub>、0.5 mM の M g C l<sub>2</sub>) を使用した。MMP 9 緩衝液 T C N B (50 mM の トリス - H C l、10 mM の C a C l<sub>2</sub>、150 mM の N a C l、0.05 % (w/v) の B r i j - 35、pH 7.5) を使用した。プラスミン 緩衝液 (50

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 (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ブイヨン (LB) 中で、激しく振盪しながら、37 °C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 °C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 °C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。氷上で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FACS Aria (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政を実施し、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US 13/54378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、それらの全体が参照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：ストレプトタビジ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トタビジ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

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、S A P E ( 2 0 μ g / m l ) 又は Y P e t - M O N A ( 5 0 n M ) と共に 4 で 3 0 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、3 0 分インキュベーションを使用した。

【 0 6 1 9 】

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：

【 0 6 2 0 】

10

【数 1】

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

【 0 6 2 1 】

ここで ( F L \_ ) 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、( F L \_ + ) 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 ( F L \_ 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<sub>M</sub>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：

20

【 0 6 2 2 】

【数 2】

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

30

【 0 6 2 3 】

下記のように表される基質転換を可能にする：

【 0 6 2 4 】

【数 3】

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

【 0 6 2 5 】

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<sub>M</sub> ) を決定するために、等式 [ 3 ] が下記のように単純化された：

【 0 6 2 6 】

【数 4】

$$k_{cat}/K_M = -\ln(1-C) / (t \cdot p)$$

【 0 6 2 7 】

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、ちょうどの可変ペプチド挿入体を得るために、不変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含む配列を、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（S 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。

10

## 【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7,666,817B2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2A及び2Bは、TCNB緩衝液中、5nMでのMMP9によるプールSMP87の切断を示す。

20

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、いくつかの異なる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中、5nMのMMP9によるアミノ酸配列VAGRSMP（配列番号484）を含む基質の切断を示す。

30

## 【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の相互関係

40

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、ちょうどの可変ペプチド挿入体を得るために、不変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含む配列を、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（ $k_{cat}/K_M$ ）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

50

全細胞上への多コピー基質表示の使用は、MMP 14 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MMP 14 を用いて、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、MMP 9 及びMMP 14 により試験した。図5A及び5Bは、HCM緩衝液中、60 nMでのMMP 14 によるプールSMP 39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、MMP 14 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、30 nMのMMP 14 によるアミノ酸配列QNQALRMA（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ビトロ基質活性

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ビトロ活性を示す。

#### 【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MMP 9又はMMP 14により切断される能力を、次の通りに決定した。MMP 9プロテアーゼ消化を、TCNB、50 mMのトリス-HCl、10 mMのCaCl<sub>2</sub>、150 mMのNaCl、0.05% (w/v)のBrij-35、pH 7.5において実施した。MMP 14消化を、50 mMのHEPES (pH 6.8)、10 mMのCaCl<sub>2</sub>、0.5 mMのMgCl<sub>2</sub>において実施した。種々の濃度の活性部位滴定MMP 9又はMMP 14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。MMP 9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。MMP 14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dd H<sub>2</sub>O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】

$$k_{cat}/K_M = -\ln(1-C)/(t \cdot p)$$

10

20

30

40

50



## 【0638】

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。

## 【0639】

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 $400 \sim 60,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 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

## 【0640】

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。

## 【0641】

3匹のヌードマウス(Crl:NU-Foxn1nu)は、0日目、 $12.5 \text{ mg/kg}$ 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、 $\text{CO}_2$ 窒息により、4日目(投与後、約96時間)、安楽死させ、そして血液を、血漿-EDTAとして、すぐに集め、そして $-80^\circ\text{C}$ で貯蔵した。

## 【0642】

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、 $5 \mu\text{l}$ の溶出されたIgGを、 $7 \mu\text{l}$ 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。

20

## 【0643】

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

## 【0644】

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、変性なしで使用した。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(EE647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、 $34 \mu\text{g/ml}$ 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 $37^\circ\text{C}$ で実施した。

40

## 【0645】

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-XXXXXXXXXXディスプレイプラットフォーム

50

ム（配列番号 5 1 2）のアミノ酸配列が、図 7 A に示されている。XXXXXXXXXX（配列番号 5 1 4）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 - XXXXXXXX（配列番号 5 1 2）ディスプレイプラットフォーム、すなわち SP - CYTX - DP - XXXXXXXX（配列番号 5 1 3）ディスプレイプラットフォームのアミノ酸配列が、図 7 B に示される。

【0646】

CYTX - DP - XXXXXXXX のディスプレイプラットフォーム：

【化80】

GQSGQEYMPMEGGSGQXXXXXXXXXSGGQGGSGGSGGSGGSGGSA YYGITAGPAYRINDWASIYGVVG VGYSGPGGSYGFSGYAGLQFNPEVALDFSYSRIRSVDTWILSVGYRFGSKSRRTSTVTGGYAQSDAQGMNKMGGFNLKYRYEEDNSPLGVIGSFTYTGGSGGSGGAAAGHHHHHHH（配列番号 5 1 2）

10

【0647】

SP - CYTX - DP - XXXXXXXX のディスプレイプラットフォーム：

【化81】

MKKIACLSALAAVLAFAGTAVAGQSGQEYMPMEGGSGQXXXXXXXXXSGGQGGSGGSGGSGGSGGSA YYGITAGPAYRINDWASIYGVVG VGYSGPGGSYGFSGYAGLQFNPEVALDFSYSRIRSVDTWILSVGYRFGSKSRRTSTVTGGYAQSDAQGMNKMGGFNLKYRYEEDNSPLGVIGSFTYTGGSGG SSGGAAAGHHHHHHH（配列番号 5 1 3）

20

【0648】

基質切断及び切断キネティクス分析：クローン分析のために、一晚の培養物を、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。氷上で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Accuri C6細胞ソーターを用いて分析した。

30

【0649】

MMP9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。MMP9のための反応緩衝液は、150 mMのNaCl、10 mMのCaCl<sub>2</sub>及び0.05%（w/v）のBrij-35により補充された、50 mMのトリス-HCl（pH 7.4）であった。MMP9加水分解についてのアッセイを、5 nM - 150 nMのMMP9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、すなわち「基質」が非切断可能リンカーGGSGGGS（配列番号 5 1 5）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。

40

【0650】

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CaCl<sub>2</sub>及び0.5 mMのMgCl<sub>2</sub>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

50

めに各反応条件下で測定した。

【 0 6 5 1 】

ヒトプラスミン安定性アッセイのために、培養物を 4 5 分間、誘発した。プラスミンのための反応緩衝液は、1 0 0 m M の N a C l、0 . 0 1 % の T w e e n 2 0 及び 1 m M の E D T A により補充された、5 0 m M の トリス - H C l ( p H 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、5 0 0 p M 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、C Y T X - D P - N S U B 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 2 】

アミノ及びカルボキシル末端標識条件 : A l e x a - 6 4 7 接合抗 - E E 抗体 ( E E 6 4 7 ) を、C Y T X - D P ディスプレイプラットフォームの N - 末端上に E E 結合親和性リガンドを標識するために使用した。A l e x a - 6 4 7 接合抗 - H i s 抗体 ( H i s 6 4 7 ) を、C Y T X - D P ディスプレイプラットフォームの C - 末端上に 8 H i s 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、E E 6 4 7 ( 2 0 μ g / m l ) 又は H i s 6 4 7 ( 2 μ g / m l ) 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。

【 0 6 5 3 】

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 :

【 0 6 5 4 】

【数 6】

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

【 0 6 5 5 】

ここで ( F L \_ ) 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、( F L \_ + ) 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 ( F L \_ 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<sub>M</sub> 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 :

【 0 6 5 6 】

【数 7】

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

【 0 6 5 7 】

下記のように表される基質転換を可能にする :

【 0 6 5 8 】

10

20

30

40

【数 8】

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

【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 ( $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$ ) 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 [3] 適合された。

10

【0660】

実施例 12. C Y T X - D P 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能力を示す。

【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ンを、DNA 配列決定により同定し、そして C Y T X - D P ディスプレイプラットフォーム中にサブクローン化し、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、X X X X X X X X (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ン (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、MMP 9 又は MMP 14 (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 MMP 9 - 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 MMP 9 基質) から選択した。9 の MMP 9 - 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 (MMP 9 コンセンサス配列) を含む。38 の MMP 14 - 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 MMP 14 基質) から選択した。10 の MMP 14 - 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 MMP 14 基質) から選択した。39 の MMP 14 - 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 (MMP 14 コンセンサス配列) から選択した。

20

30

【0662】

このようにして、各クローン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ンの % 及標的外プロテアーゼにより切断されないクローンの % 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、C Y T X - D P - N S U B 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。

40

【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 CaCl<sub>2</sub> 及び 0.05% (w/v) の Brij-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、CYTX-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 CaCl<sub>2</sub> 及び 0.0 mM の MgCl<sub>2</sub> 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、CYTX-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、CYTX-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. CYTX-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

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、CYTX-DP-XXXXXXX(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 $k_{cat}/K_M$ と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、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 $K_{cat}/K_M > 1 \times 10E2$	標的プロテアーゼ $K_{cat}/K_M > 1 \times 10E3$	標的プロテアーゼ $K_{cat}/K_M > 1 \times 10E4$
MMP9基質	試験されるすべてのMMP9基質	100% (16/16)	100% (16/16)	63% (10/16)
	プールからのMMP9基質	100% (15/15)	100% (15/15)	67% (10/15)
	MMP9コンセンサス基質	100% (1/1)	100% (1/1)	0% (0/1)
MMP14基質	すべてのMMP14	100% (55/55)	98% (54/55)	36% (20/55)
	第1プール及び第2プールからのMMP14基質	100% (47/47)	98% (46/47)	36% (17/47)
	第1プールからのMMP14基質	100% (38/38)	100% (38/38)	39% (15/38)
	第2プールからのMMP14基質	100% (9/9)	89% (8/9)	22% (2/9)
	MMP14コンセンサス基質	100% (8/8)	100% (8/8)	38% (3/8)
組合されたMMP9及びMMP14	合計	100% (71/71)	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ビ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ビ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

た。平均% 阻害率は、 $(\text{平均}(C) - \text{平均}(C_0)) - \text{平均}(T_0)) / (\text{平均}(C) - \text{平均}(C_0)) * 100$  (ここで、Tは現試験グループ値であり、T<sub>0</sub>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C<sub>0</sub>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マウスモデル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。

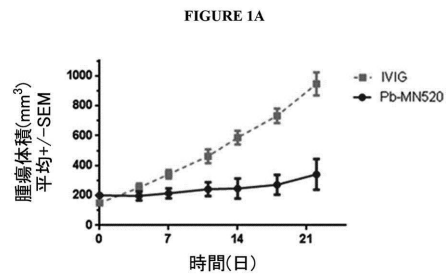
20

#### 【0671】

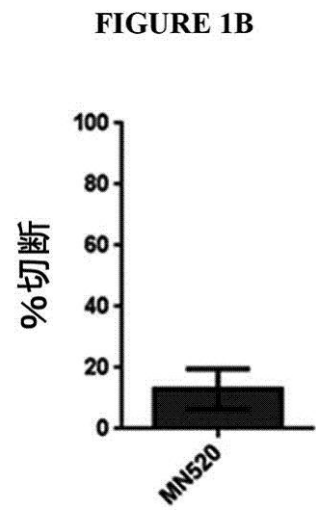
##### 他の実施形態

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。

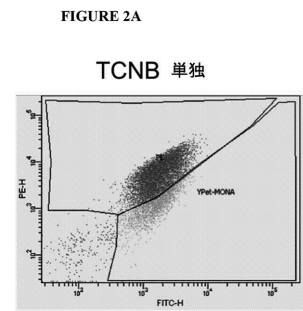
【図 1 A】



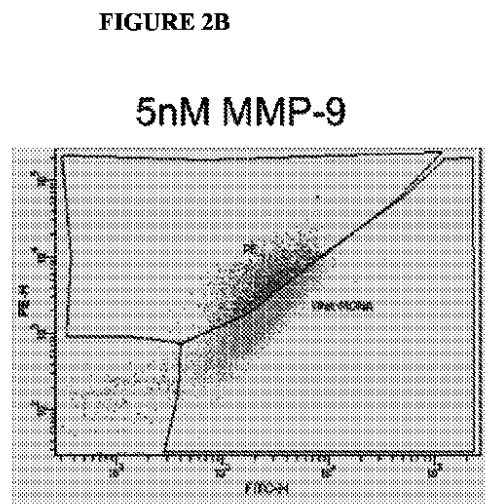
【図 1 B】



【図 2 A】

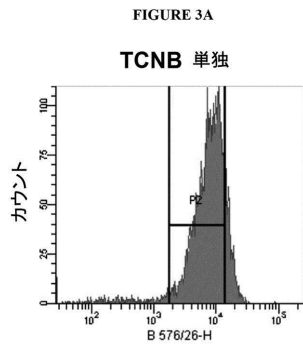


【図 2 B】

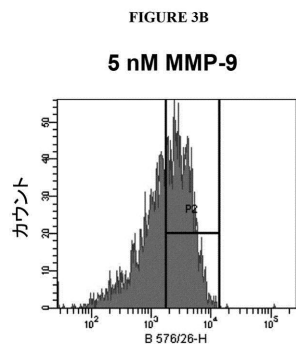




【図 3 A】



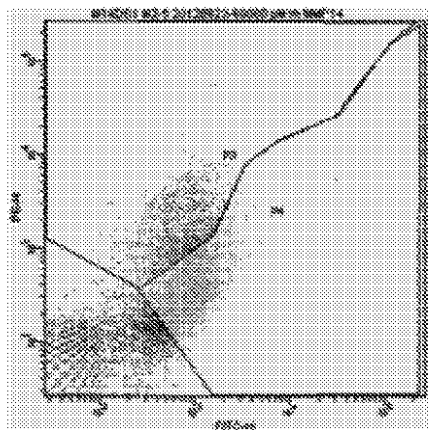
【図 3 B】



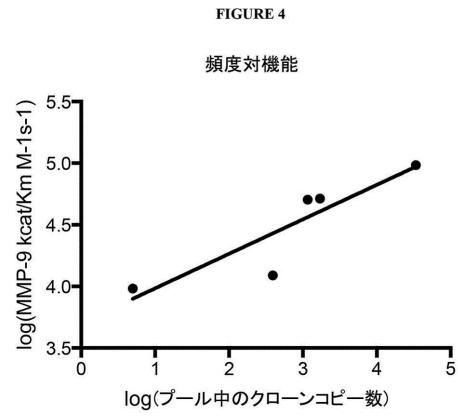
【図 5 B】

FIGURE 5B

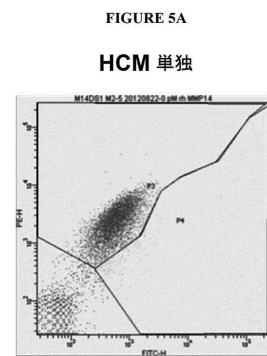
60 nM MMP14



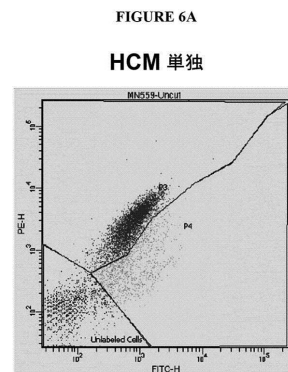
【図 4】



【図 5 A】



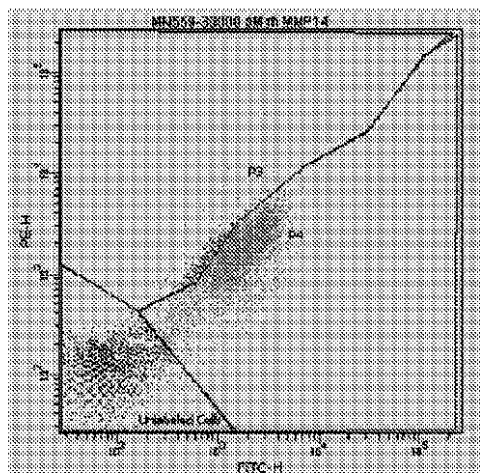
【図 6 A】



【 図 6 B 】

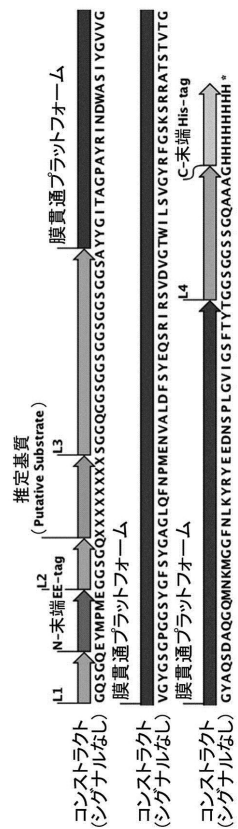
**FIGURE 6B**

### 30 nM MMP14



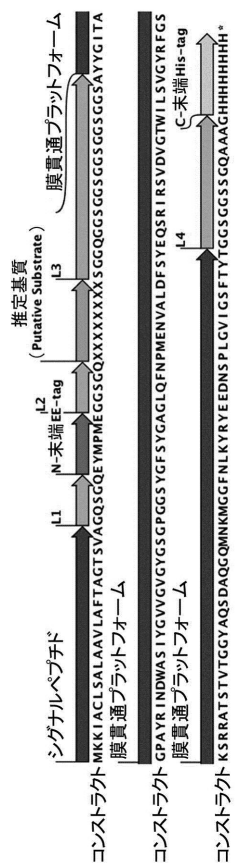
【圖 7 A】

**FIGURE 7A**



【 図 7 B 】

**FIGURE 7B**



【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 218

(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  
#ディー

(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 C  
LEAVAGE SITE MOTIFS USING MIXTURE-BASED ORI  
ENTED PEPTIDE LIBRARIES、NATURE BIOTECHNOLOG  
Y、米国、2001.07.発行、VOL:19, NO:7、PAGE(S):661 -  
667KRIDEL S J; ET AL、SUBSTRATE HYDROLYSIS BY M  
ATRIX METALLOPROTEINASE-9、JOURNAL OF BIOLOG  
ICAL 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 CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIS(STN),  
Uniprot/GeneSeq, JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JD  
reamIII)