

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6571730号
(P6571730)

(45) 発行日 令和1年9月4日(2019.9.4)

(24) 登録日 令和1年8月16日(2019.8.16)

(51) Int. Cl.		F I	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C O 7 K 19/00 Z N A
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C O 7 K 16/00
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N 15/13
C 1 2 P	21/00	(2006.01)	C 1 2 P 21/00 C

請求項の数 6 外国語出願 (全 128 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-157121 (P2017-157121)	(73) 特許権者	510046457
(22) 出願日	平成29年8月16日 (2017.8.16)		サイトムエックス セラピューティクス、 インク、 CytomX Therapeutics , Inc.
(62) 分割の表示	特願2015-146530 (P2015-146530) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 080, サウス サンフランシスコ, オイ スター ポイント ブールバード 151 , スイート 400 151 Oyster Point Bo ulevard, Suite 400, S outh San Francisco, California, 94080 U. S. A.
原出願日	平成22年1月12日 (2010.1.12)		
(65) 公開番号	特開2017-200955 (P2017-200955A)		
(43) 公開日	平成29年11月9日 (2017.11.9)		
審査請求日	平成29年8月16日 (2017.8.16)		
(31) 優先権主張番号	61/249, 441		
(32) 優先日	平成21年10月7日 (2009.10.7)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/144, 110		
(32) 優先日	平成21年1月12日 (2009.1.12)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変した抗体組成物、それを作製および使用する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) TGRGPSWV (配列番号267)、SARGPSRW (配列番号268)、TARGPSFK (配列番号269)、TARGPSW (配列番号270)、LSGRSDNH (配列番号271)、GGWHTGRN (配列番号272)、HTGRSGAL (配列番号273)、PLTGRSGG (配列番号274)、LTGRSGA (配列番号275)、AARGPAIH (配列番号276)、RGPAFNPM (配列番号277)、SSRGPAYL (配列番号278)、RGPATPIM (配列番号279) およびRGPA (配列番号280) からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む切断可能な部分 (C M) であって、該アミノ酸配列は、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子 (u P A) によって切断することができる、C M ;

(i i) 標的と結合する抗体またはその抗原結合断片 (A B) ; ならびに

(i i i) マスキング部分 (M M) であって、該 M M は、標的との結合についての該 A B の平衡解離定数よりも大きい、該 A B との結合についての平衡解離定数を有する、M M ; を含む、切断可能なポリペプチドであって、該 C M が該 A B と該 M M の間に位置する、切断可能なポリペプチド。

【請求項 2】

検出可能な部分を含む、請求項 1 に記載の切断可能なポリペプチド。

【請求項 3】

前記検出可能な部分が、放射性同位元素、蛍光剤、化学発光剤、発色団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、色素、金属イオン、金属ゾル、またはリガンドを含む、請求項 2 に記載の切断可能なポリペプチド。

10

20

【請求項4】

試料における切断剤の存在の指標として、切断された切断可能なポリペプチドの存在を用いる方法であって、

試料において、請求項2または請求項3に記載の切断可能なポリペプチドの切断の有無を検出する工程

を包含し、切断された該切断可能なポリペプチドの存在は、該試料における該切断剤の存在を示し、必要に応じて、該切断剤が、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（uPA）である、方法。

【請求項5】

請求項1～3のいずれか一項に記載の切断可能なポリペプチドをコードする、単離された核酸分子。 10

【請求項6】

前記切断可能なポリペプチドの発現をもたらす条件下で細胞を培養することにより、請求項1～3のいずれか一項に記載の切断可能なポリペプチドを作製する方法であって、該細胞が、請求項5に記載の単離された核酸分子を含むベクターを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

この出願は、2009年1月12日に出願された米国仮出願第61/144,110号、2009年1月12日に出願された同第61/144,105号、2009年10月7日に出願された同第61/249,441号および2009年10月7日に出願された同第61/249,416号の利益を主張する。これらの出願は、それらの全体が参考として本明細書に援用される。 20

【背景技術】

【0002】

タンパク質に基づいた治療は様々な異なる疾患において応用を見出し、医学の様相を変えている。特定の抗体に基づいた治療は、一部の疾患には有効な処置が証明されているが、一部の例では、幅広い標的発現が原因の毒性によりその治療有効性が制限されている。

【0003】

しかし、どの薬物でもそうであるように、その標的に対する特異性および選択性が向上した薬物の必要性および要求は、特に、それが結合する公知の標的を有する第二世代の抗体に基づいた薬物の開発において、大変興味深い。疾患部位に対する抗体の標的化の増加は、全身性の機構に基づいた毒性を低下させ、より幅広い治療上の有用性をもたらす可能性がある。 30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

小分子薬物の領域では、活性化学物質のプロドラッグを提供するための戦略が開発されている。そのようなプロドラッグは、比較的不活性（または活性が有意により低い）形態で投与する。投与後、プロドラッグは*in vivo*で活性化化合物へと代謝される。そのようなプロドラッグ戦略では、その意図する標的に対する薬物の選択性の増加および有害作用の低下をもたらすことができる。酸化還元の前駆体を用いて低酸素癌細胞を標的とするために使用する薬物は、低酸素細胞中に存在する大量のレダクターゼ酵素を利用して、薬物をその細胞毒性がある形態へと変換し、それを本質的に活性化させる。プロドラッグはこの活性化前は細胞毒性が低いため、非癌細胞に対する損傷の危険性は顕著に減少しており、したがって、薬物に関連する副作用の低下をもたらされる。当分野では、プロドラッグの特長を抗体に基づいた治療学に提供する戦略の必要性が存在する。 40

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、治療学および診断学に有用な、改変した活性化可能な抗体組成物を提供する。この活性化可能な抗体組成物は、プロドラッグの特長を有する慣用の抗体治療剤と比較して、増加したバイオアベイラビリティおよび体内分布を示す。また、診断学および治療学において使用する方法、ならびにそのような組成物をスクリーニングおよび構築する方法も提供する。

【0006】

一態様では、本開示は、その標的と特異的に結合することができ、マスキング部分(MM)とカップリングした、抗体または抗体断片(AB)を含む改変抗体であって、MMのカップリングにより、標的に対するMMとカップリングしたABの解離定数(K_d)が前記標的に対するMMとカップリングしていないABの K_d よりも少なくとも100倍高い、少なくとも1000倍高い、または少なくとも10,000倍高くなるように、ABがその標的と結合する能力が低下する、改変抗体を提供する。

10

【0007】

別の態様では、本開示は、その標的と特異的に結合することができ、マスキング部分(MM)とカップリングした、抗体または抗体断片(AB)を含む改変抗体であって、MMとABとのカップリングにより、標的置換アッセイを用いて*in vitro*でアッセイした場合に、ABが標的と結合する能力が、MMとカップリングしていないABが標的と結合する能力と比較して少なくとも90%低下する、改変抗体を提供する。そのようなMMとABとのカップリングにより、ABがその標的と結合する能力が、少なくとも12時間の間または少なくとも24時間の間または少なくとも72時間の間低下する。

20

【0008】

別の態様では、改変抗体は切断可能な部分(CM)とさらにカップリングしている。CMは酵素によって切断することができるか、またはCMは還元剤によって還元することができるか、またはCMは光分解することができる。CMは、少なくとも約 $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ 、または少なくとも $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}$ 、または少なくとも $10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}$ の速度で特異的に切断、還元、または光分解することができる。一実施形態では、改変抗体のCMはMM内にある。

【0009】

本明細書中で提供する改変抗体中の、ABに対するMMの解離定数(K_d)は、通常、標的に対するABの K_d よりも少なくとも100倍高い。一般に、ABに対するMMの K_d は、10 nM未満、または5 nM未満、または約1 nMである。

30

【0010】

一部の実施形態では、改変抗体のMMは、ABの抗原結合ドメインと特異的に結合することによって、その標的と結合するABの能力を低下させる。そのような結合は非共有結合であることができる。改変抗体のMMは、その標的とアロステリックまたは立体的に結合するABの能力を低下させることができる。具体的な実施形態では、改変抗体のMMは、ABの天然の結合パートナーに対して50%より高いアミノ酸配列類似性を含まない。

【0011】

具体的な実施形態では、改変抗体のABは、Fab'断片、F(ab')₂断片、scFv、scAB、dAb、単ドメイン重鎖抗体、および単ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体断片である。

40

【0012】

関連する実施形態では、改変抗体のABは、表2の抗体からなる群より選択されるか、または、具体的には、ABの供給源は、セツキシマブ(cetuximab)、パニツムマブ(panitumumab)、インフリキシマブ(infliximab)、アダリムマブ(adalimumab)、エファリツマブ(efalizumab)、イピリムマブ(ipilimumab)、トレメリムマブ(tremelimumab)、アデカツムマブ(adecatumumab)、Hu5c8、アレムツズマブ(alemtuzumab)、ラニビズマブ(ranibizumab)、トシツモマブ(tositumomab)、イブリツモマブチウキセタン(ibritumomab tiuxetan

50

)、リツキシマブ(rituximab)、インフリキシマブ(infliximab)、ベバシズマブ(bevacizumab)、もしくはフィギツムマブ(figitumumab)である。具体的な実施形態では、改変抗体はアレムツズマブではない。

【0013】

関連する実施形態では、ABの標的は、表1の標的からなる群より選択される。例示的な実施形態では、標的は、EGFR、TNFアルファ、CD11a、CSFR、CTLA-4、EPCAM、VEGF、CD40、CD20、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged1、Jagged2、CD52、MUC1、IGF1R、トランスフェリン、gp130、VCAM-1、CD44、DLL4、またはIL4である。具体的な一実施形態では、標的はCD52ではない。

10

【0014】

具体的な実施形態では、改変抗体は第2のABをさらに含み、第2のABの標的は表1の標的からなる群より選択される。

【0015】

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

20

【0016】

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

30

【0017】

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

【0018】

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

40

【0019】

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

【0020】

50

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

【0021】

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

【0022】

本明細書中で提供する改変抗体の一部のMMのコンセンサス配列は、C I S P R G C、
C (N / P) H (H V F) (Y / T) (F / W / T / L) (Y / G / T / S) (T / S /
Y / H) C G C I S P R G C G、x C x x Y Q C L x x x x x x、X X Q P x P P R V X
X、P x P G F P Y C x x x x、x x x x Q x x P W P P、G x G x C Y T I L E x x C
x x x R、G x x x C Y x I x E x x C x x x x、G x x x C Y x I x E x W C x x x x
、x x x C C x x Y x I x x C C x x x、またはx x x x x Y x I L E x x x x xである。
具体的な実施形態では、コンセンサス配列は、抗V E G F抗体、抗E F G R抗体、または抗C T L A - 4抗体との結合に特異的である。

【0023】

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

【0024】

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

【0025】

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

【0026】

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

【0027】

A Bが抗体断片であるA Aの特定の実施形態では、抗体断片は、F a b '断片、F (a b ') 2断片、s c F v、s c A B、d A b、単ドメイン重鎖抗体、および単ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される。

【0028】

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

10

20

30

40

50

、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである。

【0029】

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

【0030】

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

10

【0031】

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

【0032】

本明細書中に提供するAAの一部の実施形態では、CMはMM内に位置する。

20

【0033】

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

【0034】

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

【0035】

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

【0036】

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

30

40

【0037】

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

【0038】

AACの一実施形態では、CMは、酵素によって少なくとも約 $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ の速度で特異的に切断することができる。

【0039】

AACのAB1またはAB2が抗体断片である実施形態では、抗体断片は、Fab'断片、F(ab')₂断片、scFv、scAB、dAb、単ドメイン重鎖抗体、および

50

単一ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される。

【0040】

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

【0041】

AACの一実施形態では、AB1および/またはAB2の標的は、表1の標的からなる群より選択される。関連する実施形態では、AB1および/またはAB2の標的は、EGFR、TNFアルファ、CD11a、CSFR、CTLA-4、EpCAM、VEGF、CD40、CD20、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged1、Jagged2、CD52、MUC1、IGF1R、トランスフェリン、gp130、VCAM-1、CD44、DLL4、またはIL4である。具体的な実施形態では、AB1およびAB2は、それぞれ、EGFRおよびVEGF、Notch受容体およびEGFR、JaggedリガンドおよびEGFRまたはcMETおよびVEGFと結合することができる。

10

【0042】

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

20

【0043】

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

30

【0044】

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

【0045】

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

40

【0046】

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

【0047】

具体的な実施形態では、状態は癌である。

【0048】

別の具体的な実施形態では、MMはABの天然の結合パートナーではない。

50

【 0 0 4 9 】

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

【 0 0 5 0 】

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

10

【 0 0 5 1 】

本方法の非常に具体的な一実施形態では、A Bはアレムツズマブではなく、標的はCD52ではない。

【 0 0 5 2 】

本方法の様々な実施形態では、CMは表3の酵素からなる群より選択される酵素の基質である。具体的な実施形態では、CMは、レグミン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である。

20

【 0 0 5 3 】

また、本明細書中では、哺乳動物被験体において血管形成を阻害する方法であって、それを必要としている被験体に、治療上有効な量の、改変したA B、A A、A A C、またはA A C Jを含む医薬組成物を投与することを含み、標的は、EGFR、TNFアルファ、CD11a、CSFR、CTLA-4、EPCAM、VEGF、CD40、CD20、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged1、Jagged2、CD52、MUC1、IGF1R、トランスフェリン、gp130、VCAM-1、CD44、DLL4、またはIL4である、方法も提供する。具体的な実施形態では、A Bは、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Hu5c8、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブであり、CMは、レグミン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である。

30

【 0 0 5 4 】

また、本明細書中では、活性化可能な抗体(A A)組成物を作製する方法であって、その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片(A B)を提供するステップと、A Bとその標的との特異的結合を阻害することができるマスキング部分(M M)を、A Bとカップリングさせるステップと、酵素によって特異的に切断することができる切断可能な部分(C M)を、A Bとカップリングさせるステップとを含み、標的に対するM MとカップリングしたA Bの解離定数(K_d)が標的に対するM MとカップリングしていないA Bの K_d よりも少なくとも100倍高い、方法も提供する。

40

【 0 0 5 5 】

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

50

【 0 0 5 6 】

非常に具体的な一実施形態では、A Bはアレムツズマブではなく、標的はC D 5 2ではない。

【 0 0 5 7 】

本方法の別の実施形態では、C Mは表3の酵素からなる群より選択される酵素の基質である。具体的な実施形態では、C Mは、レグミン、プラスミン、T M P R S S - 3 / 4、M M P - 9、M T 1 - M M P、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ - セクレターゼ、u P A、またはP S Aの基質である。

【 0 0 5 8 】

また、本明細書中では、候補ペプチドをスクリーニングして抗体または抗体断片(A B)と結合することができるマスキング部分(M M)ペプチドを同定する方法であって、それぞれのペプチド足場が膜貫通タンパク質(T M)および候補ペプチドを含む、ペプチド足場のライブラリを提供するステップと、A Bをライブラリと接触させるステップと、A Bと結合することができる少なくとも1つの候補ペプチドを同定するステップと、A Bに対する候補ペプチドの解離定数(K_d)が1 ~ 1 0 n Mであるかどうかを決定するステップとを含む方法も提供する。

【 0 0 5 9 】

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

【 0 0 6 0 】

また、最適なマスキング効率で抗体または抗体断片(A B)をマスキングすることができるマスキング部分(M M)ペプチドを同定するための別のスクリーニング方法であって、それぞれが候補ペプチドとカップリングした、標的と特異的に結合することができる複数のA Bを含むライブラリを提供するステップと、それぞれのライブラリメンバーを標的と共にインキュベートするステップと、標的に対するそれぞれのライブラリメンバーの結合親和性を、標的に対する候補ペプチドとカップリングしていないそれぞれのA Bの結合親和性と比較するステップとを含む方法も提供する。具体的な実施形態では、最適な結合効率は、標的に対するライブラリメンバーの結合親和性が、標的に対する改変していないA Bの結合親和性と比較して1 0 %である場合である。

【 0 0 6 1 】

また、一態様では、本明細書中では、第1の組織中での抗体治療剤とその標的との結合の親和性が、抗体治療剤と第2の組織中のその標的との結合よりも低い、バイオアベイラビリティが向上した抗体治療剤も提供する。また、関連する態様では、本明細書中では、その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片(A B)と、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物であって、第1の組織中の標的に対する抗体または抗体断片の親和性は、第2の組織中の標的に対する抗体または抗体断片の親和性よりも低い、医薬組成物も提供する。具体的な実施形態では、第1の組織中での親和性は、第2の組織中での親和性の1 0 ~ 1 . 0 0 0分の1である。一実施形態では、A Bは、A Bとその標的との結合を還元することができるマスキング部分(M M)および酵素によって特異的に切断することができる切断可能な部分(C M)とカップリングしている。

【 0 0 6 2 】

関連する実施形態では、標的は、E G F R、T N Fアルファ、C D 1 1 a、C S F R、C T L A - 4、E p C A M、V E G F、C D 4 0、C D 2 0、N o t c h 1、N o t c h 2、N o t c h 3、N o t c h 4、J a g g e d 1、J a g g e d 2、C D 5 2、M U C 1、I G F 1 R、トランスフェリン、g p 1 3 0、V C A M - 1、C D 4 4、D L L 4、またはI L 4である。関連する実施形態では、C Mは、レグミン、プラスミン、T M P R S S - 3 / 4、M M P - 9、M T 1 - M M P、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ - セクレターゼ、u P A、またはP S Aの基質である。関連する実施形態では、抗体または抗体断片は、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、ア

10

20

30

40

50

ダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アダカツムマブ、Hu5c8、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである。

【0063】

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

10

【0064】

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

【0065】

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

20

30

40

50

化可能なアダリムマブ抗体もしくは抗体断片 (A B) を含む組成物、マスキング部分 (M M) とカップリングした、活性化可能なエファリズマブ抗体もしくは抗体断片 (A B) を含む組成物、マスキング部分 (M M) とカップリングした、活性化可能なイピリムマブ抗体もしくは抗体断片 (A B) を含む組成物、マスキング部分 (M M) とカップリングした、活性化可能なトレメリムマブ抗体もしくは抗体断片 (A B) を含む組成物、またはマスキング部分 (M M) とカップリングした、活性化可能なアデカツムマブ抗体もしくは抗体断片 (A B) を含む組成物を提供する。

【 0 0 6 6 】

参考としての組み込み

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

10

【 0 0 6 7 】

本発明の新規特長は、添付の特許請求の範囲中に詳細に記載されている。本発明の特長および利点のより良好な理解は、本発明の原理を利用した例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、および添付の図面を参照することによって得られるであろう。

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目 1)

その標的と特異的に結合することができ、マスキング部分 (M M) とカップリングした、抗体または抗体断片 (A B) を含む改変抗体であって、上記 M M のカップリングにより、上記標的に対する上記 M M とカップリングした上記 A B の解離定数 (K_d) が上記標的に対する上記 M M とカップリングしていない上記 A B の K_d の少なくとも 1 0 0 倍になるように、上記 A B がその標的と結合する能力が低下する、改変抗体。

20

(項目 2)

上記標的に対する上記 M M とカップリングした上記 A B の K_d が、上記標的に対する上記 M M とカップリングしていない上記 A B の K_d の少なくとも 1 0 0 0 倍である、項目 1 に記載の改変抗体。

(項目 3)

上記標的に対する上記 M M とカップリングした上記 A B の K_d が、上記標的に対する上記 M M とカップリングしていない上記 A B の K_d の少なくとも 1 0 , 0 0 0 倍である、項目 1 に記載の改変抗体。

30

(項目 4)

標的の存在下で、上記 M M と上記 A B とのカップリングにより、標的置換アッセイを用いて *in vitro* でアッセイした場合に、上記 A B がその標的と結合する能力が、上記 M M とカップリングしていない上記 A B がその標的と結合する能力と比較して少なくとも 9 0 % 低下する、項目 1 に記載の改変抗体。

(項目 5)

上記 M M と上記 A B とのカップリングにより、上記 A B がその標的と結合する能力が少なくとも 1 2 時間の間低下する、項目 4 に記載の改変抗体。

(項目 6)

上記 M M と上記 A B とのカップリングにより、上記 A B がその標的と結合する能力が少なくとも 2 4 時間の間低下する、項目 4 に記載の改変抗体。

40

(項目 7)

上記 M M と上記 A B とのカップリングにより、上記 A B がその標的と結合する能力が少なくとも 7 2 時間の間低下する、項目 4 に記載の改変抗体。

(項目 8)

上記 A B に対する上記 M M の解離定数 (K_d) が、上記標的に対する上記 A B の K_d の少なくとも 1 0 0 倍である、項目 1 に記載の改変抗体。

(項目 9)

上記 A B に対する上記 M M の K_d が 1 0 n M 未満である、項目 8 に記載の改変抗体。

50

- (項目10)
上記ABに対する上記MMの K_d が5nM未満である、項目8に記載の改変抗体。
- (項目11)
上記ABに対する上記MMの K_d が約1nMである、項目8に記載の改変抗体。
- (項目12)
切断可能な部分(CM)とさらにカップリングしている、項目1に記載の改変抗体。
- (項目13)
上記CMを酵素によって切断することができる、項目12に記載の改変抗体。
- (項目14)
上記CMを還元剤によって還元することができる、項目12に記載の改変抗体。 10
- (項目15)
上記CMを光分解することができる、項目12に記載の改変抗体。
- (項目16)
上記MMが上記ABの抗原結合ドメインと特異的に結合することができる、項目1に記載の改変抗体。
- (項目17)
上記MMと上記抗原結合ドメインとの結合が非共有結合である、項目16に記載の改変抗体。
- (項目18)
上記MMが、その標的とアロステリックに結合する上記ABの能力を低下させる、項目1に記載の改変抗体。 20
- (項目19)
上記MMが、その標的と立体的に結合する上記ABの能力を低下させる、項目1に記載の改変抗体。
- (項目20)
上記CMを、酵素によって少なくとも約 $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ の速度で特異的に切断することができる、項目12に記載の改変抗体。
- (項目21)
上記CMを、酵素によって少なくとも $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}$ の速度で特異的に切断することができる、項目20に記載のAB。 30
- (項目22)
上記CMを、酵素によって少なくとも $10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}$ の速度で特異的に切断することができる、項目20に記載の改変抗体。
- (項目23)
上記抗体断片が、Fab'断片、F(ab')₂断片、scFv、scAB、dAb、単ドメイン重鎖抗体、および単ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される、項目1に記載の改変抗体。
- (項目24)
上記ABが表2の抗体からなる群より選択される、項目1に記載の改変抗体。
- (項目25)
上記ABがアレムツズマブではない、項目24に記載の改変抗体。 40
- (項目26)
上記ABが、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Hu5c8、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目24に記載の改変抗体。
- (項目27)
上記標的が表1の標的からなる群より選択される、項目1に記載の改変抗体。
- (項目28)
上記標的がCD52ではない、項目1に記載の改変抗体。 50

(項目29)

上記標的が、EGFR、TNFアルファ、CD11a、CSFR、CTLA-4、EPCAM、VEGF、CD40、CD20、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged1、Jagged2、CD52、MUC1、IGF1R、トランスフェリン、gp130、VCAM-1、CD44、DLL4、またはIL4である、項目27に記載の改変抗体。

(項目30)

第2のABをさらに含み、上記第2のABの標的が表1の標的からなる群より選択される、項目1に記載の改変抗体。

(項目31)

上記CMが上記MM内に位置する、項目12に記載の改変抗体。

10

(項目32)

上記CMが表3の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目12に記載の改変抗体。

(項目33)

上記CMが、レグマイン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である、項目32に記載の改変抗体。

(項目34)

上記ABが表2の抗体からなる群より選択される、項目32に記載の改変抗体。

20

(項目35)

上記ABがアレムツズマブではない、項目32に記載の改変抗体。

(項目36)

上記ABが、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Hu5c8、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目34に記載の改変抗体。

(項目37)

上記標的が表1の標的からなる群より選択される、項目32に記載の改変抗体。

(項目38)

上記標的がCD52ではない、項目37に記載の改変抗体。

30

(項目39)

上記標的が、EGFR、TNFアルファ、CD11a、CSFR、CTLA-4、EPCAM、VEGF、CD40、CD20、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged1、Jagged2、CD52、MUC1、IGF1R、トランスフェリン、gp130、VCAM-1、CD44、DLL4、またはIL4である、項目37に記載の改変抗体。

(項目40)

酵素によって特異的に修飾することができる第2の切断可能な部分(CM)とさらにカップリングしている、項目12に記載の改変抗体。

40

(項目41)

上記第2のCMが、レグマイン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である、項目40に記載の改変抗体。

(項目42)

上記MMが、上記ABの天然の結合パートナーに対して50%より高いアミノ酸配列類似性を含まない、項目1に記載の改変抗体。

(項目43)

上記ABと上記MMとの間に位置するリンカーペプチドをさらに含む、項目1に記載の改変抗体。

50

(項目 4 4)

上記 MM と上記 CM との間に位置するリンカーペプチドをさらに含む、項目 1 2 に記載の改変抗体。

(項目 4 5)

上記 AB と上記 CM との間に位置するリンカーペプチドをさらに含む、項目 1 2 に記載の改変抗体。

(項目 4 6)

第 1 のリンカーペプチドが上記 AB と上記 CM との間に位置し、第 2 のリンカーペプチドが上記 MM と上記 CM との間に位置する、2 つのリンカーペプチドをさらに含む、項目 1 2 に記載の改変抗体。

10

(項目 4 7)

上記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、および分枝状リンカーからなる群より選択される、項目 4 3 に記載の改変抗体。

(項目 4 8)

上記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、および分枝状リンカーからなる群より選択される、項目 4 4 に記載の改変抗体。

(項目 4 9)

上記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、および分枝状リンカーからなる群より選択される、項目 4 5 に記載の改変抗体。

(項目 5 0)

上記リンカーが、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、および分枝状リンカーからなる群より選択される、項目 4 6 に記載の改変抗体。

20

(項目 5 1)

検出可能な部分をさらに含む、項目 1 に記載の改変抗体。

(項目 5 2)

酵素によって特異的に修飾することができる上記 AB とカップリングした切断可能な部分 (CM) をさらに含む、項目 4 7 に記載の改変抗体。

(項目 5 3)

上記検出可能な部分が診断剤である、項目 4 7 に記載の改変抗体。

(項目 5 4)

上記 AB と結合体化した薬剤をさらに含む、項目 1 に記載の改変抗体。

30

(項目 5 5)

上記薬剤が治療剤である、項目 5 4 に記載の改変抗体。

(項目 5 6)

特異的に切断することができる上記 AB とカップリングした切断可能な部分 (CM) をさらに含む、項目 5 4 に記載の改変抗体。

(項目 5 7)

上記薬剤が抗腫瘍剤である、項目 5 6 に記載の改変抗体。

(項目 5 8)

上記抗体または抗体断片が、表 2 の抗体からなる群より選択される、項目 5 6 に記載の改変抗体。

40

(項目 5 9)

上記 AB がアレムツズマブではない、項目 5 6 に記載の改変抗体。

(項目 6 0)

上記抗体または抗体断片が、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Hu5c8、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目 5 8 に記載の改変抗体。

(項目 6 1)

50

上記標的が表1の標的からなる群より選択される、項目56に記載の改変抗体。

(項目62)

上記標的がCD52ではない、項目56に記載の改変抗体。

(項目63)

上記標的が、EGFR、TNFアルファ、CD11a、CSFR、CTLA-4、EpCAM、VEGF、CD40、CD20、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged1、Jagged2、CD52、MUC1、IGF1R、トランスフェリン、gp130、VCAM-1、CD44、DLL4、またはIL4である、項目61に記載の改変抗体。

(項目64)

上記CMが表3の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目56に記載の改変抗体。

(項目65)

上記CMが、レグマイン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である、項目64に記載の改変抗体。

(項目66)

上記CMを光分解によって切断することができる、項目56に記載の改変抗体。

(項目67)

上記薬剤が上記ABの炭水化物部分と結合体化している、項目54に記載の改変抗体。

(項目68)

上記炭水化物部分が上記ABの抗原結合領域の外に配置されている、項目67に記載の改変抗体。

(項目69)

上記薬剤が上記ABのスルフヒドリル基と結合体化している、項目54に記載の改変抗体。

(項目70)

生物に投与した場合に、上記組成物の血清半減期が少なくとも5日間である、項目12に記載の改変抗体。

(項目71)

上記MMのコンセンサス配列が、CISPRGC、C(N/P)H(HVF)(Y/T)(F/W/T/L)(Y/G/T/S)(T/S/Y/H)CGCISPRGCG、 $\times \times \times Y Q C L \times \times \times \times \times \times$ 、 $\times \times Q P \times P P R V \times \times$ 、 $\times \times P G F P Y C \times \times \times \times \times$ 、 $\times \times \times Q \times \times P W P P$ 、 $\times \times G \times C Y T I L E \times \times C \times \times \times R$ 、 $\times \times \times C Y \times I \times E \times$
 $\times C \times \times \times \times$ 、 $\times \times \times C Y \times I \times E \times W C \times \times \times \times \times$ 、 $\times \times \times C C \times \times Y \times I \times \times C C \times \times \times$ 、または $\times \times \times \times \times Y \times I L E \times \times \times \times \times$ である、項目1に記載の改変抗体。

(項目72)

上記コンセンサス配列が、抗VEGF抗体、抗EFGFR抗体、または抗CTLA-4抗体との結合に特異的である、項目57に記載の改変抗体。

(項目73)

その標的と特異的に結合することができ、マスキング部分(MM)とカップリングした、抗体または抗体断片(AB)を含む改変抗体であって、上記MMと上記ABとのカップリングにより、標的置換アッセイを用いて*in vitro*でアッセイした場合に、上記ABが上記標的と結合する能力が、上記MMとカップリングしていない上記ABが上記標的と結合する能力と比較して少なくとも90%低下する、改変抗体。

(項目74)

上記ABと上記標的との結合が少なくとも12時間の間低下される、項目73に記載の改変抗体。

(項目75)

上記ABと上記標的との結合が少なくとも24時間の間低下される、項目73に記載の

10

20

30

40

50

改変抗体。

(項目76)

上記ABと上記標的との結合が少なくとも72時間の間低下される、項目73に記載の改変抗体。

(項目77)

上記標的に対する上記MMとカップリングした上記ABの解離定数(K_d)が上記標的に対する上記MMとカップリングしていない上記ABの K_d よりも少なくとも100倍高い、項目73に記載の改変抗体。

(項目78)

上記ABに対する上記MMの解離定数(K_d)が上記標的に対する上記ABの K_d よりも少なくとも100倍高い、項目73に記載の改変抗体。

10

(項目79)

上記ABに対する上記MMの K_d が10nM未満である、項目78に記載の改変抗体。

(項目80)

上記ABに対する上記MMの K_d が5nM未満である、項目78に記載の改変抗体。

(項目81)

上記ABに対する上記MMの K_d が約1nMである、項目78に記載の改変抗体。

(項目82)

上記ABと上記MMとの間にリンカーをさらに含む、項目73に記載の改変抗体。

(項目83)

上記リンカーが切断可能な部分(CM)を含む、項目82に記載の改変抗体。

20

(項目84)

上記MMが上記ABの抗原結合ドメインと特異的に結合することができる、項目73に記載の改変抗体。

(項目85)

上記CMを、酵素によって少なくとも $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ の速度で特異的に切断することができる、項目83に記載の改変抗体。

(項目86)

上記CMを、酵素によって少なくとも $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}$ の速度で特異的に切断することができる、項目83に記載の改変抗体。

30

(項目87)

上記CMを、酵素によって少なくとも $10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}$ の速度で特異的に切断することができる、項目83に記載の改変抗体。

(項目88)

上記CMを還元剤によって切断することができる、項目83に記載の改変抗体。

(項目89)

上記CMを光分解によって切断することができる、項目83に記載の改変抗体。

(項目90)

上記抗体断片が、Fab'断片、F(ab')₂断片、scFv、scAB、dAb、単ドメイン重鎖抗体、および単ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される、項目73に記載の改変抗体。

40

(項目91)

上記ABが表2の抗体からなる群より選択される、項目73に記載の改変抗体。

(項目92)

上記ABが、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アダカツムマブ、Hu5c8、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目91に記載の改変抗体。

(項目93)

上記標的が表1の標的からなる群より選択される、項目73に記載の改変抗体。

50

(項目94)

上記標的が、EGFR、TNFアルファ、CD11a、CSFR、CTLA-4、EPCAM、VEGF、CD40、CD20、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged1、Jagged2、CD52、MUC1、IGF1R、トランスフェリン、gp130、VCAM-1、CD44、DLL4、またはIL4である、項目93に記載の改変抗体。

(項目95)

上記ABがアレムツズマブではない、項目73に記載の改変抗体。

(項目96)

上記標的がCD52ではない、項目73に記載の改変抗体。

10

(項目97)

上記CMが表3の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目83に記載の改変抗体。

(項目98)

上記CMが、レグマイン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である、項目97に記載の改変抗体。

(項目99)

酵素によって特異的に修飾することができる第2の切断可能な部分(CM)とさらにカップリングしている、項目83に記載の改変抗体。

20

(項目100)

上記第2のCMが、レグマイン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である、項目99に記載の改変抗体。

(項目101)

上記MMが、上記ABの天然の結合パートナーに対して50%より高いアミノ酸配列類似性を含まない、項目73に記載の改変抗体。

(項目102)

検出可能な部分をさらに含む、項目73に記載の改変抗体。

(項目103)

上記ABと結合体化した薬剤をさらに含む、項目73に記載の改変抗体。

30

(項目104)

(a) その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片(AB)と、
 (b) 上記ABとその標的との特異的結合を阻害することができる、上記ABとカップリングしたマスキング部分(MM)と、
 (c) 酵素によって特異的に切断することができる上記ABとカップリングした切断可能な部分(CM)と
 を含む活性化可能な抗体(AA)であって、
 上記AAが上記CMを切断するために十分な酵素活性の存在下でない場合に、上記MMが、上記AAが上記CMを切断するために十分な酵素活性の存在下にあつて上記MMが上記ABとその標的との特異的結合を阻害しない場合と比較して、上記ABとその標的との特異的結合を少なくとも90%低下させる、活性化可能な抗体(AA)。

40

(項目105)

上記ABとその標的との結合が少なくとも12時間の間低下される、項目104に記載のAA。

(項目106)

上記ABとその標的との結合が少なくとも24時間の間低下される、項目104に記載のAA。

(項目107)

上記ABとその標的との結合が少なくとも72時間の間低下される、項目104に記載

50

の A A。

(項目 108)

上記標的に対する上記 MM および CM とカップリングした上記 AB の解離定数 (K_d) が、上記標的に対する上記 MM および CM とカップリングしていない上記 AB の K_d よりも少なくとも 100 倍高い、項目 104 に記載の A A。

(項目 109)

上記 AB に対する上記 MM の解離定数 (K_d) が上記標的に対する上記 AB の K_d よりも少なくとも 100 倍高い、項目 104 に記載の A A。

(項目 110)

上記 AB に対する上記 MM の K_d が 10 nM 未満である、項目 109 に記載の改変抗体 10

(項目 111)

上記 AB に対する上記 MM の K_d が 5 nM 未満である、項目 109 に記載の改変抗体。

(項目 112)

上記 AB に対する上記 MM の K_d が約 1 nM である、項目 109 に記載の改変抗体。

(項目 113)

上記 MM が上記 AB の抗原結合ドメインと特異的に結合することができる、項目 104 に記載の A A。

(項目 114)

上記 CM を、酵素によって少なくとも約 $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の速度で特異的に切断 20

(項目 115)

上記 CM を、酵素によって少なくとも $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}$ の速度で特異的に還元することができる、項目 104 に記載の A A。

(項目 116)

上記 CM を、酵素によって少なくとも $10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}$ の速度で特異的に還元することができる、項目 104 に記載の A A。

(項目 117)

上記抗体断片が、Fab' 断片、F(ab')₂ 断片、scFv、scAB、dAb、 30
単ドメイン重鎖抗体、および単ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される、項目 104 に記載の A A。

(項目 118)

上記 AB が表 2 の抗体からなる群より選択される、項目 104 に記載の A A。

(項目 119)

上記 AB が、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Hu5c8、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目 118 に記載の A A。

(項目 120)

上記標的が表 1 の標的からなる群より選択される、項目 104 に記載の A A。 40

(項目 121)

上記標的が、EGFR、TNFアルファ、CD11a、CSFR、CTLA-4、EPCAM、VEGF、CD40、CD20、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged1、Jagged2、CD52、MUC1、IGF1R、トランスフェリン、gp130、VCAM-1、CD44、DLL4、またはIL4である、項目 120 に記載の A A。

(項目 122)

上記 AB がアレムツズマブではない、項目 104 に記載の A A。

(項目 123)

上記標的が CD52 ではない、項目 104 に記載の A A。 50

(項目124)

上記CMが表3の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目104に記載のAA。

(項目125)

上記CMが、レグミン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である、項目124に記載のAA。

(項目126)

酵素によって特異的に修飾することができる第2の切断可能な部分(CM)とさらにカップリングしている、項目104に記載のAA。

10

(項目127)

上記第2のCMが、レグミン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である、項目126に記載のAA。

(項目128)

上記CMが上記MM内に位置する、項目104に記載のAA。

(項目129)

上記MMが、上記ABの天然の結合パートナーに対して50%より高いアミノ酸配列類似性を含まない、項目104に記載のAA。

(項目130)

上記MMと上記CMとの間に位置するリンカーペプチドをさらに含む、項目104に記載のAA。

20

(項目131)

上記ABと上記CMとの間に位置するリンカーペプチドをさらに含む、項目104に記載のAA。

(項目132)

検出可能な部分をさらに含む、項目104に記載のAA。

(項目133)

上記ABと結合体化した薬剤をさらに含む、項目104に記載のAA。

(項目134)

(a)それぞれがその標的と特異的に結合することができる、2つの抗体または抗体断片(AB1およびAB2)と、

(b)AB1およびAB2とその標的との特異的結合を阻害することができる、AB1またはAB2のどちらかとカップリングした少なくとも1つのマスキング部分(MM)と、

(c)酵素によって特異的に切断されて、AAC組成物を活性化することができる、AB1またはAB2のどちらかとカップリングした少なくとも1つの切断可能な部分(CM)と

を含む活性化可能な抗体複合体(AAC)であって、

上記AACが切断されていない状態である場合、上記MMはAB1およびAB2とその標的との特異的結合を阻害し、上記AACが切断された状態である場合、上記MMはAB1およびAB2とその標的との特異的結合を阻害しない、活性化可能な抗体複合体(AAC)。

40

(項目135)

上記複合体が二重特異的である、項目134に記載の組成物。

(項目136)

AB1およびAB2が同じ標的上の同じエピトープと結合する、項目134に記載の組成物。

(項目137)

AB1およびAB2が同じ標的上の異なるエピトープと結合する、項目134に記載の

50

組成物。

(項目138)

AB1およびAB2が異なる標的上の異なるエピトープと結合する、項目134に記載の組成物。

(項目139)

上記CMを、酵素によって少なくとも約 $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の速度で特異的に切断することができる、項目134に記載の組成物。

(項目140)

上記抗体断片が、Fab'断片、F(ab')₂断片、scFv、scAB、dAb、単ドメイン重鎖抗体、および単ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される、項目134に記載の組成物。

10

(項目141)

AB1および/またはAB2が、表2の抗体からなる群より選択される、項目134に記載の組成物。

(項目142)

AB1および/またはAB2が、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Hu5c8、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目134に記載の組成物。

20

(項目143)

上記標的が表1の標的からなる群より選択される、項目134に記載の組成物。

(項目144)

AB1および/またはAB2が、EGFR、TNFアルファ、CD11a、CSFR、CTLA-4、EPCAM、VEGF、CD40、CD20、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged1、Jagged2、CD52、MUC1、IGF1R、トランスフェリン、gp130、VCAM-1、CD44、DLL4、またはIL4である、項目134に記載の組成物。

(項目145)

AB1およびAB2が、それぞれ、EGFRおよびVEGF、Notch受容体およびEGFR、JaggedリガンドおよびEGFRまたはcMETおよびVEGFと結合することができる、項目134に記載の組成物。

30

(項目146)

上記CMが表3の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目134に記載の組成物。

(項目147)

上記CMが、レグマイン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である、項目134に記載の組成物。

(項目148)

酵素によって特異的に切断することができる第2の切断可能な部分(CM)とさらにカップリングしている、項目134に記載の組成物。

40

(項目149)

上記第2のCMが、レグマイン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である、項目148に記載の組成物。

(項目150)

上記MMが、上記ABの天然の結合パートナーに対して50%より高いアミノ酸配列類似性を含まない、項目134に記載の組成物。

(項目151)

50

検出可能な部分をさらに含む、項目 1 3 4 に記載の組成物。

(項目 1 5 2)

上記 A B と結合体化した薬剤をさらに含む、項目 1 3 4 に記載の組成物。

(項目 1 5 3)

被験体における状態を処置または診断する方法であって、

(a) その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片 (A B) と、

(b) 上記 A B とその標的との特異的結合を阻害することができる、上記 A B とカップリングしたマスキング部分 (M M) と、

(c) 酵素によって特異的に切断することができる上記 A B とカップリングした切断可能な部分 (C M) と

10

を含む組成物を上記被験体に投与することを含み、

上記被験体に投与した際、上記 A A が上記 C M を切断するために十分な酵素活性の存在下でない場合に、上記 M M が、上記 A A が上記 C M を切断するために十分な酵素活性の存在下にあつて上記 M M が上記 A B とその標的との特異的結合を阻害しない場合と比較して、上記 A B とその標的との特異的結合を少なくとも 9 0 % 低下させる、方法。

(項目 1 5 4)

上記 A B が、F a b ' 断片、F (a b ') 2 断片、s c F v、s c A B、d A b、単一ドメイン重鎖抗体、および単一ドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される、項目 1 5 3 に記載の方法。

(項目 1 5 5)

上記状態が癌である、項目 1 5 3 に記載の方法。

20

(項目 1 5 6)

上記 M M が上記 A B の天然の結合パートナーではない、項目 1 5 3 に記載の方法。

(項目 1 5 7)

上記 A B が表 2 の抗体からなる群より選択される、項目 1 5 3 に記載の方法。

(項目 1 5 8)

上記 A B が、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Hu 5 c 8、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ペバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目 1 5 7 に記載の方法。

30

(項目 1 5 9)

上記標的が表 1 の標的の群から選択される、項目 1 5 3 に記載の方法。

(項目 1 6 0)

上記標的が、E G F R、T N F アルファ、C D 1 1 a、C S F R、C T L A - 4、E p C A M、V E G F、C D 4 0、C D 2 0、N o t c h 1、N o t c h 2、N o t c h 3、N o t c h 4、J a g g e d 1、J a g g e d 2、C D 5 2、M U C 1、I G F 1 R、トランスフェリン、g p 1 3 0、V C A M - 1、C D 4 4、D L L 4、または I L 4 である、項目 1 5 9 に記載の方法。

(項目 1 6 1)

上記 A B がアレムツズマブではない、項目 1 5 3 に記載の方法。

40

(項目 1 6 2)

上記標的が C D 5 2 ではない、項目 1 5 3 に記載の方法。

(項目 1 6 3)

上記 C M が表 3 の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目 1 5 3 に記載の方法。

(項目 1 6 4)

上記 C M が、レグマイン、プラスミン、T M P R S S - 3 / 4、M M P - 9、M T 1 - M M P、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ - セクレターゼ、u P A、または P S A の基質である、項目 1 6 3 に記載の方法。

(項目 1 6 5)

50

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

(項目166)

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

(項目167)

上記ABが、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Hu5c8、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目165に記載の方法。

(項目168)

上記CMが、レグマイン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である、項目165に記載の方法。

(項目169)

活性化可能な抗体(AA)組成物を作製する方法であって、

(a) その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片(AB)を提供するステップと、

(b) 上記ABとその標的との特異的結合を阻害することができるマスキング部分(MM)を、上記ABとカップリングさせるステップと、

(c) 酵素によって特異的に切断することができる切断可能な部分(CM)を、上記ABとカップリングさせるステップとを含み、

上記標的に対する上記MMとカップリングした上記ABの解離定数(K_d)が上記標的に対する上記MMとカップリングしていない上記ABの K_d よりも少なくとも100倍高い、方法。

(項目170)

上記ABが、表2の抗体からなる群より選択される抗体であるか、またはそれに由来する、項目166に記載の方法。

(項目171)

上記ABが、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Hu5c8、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブであるか、あるいはそれに由来する、項目166に記載の方法。

(項目172)

上記ABがアレムツズマブではない、項目166に記載の方法。

(項目173)

上記標的がCD52ではない、項目166に記載の方法。

(項目174)

上記CMが表3の酵素からなる群より選択される酵素の基質である、項目166に記載の方法。

(項目175)

上記CMが、レグマイン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAの基質である、項目166に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目176)

候補ペプチドをスクリーニングして抗体または抗体断片(A B)と結合することができるマスキング部分(M M)ペプチドを同定する方法であって、

(a)それぞれのペプチド足場が、

(i)膜貫通タンパク質(T M)、および

(ii)候補ペプチド

を含む、ペプチド足場のライブラリを提供するステップと、

(b) A Bを上記ライブラリと接触させるステップと、

(c)上記A Bと結合することができる少なくとも1つの候補ペプチドを同定するステップと、

(d)上記A Bに対する上記候補ペプチドの解離定数(K_d)が1~10 n Mであるかどうかを決定するステップと

を含む、方法。

(項目177)

上記ライブラリがウイルス、細胞または孢子を含む、項目176に記載の方法。

(項目178)

上記ライブラリがE . c o l iを含む、項目176に記載の方法。

(項目179)

上記ペプチド足場が検出可能な部分をさらに含む、項目176に記載の方法。

(項目180)

候補ペプチドをスクリーニングして、最適なマスキング効率で抗体または抗体断片(A B)をマスキングすることができるマスキング部分(M M)ペプチドを同定する方法であって、

(a)それぞれが候補ペプチドとカップリングした、標的と特異的に結合することができる複数のA Bを含むライブラリを提供するステップと、

(b)それぞれのライブラリメンバーを上記標的と共にインキュベートするステップと

(c)上記標的に対するそれぞれのライブラリメンバーの結合親和性を、上記標的に対する候補ペプチドとカップリングしていないそれぞれのA Bの結合親和性と比較するステップと

を含む、方法。

(項目181)

ステップcにおいて、最適な結合効率が、上記標的に対するライブラリメンバーの結合親和性が、上記標的に対する改変していない上記A Bの結合親和性と比較して10%である場合である、項目180に記載の方法。

(項目182)

上記A Bが同じである、項目180に記載の方法。

(項目183)

バイオアベイラビリティが向上した抗体治療剤であって、第1の組織中での上記抗体治療剤とその標的との結合の親和性が、第2の組織中での上記抗体治療剤とその標的との結合と比較した場合により低い、抗体治療剤。

(項目184)

上記標的が、E G F R、T N Fアルファ、C D 1 1 a、C S F R、C T L A - 4、E p C A M、V E G F、C D 4 0、C D 2 0、N o t c h 1、N o t c h 2、N o t c h 3、N o t c h 4、J a g g e d 1、J a g g e d 2、C D 5 2、M U C 1、I G F 1 R、トランスフェリン、g p 1 3 0、V C A M - 1、C D 4 4、D L L 4、またはI L 4である、項目183に記載の抗体治療剤。

(項目185)

上記第1の組織が健康な組織であり、上記第2の組織が罹患した組織である、項目183に記載の抗体治療剤。

10

20

30

40

50

(項目186)

上記第1の組織が早期腫瘍であり、上記第2の組織が末期腫瘍である、項目183に記載の抗体治療剤。

(項目187)

上記第1の組織が良性腫瘍であり、上記第2の組織が悪性腫瘍である、項目183に記載の抗体治療剤。

(項目188)

上記第1の組織および第2の組織が空間的に分離されている、項目183に記載の抗体治療剤。

(項目189)

上記第1の組織が上皮組織であり、上記第2の組織が、乳房、頭部、頸部、肺、膵臓、神経系、肝臓、前立腺、泌尿生殖器、もしくは子宮頸部の組織である、項目183に記載の抗体治療剤。

(項目190)

薬剤とさらにカップリングしている、項目183に記載の抗体治療剤。

(項目191)

上記薬剤が抗腫瘍剤である、項目190に記載の抗体治療剤。

(項目192)

(a) その標的と特異的に結合することができる抗体または抗体断片(AB)と、
(b) 薬学的に許容される賦形剤と
を含む医薬組成物であって、第1の組織中の上記標的に対する上記抗体または抗体断片の親和性が、第2の組織中の上記標的に対する上記抗体または抗体断片の親和性よりも低い、医薬組成物。

(項目193)

上記第1の組織中での親和性が上記第2の組織中での親和性の10~1,000分の1である、項目192に記載の組成物。

(項目194)

上記ABが、上記ABとその標的との結合を還元することができるマスキング部分(MM)および酵素によって特異的に切断することができる切断可能な部分(CM)とカップリングしている、項目192に記載の組成物。

(項目195)

上記標的が、EGFR、TNFアルファ、CD11a、CSFR、CTLA-4、EpCAM、VEGF、CD40、CD20、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged1、Jagged2、CD52、MUC1、IGF1R、トランスフェリン、gp130、VCAM-1、CD44、DLL4、またはIL4である、項目192に記載の組成物。

(項目196)

上記第1の組織が健康な組織であり、上記第2の組織が罹患した組織である、項目192に記載の組成物。

(項目197)

上記第1の組織が早期腫瘍であり、上記第2の組織が末期腫瘍である、項目192に記載の組成物。

(項目198)

上記第1の組織が良性腫瘍であり、上記第2の組織が悪性腫瘍である、項目192に記載の組成物。

(項目199)

上記第1の組織および第2の組織が空間的に分離されている、項目192に記載の組成物。

(項目200)

上記第1の組織が上皮組織であり、上記第2の組織が、乳房、頭部、頸部、肺、膵臓、

10

20

30

40

50

神経系、肝臓、前立腺、泌尿生殖器、もしくは子宮頸部の組織である、項目 192 に記載の組成物。

(項目 201)

上記 CM が、レグマイン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、または PSA の基質である、項目 194 に記載の組成物。

(項目 202)

上記抗体または抗体断片が、セツキシマブ、パニツムマブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、エファリズマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、アデカツムマブ、Hu5c8、アレムツズマブ、ラニビズマブ、トシツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、インフリキシマブ、ベバシズマブ、またはフィギツムマブである、項目 192 に記載の組成物。

10

(項目 203)

上記 AB とカップリングした薬剤をさらに含む、項目 192 に記載の組成物。

(項目 204)

上記薬剤が抗腫瘍剤である、項目 203 に記載の組成物。

(項目 205)

マスクング部分 (MM) とカップリングした、レグマインで活性化可能な抗体または抗体断片 (AB) を含む組成物。

(項目 206)

マスクング部分 (MM) とカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗体または抗体断片 (AB) を含む組成物。

20

(項目 207)

マスクング部分 (MM) とカップリングした、カスパーゼで活性化可能な抗体または抗体断片 (AB) を含む組成物。

(項目 208)

マスクング部分 (MM) とカップリングした、TMPRSS-3/4 で活性化可能な抗体または抗体断片 (AB) を含む組成物。

(項目 209)

マスクング部分 (MM) とカップリングした、PSA で活性化可能な抗体または抗体断片 (AB) を含む組成物。

30

(項目 210)

マスクング部分 (MM) とカップリングした、カテプシンで活性化可能な抗体または抗体断片 (AB) を含む組成物。

(項目 211)

マスクング部分 (MM) とカップリングした、ヒト好中球エラスターゼで活性化可能な抗体または抗体断片 (AB) を含む組成物。

(項目 212)

マスクング部分 (MM) とカップリングした、ベータ-セクレターゼで活性化可能な抗体または抗体断片 (AB) を含む組成物。

40

(項目 213)

マスクング部分 (MM) とカップリングした、uPA で活性化可能な抗体または抗体断片 (AB) を含む組成物。

(項目 214)

マスクング部分 (MM) とカップリングした、TMPRSS-3/4 で活性化可能な抗体または抗体断片 (AB) を含む組成物。

(項目 215)

マスクング部分 (MM) とカップリングした、MT1-MMP で活性化可能な抗体または抗体断片 (AB) を含む組成物。

(項目 216)

50

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なEGFR抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目217）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なTNFアルファ抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目218）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なCD11a抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目219）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なCSFR抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

10

（項目220）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なCTLA-4抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目221）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なEPCAM抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目222）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なCD40L抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

20

（項目223）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なNotch1抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目224）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なNotch3抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目225）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なJagged1抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目226）

30

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なJagged2抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目227）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なセツキシマブ抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目228）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なvectrix抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目229）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なインフリキシマブ抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

40

（項目230）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なアダリムマブ抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目231）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なエファリズマブ抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

（項目232）

マスキング部分（MM）とカップリングした、活性化可能なイピリムマブ抗体または抗体断片（AB）を含む組成物。

50

(項目233)

マスキング部分(MM)とカップリングした、活性化可能なトレメリムマブ抗体または抗体断片(AB)を含む組成物。

(項目234)

マスキング部分(MM)とカップリングした、活性化可能なアデカツムマブ抗体または抗体断片(AB)を含む組成物。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】図1は、抗体(AB)、マスキング部分(MM)、および切断可能な部分(CM)を含有する、プロテアーゼで活性化されるAAを示す。

10

【図2】図2は、*in vivo*の例示的なAAの活性を示す。パネルAは、AAが結合することができず、副作用が最小である健康な組織を示す。パネルBは、AAが標的に結合し効果的となることを可能にする、疾患に特異的なプロテアーゼ/還元剤によってAAが活性化されている罹患した組織を示す。

【図3】図3は、MMについてスクリーニングすること、CMについてスクリーニングすること、MM、CM、およびABを組み立てること、組み立てられた構築物を発現および精製すること、ならびに組み立てられた構築物を活性および毒性について*in vitro*および*in vivo*でアッセイすることを含む、プロテアーゼで活性化されるAAを製造するプロセスを示す。

【図4】図4は、MMP-9で切断可能なマスキングされた例示的な抗VEGF s c F v アミノ酸配列を提供する。

20

【図5】図5は、MM306および314を有するMBP:抗VEGF s c F v AAのMMP-9による活性化を示すELISAデータを提供する。試料をTEVで処置してMBP融合パートナーを除去し、続いてMMP-9消化によって活性化する。

【図6】図6は、306MMを有する抗VEGF s c F v His構築物のMMP-9依存性VEGF結合を示すELISAデータを提供する。

【図7】図7は、HEK細胞上清からのMM306および314を有する抗VEGF s c F v - F c AAのMMP-9依存性VEGF結合を示すELISAデータを提供する。

【図8】図8は、プロテインAカラムを使用して精製されたMM306および314を有する抗VEGF s c F v - F c AA構築物のMMP-9-依存性VEGF結合を示すELISAデータを提供する。

30

【図9】図9は、600nMを超える親和性で抗VEGF抗体に結合する306MMが、VEGFとの結合を効率的に妨げないことを示す。

【図10】図10は、両方の方向のs c F v構築物、V_HV_LおよびV_LV_Hを生成するためにSOE-PCRを介して接続された抗CTLA4軽鎖および重鎖を示す。

【図11】図11は、抗CTLA4 s c F v V_HV_LおよびV_LV_H構築物のN末端にMMクローニング用の部位、CM切断配列、GGS2リンカーを付加するためのPCRの使用を示す。

【図12】図12は、MMP-9によるAAの活性化を示す。

【図13】図13は、CMを切断してMMを除去すると、ABの結合が回復することを示す。

40

【図14】図14は、改変されていない抗体と区別できない抗体結合をもたらすプロテアーゼによるAAの活性化を示す。

【図15】図15は、VEGFとの特定の結合親和性を有するABを含むAAが阻害され、活性化されたAAはピコモルの親和性でVEGFと結合することを示す。

【図16】図16は、VEGFとの特定の結合親和性を有するABを含むAAがHUVEC増殖を阻害することを示す。

【図17】図17は、培養された腫瘍細胞は、VEGFとの特定の結合親和性を有するABを含むAAの強い*in situ*活性化を示すことを示す。

【図18】図18は、AAが正常および癌患者の血漿において不活性であることを示す。

50

【図19】図19は、マウスおよびヒトの両方のCTLA4に対する抗CTLA4 s c F vの結合を示す。

【図20】図20は、抗体(A Bを含有する)、マスキング部分(M M)、切断可能な部分(C M)、および結合体化した薬剤を含有する、プロテアーゼで活性化されるA A C Jを示す。C Mが切断され、脱マスキングされると、結合体化したA Bは遊離する。

【図21】図21は、e C P X 3 . 0クローンJ S 3 0 6、J S 1 8 2 5、J S 1 8 2 7、およびJ S 1 8 2 9の結合を3つの異なる濃度のD y L i g h t 標識抗V E G FでF A C Sにおいて分析したことを示す。親和性成熟ペプチドの3つすべてがJ S 3 0 6よりも少なくとも10倍高い親和性を示した。

【図22】図22は、E G F R M Mの一部の親和性成熟のプロセスを示す。

10

【図23】図23は、M Mの3 6 9 0、3 9 5 4および3 9 5 7に対するC 2 2 5 F a b結合の細胞上親和性測定の結合カーブを示す。M M 3 9 5 4および3 9 5 7は、3 6 9 0よりも少なくとも100倍高い親和性を示した。

【図24】図24は、標的置換アッセイおよび親の抗体結合のパーセントとしての平衡結合の程度を表す。

【図25】図25は、u P A対照と違って、基質S M 1 6、K K 1 2 0 3、1 2 0 4および1 2 1 4が、K L K 5、K L K 7およびプラスミンによる切断に対して抵抗性を示すことを示す。

【図26】図26は、最適化されていない基質と違って、最適化された基質P l a s 1 2 3 7、P l a s 1 2 9およびP l a s 1 2 5 4は、K L K 5、K L K 7による切断に対して抵抗性を示すことを示す。

20

【図27】図27のパネルAは、5 m g / m Lのレグマインによる処理後の、レグマイン基質A A N LおよびP T N Lを含有するS c F v A Aの活性化を示す。パネルBは、レグマイン基質P N T Lを含有する抗V E G F I g G A Aの活性化を示す。

【図28】図28は、レグマインで活性化されるA Aにおけるそれぞれの時点での全A Aに対する活性化されたA Aの比を示す。プラスミンで活性化されるA Aは7日目ではほぼ完全に活性化されるが、レグマインで活性化可能なA Aは両方とも最小限にしか活性化されない。注射後7日目までに血清から単離されたレグマインで活性化可能なA Aは、マスキングされたままである。(n = 4)。

【図29】図29は、マスキングされた単鎖F v - F c融合プロ抗体が血清半減期の増大を示すことを示す。

30

【0069】

【図30】図30は、10日間にわたる健康なマウスのs c F v - F c血清濃度を示す。A A濃度は、投与後7日目まで安定なままであったが、親のs c F v - F c濃度は3日後に減少し、10日目はほとんど検出不可能であった。

【図31】図31は、A A s c F v - F c濃度が腫瘍担持マウスにおける親のs c F v - F cと比較して血清中で上昇し、より長く持続することを示す。最初のA A投与のより高い割合が、3日目(B)ならびに3日目および7日目(A)に血清において検出された。

【図32】図32は、腫瘍担持マウスの多回投与試験においてA A s c F v - F c sがより高い濃度で持続することを示す。A Aは、試験全体にわたって親よりも有意に高い血清濃度を維持した。

40

【図33】図33は、A Aが、M Mで改変されていない親の抗体と比較して正常マウスの血清において高レベルで持続することを示す。

【図34】図34は、1種または複数の抗体またはその断片(この図ではA BはA B Dと称す)、マスキング部分(M M)、および切断可能な部分(C M)を含有するプロテアーゼで活性化される活性化可能な抗体複合体(A A C)を示し、A B D 1およびA B D 2は第1および第2のA B任意の呼称である。このような実施形態では、M M 1およびM M 2は、それぞれA B D 1およびA B D 2を含有するドメインに結合し、切断されていない二重標的結合A A Cに対する標的結合を妨害するためのマスキング部分として働く。A Bが

50

結合することができる標的は、同じ標的でも異なる標的でもよく、または同じ標的の異なる結合部位でもよい。一部の実施形態（図1A、1D、1F）では、反対の分子におけるABD2を含有するドメインに対するMM1の結合は、ABD1およびABD2のマスキング部分として働くことができる複合体を形成する。

【図35】図35は、切断されていない状態では両方のABによる標的結合が弱められ、複合体が分解するのを可能にする、CMを切断する薬剤の存在下では標的結合が増大するような交差マスキングが起こるAACを示す。この図では、AB1およびAB2はそれぞれABD1およびABD2と称する。

【図36】図36は、切断されていない状態ではABD2（AB2）による標的結合が弱められ、複合体が分解するのを可能にする、CMを切断する薬剤の存在下ではABD2（AB2）による標的結合が増大するような、MM1とABD1（AB1）の共有結合によって形成されるAACを示す。この図では、AB1およびAB2はそれぞれABD1およびABD2と称する。

【発明を実施するための形態】

【0070】

本開示は、治療学および診断学に有用な改変した抗体組成物を提供する。本明細書中に記載の組成物は、より高い体内分布および向上したバイオアベイラビリティを可能にする。

【0071】

改変した活性化可能な抗体

本明細書中に記載の改変抗体組成物は、標的と特異的に結合することができる少なくとも抗体またはその抗体断片（本開示全体にわたってABと総称する）を含有し、ABはマスキング部分（MM）によって修飾されている。

【0072】

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

【0073】

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

10

20

30

40

50

00~1, 000, 000、10, 000~10, 000, 000、100, 000~1, 000, 000、もしくは100, 000~10, 000, 000分の1である場合がある。

【0074】

ABに対するMMの解離定数 (K_d) は、一般に標的に対するABの K_d よりも高い。ABに対するMMの K_d は、標的に対するABの K_d よりも少なくとも5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000またはさらには10,000,000倍高い場合がある。逆に、ABに対するMMの結合親和性は、一般に標的に対するABの結合親和性よりも低い。ABに対するMMの結合親和性は、標的に対するABの結合親和性の少なくとも5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、100,000、1,000,000またはさらには10,000,000分の1である場合がある。

10

【0075】

ABがMMで修飾されており、標的の存在下にある場合、ABとその標的との特異的結合は、標的とMMで修飾されていないABとの特異的結合または親ABとの特異的結合と比較して、低下または阻害されている場合がある。本明細書中に記載のように *in vivo* または標的置換 *in vitro* の免疫吸着アッセイで測定した際に、標的とMMで修飾されていないABとの結合または親ABとの結合と比較した場合、MMで修飾した場合に標的と結合するABの能力は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらには100%、少なくとも2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96時間、または5、10、15、30、45、60、90、120、150、180日間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月間もしくはそれより長くの間、低下する場合がある。

20

【0076】

MMはABと標的との結合を阻害することができる。MMは、ABの抗原結合ドメインと結合してABとその標的との結合を阻害することができる。MMは、ABと標的との結合を立体的に阻害することができる。MMは、ABとその標的との結合をアロステリックに阻害することができる。ABが修飾されているまたはMMとカップリングしており、標的の存在下にあるこれらの実施形態では、本明細書中に記載のように *in vivo* または標的置換 *in vitro* の免疫吸着アッセイで測定した際に、ABと標的との結合が存在しないもしくは結合が実質的に存在しない、または、MMで修飾されていないAB、親AB、またはMMとカップリングしていないABと標的との結合と比較して、.001%、.01%、.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、もしくは50%以下のABと標的との結合のみが、少なくとも2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96時間、または5、10、15、30、45、60、90、120、150、180日間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月間もしくはそれより長くの間存在する。

30

40

【0077】

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

【0078】

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



50

(A B) - (M M)

(M M) - L - (A B)

(A B) - L - (M M)

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

【 0 0 7 9 】

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

【 0 0 8 0 】

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

【 0 0 8 1 】

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

【 0 0 8 2 】

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

10

20

30

40

50

はそれより低い、または5～10、10～100、10～1,000、10～10,000、10～100,000、10～1,000,000、10～1,000,000,000、10～1,000,000,000、10～10,000,000,000、100～1,000,000,000、100～10,000,000,000、100～100,000,000,000、100～1,000,000,000、1,000～10,000,000,000、1,000～100,000,000,000、1,000～1,000,000,000、1000～10,000,000,000、10,000～100,000,000,000、10,000～1,000,000,000,000、100,000～1,000,000,000,000、もしくは100,000～10,000,000,000分の1である場合がある。

【0083】

ABがMMおよびCMで修飾されており、標的の存在下にあるが、修飾剤(たとえば、酵素、プロテアーゼ、還元剤、光)の非存在下にある場合、ABとその標的との特異的結合は、MMおよびCMで修飾されていないABまたは親ABと標的との特異的結合と比較して、低下または阻害されている場合がある。本明細書中に記載のように*in vivo*または標的置換*in vitro*の免疫吸着アッセイで測定した際に、その標的と、親ABとの結合またはMMおよびCMで修飾されていないABとの結合と比較した場合、MMおよびCMで修飾した場合に標的と結合するABの能力は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらには100%、少なくとも2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96時間、または5、10、15、30、45、60、90、120、150、180日間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月間もしくはそれより長くの間、低下する場合がある。

【0084】

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

【0085】

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

【0086】

AAのCMおよびABは、ABが目的の標的の結合部分を表し、CMが被験体内の処置部位で標的と共に共有化しているプロテアーゼの基質を表すように、選択し得る。あるいは、またはそれに加えて、CMは、ジスルフィド結合の還元の結果として切断可能なシステイン-システインジスルフィド結合である。AAは、プロテアーゼで切断可能なCMまたはシステイン-システインジスルフィド結合のうちの少なくとも1つを含有し、一部の実施形態では、両方の種類のCMが含まれる。あるいは、またはさらに、AAには、光

10

20

30

40

50

源によって活性化可能な光解離性基質が含まれることができる。本明細書中に開示する A A は、図 2 に例示するように、たとえば、C M 中の部位を切断することができるプロテアーゼが、処置部位の標的含有組織（たとえば罹患した組織、たとえば治療的処置または診断的処置のため）中で、非処置部位の組織中（たとえば健康な組織中）よりも比較的高いレベルで存在する場合に、特定の使用が見つかる。また、本明細書中に開示する A A は、たとえば、C M 中の部位を還元することができる還元剤が、処置または診断部位の標的含有組織中で、非処置の非診断部位の組織中よりも比較的高いレベルで存在する場合にも、特定の使用が見つかる。また、本明細書中に開示する A A は、たとえば、C M 中の部位を光分解することができる、たとえばレーザーによる光源を処置または診断部位の標的含有組織に導入する場合にも、特定の使用が見つかる。

10

【 0 0 8 7 】

一部の実施形態では、A A は、A B がその標的との結合からマスキングまたは他の様式で阻害されていない場合に、そうでなければ非処置部位での A B の結合の結果もたらされ得る毒性および/または有害な副作用の低下を提供することができる。A A が、ジスルフィド結合の還元を促進する還元剤によって切断可能な C M を含有する場合、そのような A A の A B は、A B の活性化が活用されるように選択してよく、目的の標的は、環境がたとえば非処置部位の環境よりも高い還元潜在性のものであるように、還元剤のレベルが上昇していることによって特徴づけられた所望の処置部位に存在する。

【 0 0 8 8 】

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

20

【 0 0 8 9 】

特定の実施形態では、二重標的結合 A A を本開示中で提供する。そのような二重標的結合 A A は、同じまたは異なる標的と結合し得る 2 つの A B を含有する。具体的な実施形態では、二重標的化 A A は二重特異性抗体または抗体断片を含有する。具体的な例示的な一実施形態では、A A は I L 1 7 A B と I L 2 3 A B を含有する。他の具体的な実施形態では、A A は、I L 1 2 A B と I L 2 3 A B、または E G F R A B と V E G F A B、または I G F 1 R A B と E G F R A B、または c M E T A B と I G F 1 R A B、または E G F R A B と V E G F A B、または N o t c h 受容体 A B と E G F R A B、または J a g g e d リガンド A B と E G F R A B、または c M E T A B と V E G F A B を含有する。

30

【 0 0 9 0 】

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

40

【 0 0 9 1 】

阻害された対阻害されていないコンホメーションで、標的結合に関して所望の動作範囲の切替可能な表現型を示す A A を提供する。一般に、動作範囲とは、(a) 第 1 の条件組下におけるパラメータの最大の検出されたレベル対 (b) 第 2 の条件組下におけるそのパラメータの最小の検出された値の比をいう。たとえば、A A のコンテキストでは、動作範囲とは、(a) A A の C M を切断することができるプロテアーゼの存在下における、標的

50

タンパク質とAAとの結合の最大の検出されたレベル対(b)プロテアーゼの非存在下における、標的タンパク質とAAとの結合の最小の検出されたレベルの比をいう。AAの動作範囲は、AA切断剤(たとえば酵素)処理の平衡解離定数対AA切断剤処理の平衡解離定数の比として計算することができる。AAの動作範囲が大きければ大きいほど、AAの切替可能な表現型がより良好となる。比較的高い動作範囲値(たとえば1より高い)を有するAAは、AAによる標的タンパク質の結合が、AAのCMを切断することができる切断剤(たとえば酵素)の存在下において、切断剤の非存在下よりも高い程度で起こる(たとえば優勢的に起こる)ように、より望ましい切替表現型を示す。

【0092】

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

【0093】

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



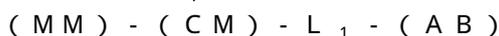
によって表すことができ、MMはマスキング部分であり、CMは切断可能な部分であり、ABは抗体またはその断片である。MMおよびCMは上記式中で明確な構成要素として示すが、本明細書中に開示するすべての例示的な実施形態(式が含まれる)において、MMおよびCMのアミノ酸配列が、たとえばCMが完全にまたは部分的にMM内に含有されるように重なることができることが企図されることに注意されたい。さらに、上記式は、AA要素のN末端またはC末端側に位置し得るさらなるアミノ酸配列を提供する。

【0094】

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

【0095】

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



のうちの1つを含み、MM、CM、およびABは上記定義したとおりであり、 L_1 、 L_2 、および L_3 は、それぞれ独立してかつ任意選択で存在するまたは存在せず、少なくとも1つの柔軟なアミノ酸(たとえばGly)が含まれる、同じまたは異なる柔軟なリンカーであり、シクロが存在する場合は、AAは、AA中の1対のシステインの間にジスルフィド結合が存在することが原因で環状構造の形態である。さらに、上記式は、AA要素のN末端またはC末端側に位置し得るさらなるアミノ酸配列を提供する。式シクロ[$L_1 - (MM) - L_2 - (CM) - L_3 - (AB)$]中、ジスルフィド結合を司っているシステインがAA中に位置して1つまたは2つのテイルを可能にし、それにより、AAがジスルフ

10

20

30

40

50

イド結合された構造（したがってコンホメーションが束縛された状態）にある場合にラッソまたはオメガ構造を生じる場合があることを理解されたい。テイルのアミノ酸配列は、標的受容体と結合してAAの局在化を促進すること、AAの血清半減期を増加させることなどの、AAのさらなる特長を提供することができる。標的化部分（たとえば、標的組織中に存在する細胞の受容体のリガンド）および血清半減期延長部分（たとえば、免疫グロブリン（たとえばIgG）または血清アルブミン（たとえばヒト血清アルブミン（HSA））などの血清タンパク質と結合するポリペプチド。

【0096】

改変した活性化可能な抗体の要素

（a）抗体または抗体断片（ABと総称する）

本発明によれば、任意の抗原またはハプテンに対して向かわせたABを使用し得る。本発明で使用するABは、任意の決定要因、たとえば、腫瘍、細菌、真菌、ウイルス、寄生生物、マイコプラズマ、組織適合性、分化および他の細胞膜抗原、病原体表面抗原、毒素、酵素、アレルゲン、薬物、細胞内標的、ならびに任意の生物活性のある分子に対して向かわせたものであり得る。さらに、異なる抗原決定基に対して反応性のABの組合せを使用し得る。

【0097】

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

【0098】

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

【0099】

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

10

20

30

40

50

【0100】

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

10

【0101】

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

20

【0102】

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

【0103】

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

30

【0104】

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

40

【0105】

例示的な実施形態では、いかなる様式でも限定はしないが、A Bは表1に記載の任意の標的の結合パートナーである。具体的な例示的な実施形態では、A Bは、E G F R、T N Fアルファ、C D 11 a、C S F R、C T L A - 4、E p C A M、V E G F、C D 40、C D 20、N o t c h 1、N o t c h 2、N o t c h 3、N o t c h 4、J a g g e d 1、J a g g e d 2、C D 52、M U C 1、I G F 1 R、トランスフェリン、g p 130、V C A M - 1、C D 44、D L L 4、またはI L 4の結合パートナーである。具体的な実施形態では、A BはC D 52の結合パートナーではない。

【0106】

例示的な実施形態では、いかなる様式でも限定はしないが、A Bの例示的な供給源を表

50

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

【0107】

【表1】

表1:例示的な標的

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

【0108】

10

20

30

【表 2】

表2: ABの例示的な供給源

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

表 2 に記載の A B の一部の例示的な供給源は、参照した A B 供給源のうちの 1 つまたは複数の説明について本明細書中に参考として組み込まれている以下の参考文献中に詳述されている： R e m i c a d e (商 標) (イ ン フ リ キ シ マ ブ) : 米 国 特 許 第 6 , 0 1 5 , 5

10

20

30

40

50

57号、Nagahira K、Fukuda Y、Oyama Y、Kurihara T、Nasu T、Kawashima H、Noguchi C、Oikawa S、Nakanishi T、Humanization of a mouse neutralizing monoclonal antibody against tumor necrosis factor - alpha (TNF - alpha)、J Immunol Methods、1999年1月1日;222巻(1~2号):83~92頁)。Knight DM、Trinh H、Le J、Siegel S、Shealy D、McDonough M、Scallan B、Moore MA、Vilcek J、Daddona P、Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody、Mol Immunol、1993年11月;30巻(16号):1443~53頁。Humira(商標)(アダリムマブ):米国特許第6258562号中の配列。Raptiva(商標)(エファリズマブ):Werther WA、Gonzalez TN、O'Connor SJ、McCabe S、Chan B、Hotaling T、Champe M、Fox JA、Jardieu PM、Berman PW、Presta LG、Humanization of an anti-lymphocyte function-associated antigen (LFA) - 1 monoclonal antibody and reengineering of the humanized antibody for binding to rhesus (LFA) - 1、J Immunol、1996年12月1日;157巻(11号):4986~95頁に記載の配列。Mylotarg(商標)(ゲムツズマブオゾガマイシン):(CO MS、Avdalovic NM、Caron PC、Avdalovic MV、Scheinberg DA、Queen C:Chimeric and humanized antibodies with specificity for the CD33 antigen、J Immunol、148巻:1149頁、1991年に記載の配列)(Caron PC、Schwartz MA、Co MS、Queen C、Finn RD、Graham MC、Divgi CR、Larson SM、Scheinberg DA、Murine and humanized constructs of monoclonal antibody M 195 (anti-CD33) for the therapy of acute myelogenous leukemia、Cancer、1994年2月1日;73巻(補遺3):1049~56頁)。Soliris(商標)(エクリズマブ):_Hillmen P、Young N、Schubert J、Brodsky R、Socie G、Muus P、Roth A、Szer J、Elebute M、Nakamura R、Browne P、Risitano A、Hill A、Schrezenmeier H、Fu C、Maciejewski J、Rollins S、Mojcik C、Rother R、Luzzatto L(2006年)、The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria、N Engl J Med、355巻(12号):1233~43頁。Tysabri(商標)(ナタリズマブ):Leger OJ、Yednock TA、Tanner L、Homer HC、Hines DK、Keen S、Saldanha J、Jones ST、Fritz LC、Bendig MM、Humanization of a mouse antibody against human alpha-4 integrin: a potential therapeutic for the treatment of multiple sclerosis、Hum Antibodies、1997年;8巻(1号):3~16頁に記載の配列。Synagis(商標)(パリビズマブ):Johnson S、Oliver C、Prince GA、Hemming VG、Pfarr DS、Wang SC、Dormitzer M、O'Grady J、

10

20

30

40

50

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

【0109】

(b) マスキング部分 (MM)

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

【0110】

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

【0111】

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

【0112】

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

【0113】

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

【0114】

10

20

30

40

50

MMはABと標的との結合を阻害することができる。MMは、ABの抗原結合ドメインと結合してABとその標的との結合を阻害することができる。MMは、ABと標的との結合を立体的に阻害することができる。MMは、ABとその標的との結合をアロステリックに阻害することができる。ABが修飾されているまたはMMとカップリングしており、標的の存在下にあるこれらの実施形態では、本明細書中に記載のように *in vivo* または標的置換 *in vitro* の免疫吸着アッセイで測定した際に、ABと標的との結合が存在しないもしくは結合が実質的に存在しない、または、標的とMMで修飾されていないABとの結合、親ABとの結合、またはMMとカップリングしていないABとの結合と比較して、.001%、.01%、.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、もしくは50%以下のABと標的との結合のみが、少なくとも2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96時間、または5、10、15、30、45、60、90、120、150、180日間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月間もしくはそれより長くの間存在する。

10

【0115】

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

20

【0116】

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

【0117】

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

30

【0118】

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

40

【0119】

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

【0120】

一部の実施形態では、MMは共有結合によってAAとカップリングしている。別の実施形態では、AA組成物は、MMをAAのN末端と結合させることによって、標的との結合

50

が妨げられている。さらに別の実施形態では、A Aは、M MとA Aとの間のシステイン - システインジスルフィド橋によってM Mとカップリングしている。

【0121】

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

10

【0122】

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

【0123】

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

20

【0124】

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

30

【0125】

一部の実施形態では、M Mは、スクリーニング手順によって、可変のM Mを有する候補A Aのライブラリから同定することができる。たとえば、A BおよびC Mを選択して所望の酵素/標的の組合せを提供することができ、M Mのアミノ酸配列を以下に記載のスクリーニング手順によって同定して、切替可能な表現型を提供するM Mを同定することができる。たとえば、ランダムペプチドライブラリ(たとえば、約2~約40個以上のアミノ酸)を本明細書中に開示するスクリーニング方法で使用して、適切なM Mを同定し得る。具体的な実施形態では、抗体またはその断片(A B)に対して特異的結合親和性を有するM Mは、候補M Mからなるペプチド足場のライブラリであって、それぞれの足場が膜貫通タンパク質および候補M Mから構成されるライブラリを提供することが含まれる、スクリーニング手順によって同定することができる。その後、ライブラリを、完全長抗体、天然に存在する抗体断片、またはA Bを含有する天然に存在しない断片(やはり目的の標的と結合することができる)などのA Bの全体または一部分と接触させ、検出可能に結合したA Bを有する1つまたは複数の候補M Mを同定する。スクリーニングには、さらに1回の磁気活性化分別(MACS)または蛍光活性化分別(FACS)のラウンドが含まれる場合

40

50

がある。また、スクリーニングには、A Bに対するMMの解離定数 (K_d) の決定および続くマスキング効率の決定も含まれる場合がある。

【0126】

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

【0127】

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

【0128】

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

【0129】

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

【0130】

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



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

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

X_m はマスキングモチーフ (MM) のアミノ酸を表し、Xは任意のアミノ酸であり、 X_m には、柔軟なリンカー (たとえば、少なくとも1つのGly、Ser、Asn、Asp、通常は少なくとも1つのGlyまたはSer、通常は少なくとも1つのGly) が任意選択で含まれることができ、mは、1より大きい整数、通常は2、3、4、5、6、7、8、9、10以上 (上述) であり、

10

20

30

40

50

C Mは切断可能な部分を表し（本明細書中に記載）、
A Bは抗体またはその断片を表す（本明細書中に記載）]
のものであることができる。

【 0 1 3 1 】

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

10

【 0 1 3 2 】

したがって、上に例示したように、システインは、A A中に位置して1つまたは2つのテイル（上記に X_{n_1} および X_{n_2} によって表す）を可能にし、それにより、A Aがジスルフィド結合された構造（したがってコンホメーションが束縛された状態）にある場合にラッソまたはオメガ構造を生じる場合がある。テイルのアミノ酸配列は、標的受容体と結合してA Aの局在化を促進することなどの、A Aのさらなる特長を提供することができる。

【 0 1 3 3 】

特定の具体的な実施形態では、M MはA Aの細胞進入を阻害しない。

20

【 0 1 3 4 】

(c) 切断可能な部分 (C M)

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

【 0 1 3 5 】

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

30

【 0 1 3 6 】

C Mは、A AのA Bの所望の標的と共に組織中に共局在化しているプロテアーゼに基づいて選択し得る。プロテアーゼの基質が当分野で公知である、目的の標的がプロテアーゼと共に共局在化している様々な異なる条件は、公知である。癌の例では、標的組織は癌組織、特に固形腫瘍の癌組織であることができる。いくつかの癌、たとえば固形腫瘍において公知の基質を有するプロテアーゼのレベルが増加しているという報告が文献に存在する。たとえばL a R o c c aら（2004年）B r i t i s h J . o f C a n c e r、90巻（7号）：1414～1421頁を参照されたい。疾患の非限定的な例には、すべての種類の癌（乳房、肺、結腸直腸、前立腺、頭頸部、膵臓等）、関節リウマチ、クローン病、黒色腫、S L E、心血管損傷、虚血などが含まれる。さらに、V E G Fなどの抗血管形成標的が公知である。したがって、V E G Fなどの抗血管形成標的と結合できるようにA AのA Bを選択した場合は、適切なC Mは、癌の処置部位に存在するプロテアーゼ、特に非癌組織と比較して癌の処置部位に上昇したレベルで存在するものによって切

40

50

断可能なペプチド基質を含むものである。例示的な一実施形態では、AAのABはVEGFと結合することができ、CMはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)基質であり、したがってMMPによって切断可能であることができる。他の実施形態では、AAのABは目的の標的と結合することができ、CMは、たとえば、レグマイン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベータ-セクレターゼ、uPA、またはPSAであることができる。他の実施形態では、AAは、多発性硬化症または関節リウマチなどの癌以外の疾患において他の疾患に特異的なプロテアーゼによって活性化される。

【0137】

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

10

【0138】

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

20

【0139】

CMは、薬剤(すなわち、酵素、還元剤、光)によって、約 $0.001 \sim 1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ または少なくとも 0.001 、 0.005 、 0.01 、 0.05 、 0.1 、 0.5 、 1 、 2.5 、 5 、 7.5 、 10 、 15 、 20 、 25 、 50 、 75 、 100 、 125 、 150 、 200 、 250 、 500 、 750 、 1000 、 1250 、もしくは $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ の速度で特異的に修飾される(切断、還元または光分解)ことができる。

【0140】

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

30

【0141】

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

【0142】

【表 3】

表3—例示的な酵素/プロテアーゼ

ADAM10	カスパーゼ 8	カテプシン S	MMP 8
ADAM12	カスパーゼ 9	FAP	MMP 9
ADAM17	カスパーゼ 10	グランザイム B	MMP-13
ADAMTS	カスパーゼ 11	グアニジノヘンゾアターゼ (GB)	MMP 14
ADAMTS5	カスパーゼ 12	ヘプシン	MT-SP1
BACE	カスパーゼ 13	ヒト好中球エラスターゼ (HNE)	ネプリライシン
カスパーゼ類	カスパーゼ 14	レグマイン(Legumain)	NS3/4A
カスパーゼ 1	カテプシン類	マトリプターゼ 2	プラスミン
カスパーゼ 2	カテプシン A	メプリン	PSA
カスパーゼ 3	カテプシン B	MMP 1	PSMA
カスパーゼ 4	カテプシン D	MMP 2	TACE
カスパーゼ 5	カテプシン E	MMP 3	TMPRSS 3 / 4
カスパーゼ 6	カテプシン K	MMP 7	uPA
カスパーゼ 7	MT1-MMP		

10

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

20

【0143】

(d) リンカー

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

30

【0144】

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

40

【0145】

(e) さらなる要素

上述の要素に加えて、改変したABおよびAAは、追加の要素、たとえば、AAのNまたはC末端側のアミノ酸配列などを含有することができる。たとえば、目的の細胞または

50

組織への送達を容易にするために、AAには標的化部分が含まれることができる。さらに、以下にさらに記述するAAライブラリのコンテキストでは、細胞表面上でのAAの表示を容易にするために、AAを足場タンパク質のコンテキストで提供することができる。

【0146】

例示的な実施形態

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

【0147】

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

10

【0148】

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

20

【0149】

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

30

40

【0150】

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

【0151】

MMとカップリングした、MT1-MMPで活性化可能なイピリムマブ、MMとカップ

50

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

【0152】

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

10

【0153】

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

【0154】

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

20

30

【0155】

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

【0156】

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

40

【0157】

本明細書中に提供する例示的なAAは、MMとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗IGF1R、MMとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗IGF1R、MMとカップリングした、カスパーゼで活性化可能な抗IGF1R、MMとカップリングした、レグマインで活性化可能な抗フィグツムマブ、MMとカップリングした、プラスミンで活性化可能な抗フィグツムマブ、またはMMとカップリングした、カスパーゼで活性化可能な抗フィグツムマブであることができる。一部の実施形態では、これらのAAは

50

、非小細胞肺、および他の上皮の腫瘍の処置または診断に有用な場合がある。

【0158】

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

【0159】

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

【0160】

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

【0161】

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

【0162】

活性化可能な抗体複合体

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

【0163】

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

【0164】

AACの模式図を図43に提供する。例示したように、AACの要素は、CMが、切断された状態(または比較的活性の状態)で標的の存在下にある場合はABが標的と結合す

る一方で、切断されていない状態（または比較的不活性の状態）で標的の存在下にある場合は、複合体中のMMによるABのマスクングが原因でABと標的との結合が阻害されるように位置するように、配置されている。本明細書中で使用する用語、切断された状態とは、プロテアーゼによるCMの切断および/またはCMのシステイン-システインジスルフィド結合の還元後の、AACの状態をいう。本明細書中で使用する用語、切断されていない状態とは、プロテアーゼによるCMの切断の非存在下および/またはCMのシステイン-システインジスルフィド結合の還元後の非存在下における、AACの状態をいう。上述のように、本明細書中で使用する用語AACとは、その切断されていない（ネイティブ）状態およびその切断された状態の両方のAACをいう。一部の実施形態では、切断されたAACはプロテアーゼによるCMの切断が原因でMMを欠き、少なくともMMの放出を

10

【0165】

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

20

【0166】

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

【0167】

特定の実施形態では、複合体は2つの活性化可能な抗体（AA）からなり、そのそれぞれは、相互マスクングが起こる、すなわち、一方のAA上のMMが他方のAA上のABによる標的結合を妨害するように、AB、CM、およびMMを含有する（図34A）。他の実施形態では、複合体は2つのAAからなり、それぞれのAAがABを含有し、1つが、普遍的相互マスクングが起こる、すなわち、MMが複合体の形成をもたらす、両方のAA上のABによる標的結合を妨害するように、CMおよびMMを含有する（図34B）。他の実施形態では、複合体は2つのAAからなり、そのそれぞれは、相互マスクングが起こる、すなわち、一方のAA上のMMが他方のAA上のABによる標的結合を妨害するように、2つずつのAB、CM、およびMMを含有する（図34C）。他の実施形態では、複合体は2つのAAからなり、1つのAAは、普遍的相互マスクングが起こる、すなわち、MMが両方のAA上のABによる標的結合を妨害するように、2つずつのAB、CM、お

30

40

【0168】

一般に、AACの分解およびAACのABのうちの少なくとも1つに対する標的の接近

50

は、CMを切断することができる切断剤の存在下において、そのような切断剤の非存在下よりも高い(図35)。複合体の2つのAAは、異なる標的と結合するAB、または同じ標的上の異なるエピトープと結合するABを含有し得る。

【0169】

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

10

【0170】

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

20

【0171】

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

30

【0172】

活性化可能な抗体結合体

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

【0173】

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

40

【0174】

例示的なAACJは、治療剤とカップリングしたAAであって、ABがEGFR、CD44、Notch1、2、3もしくは4、Jagged1もしくは2、EPCAM、またはIGF-1Rに向けられたものである。

50

【 0 1 7 5 】

本明細書中に記載の化学連結方法は、生じる A A C J が抗原と結合して補体カスケードを活性化する能力を保持することを可能にする（結合体化していない A A もそのような能力を有していた場合）。その結果、A A C J を個体に投与した場合、続く *in vivo* での標的抗原との免疫複合体の形成は、個体の血清補体系を活性化することができる。リンカーは補体による切断に感受性があるように設計されており、したがって、薬剤は、補体カスケードの酵素のうちの 1 つまたは複数によって標的部位によって切断することができる。薬剤の放出の大部分は標的部位への投与の後に起こる。

【 0 1 7 6 】

例示的な一実施形態では、腫瘍のすべての細胞がそれぞれ標的抗原決定基を保有するわけではないことは公知である。したがって、標的細胞内への内部移行を要する送達系において、抗原決定基を保有し、結合体を内部移行させることができる腫瘍細胞への送達が成功する。抗原決定基を保有する、またはこの内部移行ができない腫瘍細胞は、処置を免れる。本発明の方法によれば、A A C J は薬剤を標的細胞へと送達する。しかし、より重要なことに、標的細胞に付着した後は、本発明に記載した方法により、活性または活性化可能な治療剤の放出または活性化が可能となる。放出または活性化は、それだけには限定されないが以下によって活性化される個々、すなわち、補体酵素、組織プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ、プラスミンもしくはタンパク質分解活性を有する別の酵素によって、または光増感剤の活性化もしくは基質修飾によって媒介され得る。放出された後、薬剤は自由に標的部位、たとえば腫瘍塊を透過する。その結果、薬剤は、抗原決定基を保有しないまたは結合体を内部移行させることができない腫瘍細胞に作用する。さらに、プロセス全体は結合体の内部移行に依存しない。

【 0 1 7 7 】

(a) 薬剤を結合体化させる方法

本発明は薬剤を A B (抗体およびその断片が含まれる) に付着させるためにいくつかの方法を利用し、2 つの例示的な方法は、A B の炭水化物部分への付着、または A B のスルフヒドリル基への付着である。特定の実施形態では、付着は免疫特異性および免疫反応性などの A B または A A 自体の本質的な特徴を顕著に変化させない。さらなる考慮事項には、反応の単純性および生成される抗体結合体の安定性が含まれる。特定の実施形態では、A B を最初に 1 つまたは複数の目的の薬剤と結合体化させ、次いで M M および C M を付着させて A A C J を生成する。他の実施形態では、A B を最初に M M および C M に付着させて、次いで目的の薬剤をさらに結合体化させて、A A C J を生成する。

【 0 1 7 8 】

i . 酸化した炭水化物部分への付着

特定の実施形態では、薬剤を A B の炭水化物部分と結合体化させ得る。一部の炭水化物部分は免疫グロブリンの F c 領域上に配置されており、C 1 結合が起こるために必要である。免疫グロブリンの F c 領域の炭水化物部分は、A B が、F c 領域の少なくとも一部が含まれる抗体または抗体断片である実施形態において、本明細書中に記載のスキームで利用し得る。あるいは、炭水化物部分を含有する任意の免疫グロブリンの F a b または F a b ' 断片を、本明細書中に記載の反応スキームで利用し得る。そのような免疫グロブリンの一例は、P u t n a m ら (1 9 7 3 年、S c i e n c e、1 8 2 巻：2 8 7 頁) によって配列決定されたヒト I g M である。

【 0 1 7 9 】

抗体、F a b もしくは F a b ' 断片または A B を含有する他の断片の炭水化物側鎖を選択的に酸化してアルデヒドを生じ得る。過ヨウ素酸、パラ過ヨウ素酸、ナトリウムメタ過ヨウ素酸およびメタ過ヨウ素酸カリウムなどの様々な酸化剤を使用することができる。その後、生じるアルデヒドをアミン基（たとえば、第一級アミン、第二級アミン、ヒドロキシルアミン、ヒドラジン、ヒドラジド、フェニルヒドラジン、セミカルバジドまたはチオセミカルバジドなどのアンモニア誘導体）と反応させて、シッフ塩基または還元シッフ塩基（たとえば、イミン、エナミン、オキシム、ヒドラゾン、フェニルヒドラゾン、セミカ

ルバゾン、チオセミカルバゾンまたはその還元形態)を形成し得る。抗体を酸化させる化学的方法はUS 4,867,973号中に提供されており、この特許はその全体が参考として組み込まれている。これらの酸化剤を用いた抗体の酸化は、公知の方法によって実施することができる。酸化では、ABは一般に水溶液の形態で使用し、その濃度は一般に100mg/ml未満、好ましくは1~20mg/mlである。酸素酸またはその塩を酸化剤として使用する場合は、これは一般に水溶液の形態で使用し、その濃度は一般に0.001~10mM、場合によっては1.0~10mMである。酸素酸またはその塩の量はABの種類に依存するが、一般に過剰で、たとえば酸化可能な炭水化物の量の2~10倍までもを使用する。しかし、最適な量は日常的な実験によって決定することができる。

【0180】

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

【0181】

あるいは、AB炭水化物部分は、他の化学基への付着またはそれとの反応を可能にするために、酵素的技法によって修飾し得る。そのような酵素の一例は、酸素の存在下でガラクトースを酸化してアルデヒドを形成するガラクトースオキシダーゼである。また、ABの炭水化物部分の酸化は、酵素ガラクトースオキシダーゼを用いても行い得る(Cooperら、1959年、J. Biol. Chem.、234巻:445~448頁)。抗体は水溶液中で使用し、その濃度は一般に0.5~20mg/mlである。酵素は一般に約5~100単位/mlの溶液で使用し、pHの範囲は約5.5~約8.0である。酵素反応に対するpH、基質濃度、緩衝液および緩衝液濃度の影響は、Cooperら、上記中に報告されている。

【0182】

本発明のAB結合体、AA結合体、またはABリンカーの中間体は、酸化したABを、第一級アミン、第二級アミン、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、フェニルヒドラジン、セミカルバジドおよびチオセミカルバジド基からなる群より選択される、利用可能なアミン基を有する任意のリンカーまたは薬剤と反応させることによって生成し得る。例示的な方法では、約0.5~20mg/mlの濃度の酸化したABまたはABリンカーの溶液を薬剤またはリンカーと混合し(反応性アミン基対抗体アルデヒドのモル比の範囲は約1~約10,000である)、溶液を約1~18時間インキュベーションする。適切な温度は0°~37°であり、pHは約6~8であり得る。結合体が形成された後、これらをシアノボロ水素化ナトリウムまたは水素化ホウ素ナトリウムなどの適切な還元剤を用いて任意選択で安定化することができる。

【0183】

ii. スルフヒドリル基の付着

ABが完全長抗体であるか、または重鎖の少なくとも一部が含まれる場合、遊離スルフヒドリル基は免疫グロブリン(immunoglobulin)分子のジスルフィド結合から生じさせることができる。これは抗体の穏和な還元によって達成される。一般に還元感受性のあるIgGのジスルフィド結合は、2つの重鎖を連結しているものである。抗体の抗原結合領域の付近に配置されているジスルフィド結合は比較的影響を受けないままである。そのような還元は、補体を固定する能力の損失をもたらすが、抗体-抗原の結合能力を妨害しない(Karushら、1979年、Biochem.、18巻:2226~2232頁)。その後、重鎖内領域中で生じた遊離スルフヒドリル基は、リンカーまたは薬剤の反応基と反応して、免疫グロブリンの抗原結合部位の妨害を低下させる共有結合を形成することができる。そのような反応基には、それだけには限定されないが、反応性ハロアルキル基(たとえばハロアセチル基が含まれる)、p-安息香酸水銀基ならびにマイケル型付加反応が可能な基(たとえば、マレイミドおよびMitraおよびLawton、1979年、J. Amer. Chem. Soc.、101巻:3097~31

10

20

30

40

50

10頁に記載の種類の基が含まれる)が含まれる。ハロアルキルは、臭素、ヨウ素または塩素で置換された任意のアルキル基であることができる。

【0184】

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

【0185】

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

【0186】

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

【0187】

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

【0188】

(b) ABと結合体化させるための薬剤

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

【0189】

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

【0190】

AA中で使用するABに付着させる薬剤は、意図する用途の目的(すなわち、死滅、細

10

20

30

40

50

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

【0191】

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

【0192】

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

【0193】

10

20

30

【表 4】

表4:結合体化のための例示的な製薬

名称/クラス	連結	製造者(複数可)		
<u>I. 抗菌剤</u>				
<u>アミノグリコシド</u>				
ストレプトマイシン	エステル/アミド	Dow, Lilly, Dome, Pfipharmics Bristol Bristol Upjohn, Wyeth, Schering Lilly Squibb Upjohn Squibb, Parke-Davis, Comer, Wyeth, Upjohn, Bristol, SKF Merrell-National Burroughs-Wellcome, Dow, Parke-Davis Parke-Davis	10	
ネオマイシン	エステル/アミド			
カナマイシン	エステル/アミド			
アミカシン	エステル			
ゲンタマイシン	エステル/アミド			
トブラマイシン	エステル/アミド			
ストレプトマイシンB	エステル/アミド			
スペクチノマイシン	エステル			
アンピシリン	アミド			
スルファニルアミド	アミド			
ポリミキシン	アミド	Parke-Davis		
クロラムフェニコール	エステル			
<u>II. 抗ウイルス剤</u>				
アシクロビル	エステル/アミド アミド	Burroughs-Wellcome		
Vira A		Parke-Davis		
シンメトレル		Endo		
<u>III. 抗真菌剤</u>				
ナイスタチン	エステル	Squibb, Primo, Lederle, Pfizer, Holland-Rantor	20	
<u>IV. 抗腫瘍剤</u>				
アドリアマイシン	エステル/アミド	Adria	30	
セルピジン (Cerubidine)	エステル/アミド	Ives		
ブレオマイシン	エステル/アミド	Bristol		
Alkeran	アミド	Burroughs-Wellcome		
Velban	エステル	Lilly		
Oncovin	エステル	Lilly		
フルオロウラシル	エステル	Adria, Roche, Herbert		
メトレキサート	アミド	Lederle		
チオテバ	—	Lederle		
ピサントレン	—	Lederle		
ノバントロン	エステル	Lederle		
チオグアニン	アミド	Burroughs-Wellcome		
プロカルピジン(Procarabizine)	—	Hoffman La Roche		
シタラピン	—	Upjohn		
<u>V. 放射性医薬品</u>				
¹²⁵ I				
¹³¹ I				
^{99m} Tc (テクネチウム)				
<u>VI. 重金属</u>				
バリウム				
金				
白金				
<u>VII. 抗マイコプラズマ剤</u>				
タイロシン (Tylosine)			40	
スペクチノマイシン				

(c) 薬剤を結合体化させるためのリンカー

本発明は、薬剤をA Bに付着させるいくつかの方法、すなわち、(a) A Bの炭水化物部分への付着、または(b) A Bのスルフィド基への付着を利用する。本発明によれば、A Bは、1つはA Bと反応し、1つは薬剤と反応する、少なくとも2つの反応基を有する中間体リンカーを介して、薬剤と共有結合させ得る。任意の適合性のある有機化合物が含まれ得るリンカーは、A B(または薬剤)との反応がA Bの反応性および選択性に有害な影響を与えないように選択することができる。さらに、リンカーと薬剤との付着は薬剤の活性を破壊しない。酸化した抗体または酸化した抗体断片と反応させるための適切な

リンカーには、第一級アミン、第二級アミン、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、フェニルヒドラジン、セミカルバジドおよびチオセミカルバジド基からなる群より選択されるアミンを含有するものが含まれる。そのような反応性官能基は、リンカーの構造の一部として存在し得るか、またはそのような基を含有しないリンカーの適切な化学修飾によって導入し得る。

【0194】

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

10

【0195】

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

【0196】

(i) 分枝状リンカー：

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

20

【0197】

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

30

【0198】

(i i) 切断可能なリンカー：

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

40

【0199】

【表5】

表5: 結合体化のための例示的なリンカー配列

切断可能な配列の型	アミノ酸配列	
<u>プラスミンで切断可能な配列</u>		
プロウロキナーゼ	PRFKIIGG	
	PRFRIIGG	
TGFβ	SSRHRRALD	
プラスミノーゲン	RKSSIIIRMRDVVL	
スタフィロキナーゼ	SSSFDKGKYKKGDDA	10
	SSSFDKGKYKRGDDA	
<u>第Xa因子で切断可能な配列</u>		
	IEGR	
	IDGR	
	GGSIDGR	
<u>MMPで切断可能な配列</u>		
ゼラチナーゼA	PLGLWA	
<u>コラゲナーゼで切断可能な配列</u>		
仔ウシ皮膚コラーゲン (α1(I) 鎖)	GPQGIAGQ	
仔ウシ皮膚コラーゲン (α2(I) 鎖)	GPQGLLGA	20
ウシ軟骨コラーゲン (α1(II) 鎖)	GIAGQ	
ヒト肝臓コラーゲン (α1(III) 鎖)	GPLGIAGI	
ヒト α ₂ M	GPEGLRVG	
ヒト PZP	YGAGLGVV	
	AGLGVVER	
	AGLGISST	
ラット α ₁ M	EPQALAMS	
	QALAMSAI	
ラット α ₂ M	AAYHLVSQ	
	MDAFLESS	
ラット α ₁ I ₃ (2J)	ESLPVVAV	
ラット α ₁ I ₃ (27J)	SAPAVESE	30
ヒト線維芽細胞コラゲナーゼ (自己分解切断)	DVAQFVLT	
	VAQFVLTE	
	AQFVLTEG	
	PVQPIGPQ	

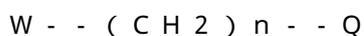
さらに薬剤は、ジスルフィド結合（たとえばシステイン分子上のジスルフィド結合）を介してA Bと付着させ得る。多くの腫瘍が高いレベルのグルタチオン（還元剤）を天然に放出するため、これによりジスルフィド結合が還元され、続いて送達部位で薬剤が放出することができる。特定の具体的な実施形態では、C Mを改変させる還元剤は結合体化したA Aのリンカーも改変させる。

40

【0200】

(i i i) スペースーおよび切断可能な要素：

さらに別の実施形態では、薬剤とA AのA Bとの間の間隔を最適化するような様式でリンカーを構築する必要がある。これは、一般構造：



[式中、Wは、- - N H - - C H 2 - - または - - C H 2 - - のどちらかであり、Qは、アミノ酸、ペプチドであり、nは、0 ~ 20の整数である] のリンカーを使用することによって達成し得る。

【0201】

さらに他の実施形態では、リンカーはスペースー要素および切断可能な要素を含み得る

50

。スペーサー要素は、切断可能な要素が切断を司る酵素により接近可能性となるように、切断可能な要素をA Bのコアから離して配置する役割を果たす。上述の分枝状リンカーのうちの特定的なものがスペーサー要素として役割を果たし得る。

【0202】

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

【0203】

(iv) 血清補体およびリンカーの選択：

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

【0204】

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

【0205】

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

【0206】

(v) 補体の活性化なしに放出させるためのリンカー：

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

【0207】

(vi) 生化学的架橋剤：

他の実施形態では、A Aは、特定の生化学的架橋剤を用いて1つまたは複数の治療剤と結合体化させ得る。架橋試薬は、2つの異なる分子の官能基を一緒に結びつける分子橋を形成する。2つの異なるタンパク質を段階的な様式で連結させるためには、望まないホモポリマーの形成を排除するヘテロ二官能性架橋剤を使用することができる。例示的なヘテ

10

20

30

40

50

ロ二官能性架橋剤を表6に参照する。

【0208】

【表6】

表6: 例示的なヘテロ二官能性架橋剤

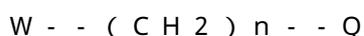
ヘテロ二官能性架橋剤				
リンカー	反応性の対象	利点および適用	架橋後の スペーサー アームの長さ	
SMPT	第一級アミン スルフヒドリル	より高い安定性	11.2 A	10
SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	チオール化 切断可能な架橋	6.8 A	
LC-SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	伸長されたスペーサーアーム	15.6 A	10
スルホ-LC-SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	伸長させるスペーサーアーム 水溶性	15.6 A	
SMCC	第一級アミン スルフヒドリル	安定したマレイミド反応基 酵素-抗体の結合体化 ハプテン-担体タンパク質の結合体化	11.6 A	20
スルホ-SMCC	第一級アミン スルフヒドリル	安定したマレイミド反応基 水溶性 酵素-抗体の結合体化	11.6 A	
MBS	第一級アミン スルフヒドリル	酵素-抗体の結合体化 酵素-抗体の結合体化	9.9 A	20
スルホ-MBS	第一級アミン スルフヒドリル	ハプテン-担体タンパク質の結合体化 水溶性	9.9 A	
SIAB	第一級アミン スルフヒドリル	酵素-抗体の結合体化	10.6 A	20
スルホ-SIAB	第一級アミン スルフヒドリル	水溶性	10.6 A	
SMPB	第一級アミン スルフヒドリル	伸長されたスペーサーアーム 酵素-抗体の結合体化	14.5 A	30
スルホ-SMPB	第一級アミン スルフヒドリル	伸長されたスペーサーアーム 水溶性	14.5 A	
EDE/スルホ-NHS	第一級アミン カルボキシル基	ハプテン-担体タンパク質の結合体化	0	30
ABH	炭水化物 非選択的	糖基と反応する	11.9 A	

(vii) 切断不可能なリンカーまたは直接付着：

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

【0209】

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



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

【0210】

(viii) 切断不可能な結合体：

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

達成し得る。

【0211】

(d) 活性化可能な抗体結合体の使用

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

【0212】

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

10

【0213】

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

【0214】

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

20

【0215】

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

30

【0216】

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

【0217】

(i) 基質修飾

本発明の代替実施形態では、薬剤による基質の活性化を用いて、一重項酸素またはペルオキシドの形成を媒介し、細胞の死滅を誘導するために使用し得る。この特定の実施形態では、薬剤は酵素である。たとえば、ガラクトースオキシダーゼは、ガラクトースおよび一部のガラクトース誘導体をC 6位置で酸化する。酸化反応の過程で、分子酸素は、隣接する細胞に対して毒性がある過酸化水素へと変換される。また、フラボ酵素である酵素グルコースオキシダーゼも本発明の実施形態で使用し得る。この酵素は - D - グルコースに対する特異性が高く、ペルオキシドの形成が原因で抗生物質として作用することができる。この酵素は、直接または切断不可能なリンカーを介してA Bに付着させ得る。被験体に有効な用量のこのA A C Jを与え、その後、基質で灌流する。細胞の死滅は上述の方法によるペルオキシドの形成によって媒介される。ペルオキシドの毒性効果は、好ましくはヒト起源である第2の酵素を投与することによって、そのペルオキシドをより毒性がある次亜塩素酸へと変換することによって増幅させ得る。適切な酵素の例には、それだけには

40

50

限定されないが、ミエロペルオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼおよびクロロペルオキシダーゼが含まれる。

AAを同定および/または最適化するためのディスプレイ方法および組成物

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

【0218】

(a)複製可能な生物学的実体上に表示されるAAまたは候補AAのライブラリ

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

10

【0219】

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

【0220】

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

20

30

【0221】

(b)複製可能な生物学的実体の表面上での候補AAの表示

複製可能な生物学的実体を用いた様々なディスプレイ技術が当分野で公知である。これらの方法および実体には、それだけには限定されないが、mRNAおよびリボソームディスプレイ、真核ウイルスディスプレイ、ならびに細菌、酵母、および哺乳動物細胞表面ディスプレイなどのディスプレイ方法が含まれる。Wilson, D. S.ら(2001年)PNAS USA、98巻(7号):3750~3755頁、Muller, O. J.ら(2003年)Nat. Biotechnol.、3巻:312頁、Bupp, K.およびM. J. Roth(2002年)Mol. Ther.、5巻(3号):329~3513頁、Georgiou, G.ら(1997年)Nat. Biotechnol.、15巻(1号):29~3414頁、ならびにBoder, E. T.およびK. D. Witttrup(1997年)Nature Biotech.、15巻(6号):553~557頁を参照されたい。表面ディスプレイ方法は、ライブラリの分析およびスクリーニングのための蛍光活性化細胞分取(FACS)の応用を可能にするため、魅力的である。Daugherty, P. S.ら(2000年)J. Immunol. Methods、243巻(1~2号):211~2716頁、Georgiou, G.(2000年)Adv. Protein Chem.、55巻:293~315頁、Daugherty, P. S.ら(2000年)PNAS USA、97巻(5号):2029~3418頁、Olsen, M. J.ら(20

40

50

03年) *Methods Mol. Biol.*、230巻:329~342頁、Boder, E. T.ら(2000年) *PNAS USA*、97巻(20号):10701~10705頁、Mattheakis, L. C.ら(1994年) *PNAS USA*、91巻(19号):9022~9026頁、ならびにShusta, E. V.ら(1999年) *Curr. Opin. Biotech.*、10巻(2号):117~122頁を参照されたい。目的の生物学的標的と結合することができるペプチドを同定するために使用し得るさらなるディスプレイ方法は、その開示が本明細書中に参考として組み込まれている米国特許第7,256,038号に記載されている。

【0222】

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

10

【0223】

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

20

【0224】

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

30

【0225】

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

【0226】

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

【0227】

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

40

【0228】

(c) AAをコードしている構築体

本開示は、AAおよび/または候補AAをコードしている配列が含まれる核酸構築体をさらに提供する。適切な核酸構築体には、それだけには限定されないが、原核または真核細胞中で発現することができる構築体が含まれる。発現構築体は、一般に、それらを使用する宿主細胞と適合性があるように選択する。

【0229】

50

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

【0230】

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

10

【0231】

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

20

【0232】

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

30

【0233】

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

【0234】

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

40

【0235】

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

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

【0236】

50

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

【0237】

(e) 候補AAをコードしている核酸配列の生成

スクリーニング方法で使用するための候補AAの生成は、当分野で公知の方法を用いて達成することができる。ポリペプチドディスプレイ、単鎖抗体ディスプレイ、抗体ディスプレイおよび抗体断片ディスプレイは当分野で周知の方法である。一般に、候補AAライ
10
ブラリ中で変動させるAAの要素、たとえばMMを、ランダム化について選択する。ライブラリ中の候補AAは、たとえばヌクレオチド/残基の頻度一般または要素内のアミノ酸(複数可)の位置が、完全にランダム化されているまたはそのランダム化が偏っていることができる。

【0238】

AAをスクリーニングする方法

本開示は、酵素的に活性化されたAA、還元剤に感受性のあるAA、または酵素的活性化もしくは還元剤に基づいた活性化のどちらかもしくは両方によって活性化可能なAAであることができる、AAを同定する方法を提供する。一般に、この方法には、多数性(plurality)の候補AAを、AAのABと結合することができる標的およびAAの
20
CMを切断することができるプロテアーゼと接触させることと、プロテアーゼに曝露された場合に標的と結合する前記多数性の第1のメンバー集団を選択することと、プロテアーゼの非存在下で前記第1の集団を標的と接触させることと、前記第1の集団メンバーからプロテアーゼの非存在下で標的と結合するものを枯渇させることによって、前記第1の集団から第2のメンバー集団を選択することとが含まれ、前記方法は、プロテアーゼの存在下における標的結合と比較して減少した、プロテアーゼの非存在下における標的との結合を示す候補AAの選択を提供する。

【0239】

一般に、所望の切替可能な表現型を有する候補AAをスクリーニングする方法は、陽性スクリーニングステップ(プロテアーゼに曝露した後に標的と結合するメンバーを同定する
30
ため)および陰性スクリーニングステップ(プロテアーゼに曝露されていない場合に標的と結合しないメンバーを同定するため)によって達成する。陰性スクリーニングステップは、たとえば、集団メンバーからプロテアーゼの非存在下で標的と結合するものを枯渇させることによって達成できる。本明細書中に記載のライブラリスクリーニング方法は、最初に、酵素処理の非存在下で標識した標的と結合しない(すなわち、切断されていない場合に標識した標的と結合しない)候補を選択する陰性スクリーニングを実施し、その後、陽性スクリーニング(すなわち、酵素で処理し、切断された状態で標識した標的と結合するメンバーを選択する)を実施することによって開始できることに注意されたい。しかし、利便上、陽性選択を第1のステップとして、スクリーニング方法を以下に記載する。

【0240】

陽性および陰性スクリーニングステップは、好都合にフローサイトメトリーを用いて実施して、検出可能に標識した標的の結合に基づいて候補AAを分別することができる。スクリーニング手順の1回のラウンドまたはサイクルは、陽性選択ステップおよび陰性選択ステップをどちらも含む。複数回のサイクル(完全および部分サイクル、たとえば、1.5
40
サイクル、2.5サイクルなどが含まれる)が行われるように、1つのライブラリで方法を繰り返し得る。このようにして、AAの切替特徴を示す複数の候補AAのメンバーを生じる集団中で濃縮し得る。

【0241】

一般に、スクリーニング方法は、最初に、複数の候補AAをコードしている核酸ライブラリをディスプレイ足場中で作製し、立ち代ってそれを複製可能な生物学的実体の表面上
50

で発現させるためのディスプレイ足場内に導入することによって実施する。本明細書中で使用する複数の候補 A A とは、候補 A A をコードしているアミノ酸配列を有する複数のポリペプチドをいい、多数性のメンバーは、A A の構成要素のうちの少なくとも 1 つのアミノ酸配列に関して可変である、たとえば、多数性は、M M、C M または A B、通常は M M のアミノ酸配列に関して可変である。

【 0 2 4 2 】

たとえば、候補 A A の A B および C M を固定して保ち、ライブラリの候補 A A は M M のアミノ酸配列に関して可変である。別の例では、ライブラリは、候補 A A 中の別のシステインとのジスルフィド結合形成が好まれるようにシステイン残基を配置するように設計された M M を有する（他の残基は、それ以外は完全に、または少なくとも部分的にランダム化されたアミノ酸配列を有する M M を提供するように選択される）、候補 A A が含まれるように作製できる。別の例では、ライブラリは、M M に完全にランダム化されたアミノ酸配列が含まれる候補 A A が含まれるように作製することができる。そのようなライブラリは、これらの基準のうちの 1 つまたは複数によって設計された候補 A A を含有することができる。前記多数性のメンバーを本明細書中に記載の方法にしたがってスクリーニングすることによって、所望の切替可能な表現型を提供する候補 M M を有するメンバーを同定することができる。

【 0 2 4 3 】

本方法の一実施形態では、複数の候補 A A のそれぞれのメンバーは、複製可能な生物学的実体（ここでは細菌細胞によって例示）の表面上に表示させる。多数性のメンバーを、候補 A A の C M を切断することができるプロテアーゼに曝露させ、候補 A A の A B の結合パートナーである標的と接触させる。プロテアーゼに曝露させた後に標的と結合する A B を含むメンバーを表示する細菌細胞を、標的結合の検出（たとえば標的 - A B の複合体の検出）によって同定および / または分離する。その後、プロテアーゼ曝露（C M の切断をもたらすことができる）の後に標的と結合する A B を含むメンバーを、標的と、プロテアーゼの非存在下で接触させる。切断の非存在下において減少したまたは検出不可能な標的との結合を示す A B を含むメンバーを表示する細菌細胞を、結合した標的を欠く細胞の検出によって同定および / または分離する。このようにして、切断された状態で標的と結合し、切断されていない状態で減少したまたは検出不可能な標的結合を示す、複数の候補 A A のメンバーを同定および / または選択する。

【 0 2 4 4 】

上述のように、候補 A A ライブラリは、A A 構築体の 1 つまたは複数の側面についてスクリーニングするために、たとえば、M M、C M、および A B のうちの 1 つまたは複数の切替可能な表現型の最適化を提供するために、構築することができる。最適化を促進するために、A A の 1 つまたは複数の他の要素を変動させることができる。たとえば、切断剤（たとえば酵素）の非存在下でシステインもしくは A A の異なるコンホメーション特徴を提供することができる他の残基の数もしくは位置を変動させることを含めた、M M を変動させること、1 つもしくは複数の所望の特徴（たとえば酵素切断の特異性など）について最適化された基質を同定するために C M を変動させること、および / または切替可能な標的結合の最適化を提供するために A B を変動させることである。

【 0 2 4 5 】

一般に、候補 A A ライブラリの要素は目的の標的タンパク質に従って選択し、A A は活性化されて、C M を切断する切断剤（たとえば酵素）の存在下において増強された標的結合を提供する。たとえば、C M および A B をライブラリメンバー間で固定して保つ場合、C M は、目的の標的と共に共局在化している切断剤（たとえば酵素）によって切断可能であるように選択し、目的の標的は A B の結合パートナーである。このようにして、A A は、適切な生体条件下、したがって適切な生物学的位置で選択的に活性化されるように選択することができる。たとえば、抗血管形成化合物として使用し、V E G F 結合の切替可能な表現型を示す A A を開発することが所望される場合、候補 A A の C M は、V E G F と共に共局在化している酵素の基質および / または還元剤であるように選択される（たとえば

10

20

30

40

50

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

【0246】

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

【0247】

(a) AAスクリーニング前の、細胞表面ディスプレイの任意選択の濃縮

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

【0248】

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

【0249】

(b) 切断されたAAによる標的結合のスクリーニング

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

【0250】

プロテアーゼ切断後に標的と結合するメンバーを同定するために、候補AAライブラリを、表示された候補AAのCMを切断することができるプロテアーゼと、十分な時間の間、CMのプロテアーゼ基質の切断をもたらすために適した条件下で接触させる。様々なプロテアーゼ - CMの組合せが当業者によって容易に確認可能であり、プロテアーゼは、CMを切断することができ、*in vivo*で目的の標的(ABの結合パートナーである)と共に共局在化するものである。たとえば、目的の標的が固形腫瘍に関連する標的(たとえばVEGF)である場合は、適切な酵素には、たとえば、マトリックス - メタロプロテアーゼ(たとえばMMP-2)、ディスインテグリンおよびメタロプロテアーゼ(複数可)(ADAMs)/トロンボスポンジン様モチーフを有するADAM(ADAMTS)、カテプシンならびにカリクレインが含まれる。本明細書中に記載のAA中のCMとして有用な基質のアミノ酸配列は当分野で公知であり、所望する場合は、本明細書中に記載の方

10

20

30

40

50

法を適応させることによってCMとして使用するために適した最適な配列を同定するためにスクリーニングすることができる。例示的な基質には、それだけには限定されないが、表3に記載の酵素によって切断可能な基質が含まれることができる。

【0251】

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

10

【0252】

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

【0253】

(c) プロテアーゼ切断の非存在下で標的と結合しない候補AAのスクリーニング

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

20

【0254】

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

30

【0255】

(d) 検出可能な標識

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

40

【0256】

本明細書中で使用する用語、親和性タグとは、親和性タグと結合して検出可能なシグナル(たとえば、蛍光化合物またはタンパク質)を提供する分子を用いて検出することができる、標的に付着させることができるペプチドセグメントを示す。原理的には、抗体また

50

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

【0257】

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

【0258】

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

【0259】

(e)スクリーニング方法

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

【0260】

たとえば、結合した検出可能に標識した標的を有する候補AAの選択は、当分野で公知の様々な技法を用いて達成することができる。たとえば、フローサイトメトリー(たとえばFACS(登録商標))方法を用いて、検出可能に標識した候補AAを標識されていない候補AAから分別することができる。フローサイトメトリー(cyometry)方法は、たとえば、第2の集団へと分離してさらにスクリーニングするために、より暗い細胞集団を可能にするまたはより明るい細胞集団を必要とするようにゲーティングを改変する

10

20

30

40

50

ことによって、候補 A A の集団の分離において多かれ少なかれストリンジェントな要件を提供するために、実行することができる。

【 0 2 6 1 】

別の例では、免疫親和性クロマトグラフィーを用いて、標的と結合した候補 A A を標的と結合しないものから分離することができる。たとえば、抗標的抗体が結合した支持体（たとえば、カラム、磁気ビーズ）を、プロテアーゼおよび標的に曝露させた候補 A A と接触させることができる。標的が結合した候補 A A は抗標的抗体と結合し、したがって、結合した標的を欠く候補 A A からの分離が容易となる。スクリーニングステップが、比較的減少した標的結合を有するまたは検出可能な標的結合を有さない（たとえば他の候補 A A と比較して）、切断されていない候補 A A について濃縮された集団を提供するためである

10

【 0 2 6 2 】

（ f ）二重標的結合 A A のスクリーニング

本明細書中に開示するスクリーニング方法は、2つの A B を有する二重標的結合 A A を同定するために容易に適應され得る。一般に、この方法は複数の候補 A A を含有するライブラリを含み、前記多数性のそれぞれのメンバーは、第 1 の A B、第 2 の A B、第 1 の C M および / もしくは第 2 の C M、第 1 の M M、ならびに / または第 2 の M M を含む。ライ

20

ブラリを、少なくとも第 1 の A B と結合することができる標的および第 1 の C M を切断することができる切断剤と接触させる。ライブラリの第 1 のメンバー集団を、切断剤の存在下（たとえば C M のプロテアーゼ）における標的との結合について選択する。その後、この選択された集団を上記陰性スクリーニングに供して、切断剤の非存在下における標的とライブラリメンバーとの結合を評価する。その後、切断剤の非存在下で前記標的と結合する部分メンバー集団を枯渇させることによって、第 2 のメンバー集団が生じる。これは、たとえば、検出可能に標識した標的の検出によって決定されるように、標的と結合していないメンバーを標的と結合しているものから離して分別することによって達成できる。したがって、この方法は、切断剤の存在下における前記標的との結合と比較して減少した、切断剤の非存在下における標的との結合を示す候補 A A の選択を提供する。この方法は両

30

【 0 2 6 3 】

候補 A A を選択するスクリーニング方法の例示的な変化

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

【 0 2 6 4 】

（ a ） M M のマスキング効率の決定

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

40

【 0 2 6 5 】

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

【 0 2 6 6 】

同様の様式で、同じ親和性を有する 2 つの M M は、これらが、どれほど良好に A B 上の結合部位の阻害または A B がその標的と結合することの防止を促進するかに基づいて、異なる程度のマスキングを示し得る。別の例では、高い親和性を有する 1 つの M M は、その

50

標的との結合が完全に阻害されるように、A Bと結合してその構造を変化させ得る一方で、高い親和性を有する別のM Mは、結合を部分的にのみ阻害し得る。その結果、有効なM Mの発見は親和性のみに基づくことができず、マスキング効率の経験的尺度が含まれる場合がある。A A中のM Mの時間依存性の標的置換は、M Mについて最適化および選択するために測定することができる。この目的のために新規標的置換アッセイ(T D A)が本明細書中に記載されている。

【0267】

T D Aアッセイは、効率的にマスキングされたA Aの発見および妥当性確認に使用することができ、マスキング効率の経験的に決定すること、標的の存在下で標的と結合するマスキングされたA Bの能力を、標的の存在下で標的と結合するマスキングされていないおよび/または親A Bの能力と比較することを含む。結合効率は、マスキングされていない/親A Bの結合と比較した、平衡結合の%として表すことができる。A BがM Mで修飾されており、標的の存在下にある場合、A Bとその標的との特異的結合は、M Mで修飾されていないA Bまたは親A Bと標的との特異的結合と比較して、低下または阻害されている場合がある。本明細書中に記載のように*in vivo*または標的置換*in vitro*の免疫吸着アッセイで測定した際に、M Mで修飾されていないA Bまたは親A Bと標的との結合と比較した場合、M Mで修飾した場合に標的と結合するA Bの能力は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、さらには100%、少なくとも2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、96時間、または5、10、15、30、45、60、90、120、150、180日間、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12カ月間もしくはそれより長くの間、低下する場合がある。

【0268】

(b) A A要素を同定および/または最適化するための反復スクリーニング

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

【0269】

(c) 還元剤で活性化可能なA A

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

【0270】

(d) 光で活性化可能なA A

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

【0271】

(e) サイクル回数およびA Aの足場なしのスクリーニング

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

【0272】

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

10

【0273】

(f) AAの構成要素および切替活性の最適化

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

20

【0274】

(g) 拡大した動作範囲の選択

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

30

【0275】

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

40

【0276】

陽性選択ステップで比較的より低濃度の標的を使用することは、切断された状態にある場合に標的結合が向上したAAメンバーの選択を駆動する役割を果たすことができる。たとえば、プロテアーゼに曝露させたAAを含むスクリーニングは、AB-標的の相互作用のKdの約2~約100分の1、約2~50分の1、約2~20分の1、約2~10分の1、または約2~5分の1である標的濃度で行うことができる。その結果、標的と結合したAAについて集団を選択した後、選択された集団は、集団中の他のAAよりも高い親和

50

性および/または結合力の結合を示すAAについて濃縮されている。

【0277】

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

10

【0278】

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

20

【0279】

(h) 可溶性AAの試験

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

30

【0280】

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

40

【0281】

(i) 候補AAで使用するための個々の部分のスクリーニング

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

50

【0282】

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

【0283】

(j) 自動スクリーニング方法

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

10

【0284】

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

【0285】

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

20

【0286】

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

30

40

【0287】

治療においてAAを使用する方法

AAは、たとえば、治療上有効な量の目的のAAおよび薬学的に許容される賦形剤である担体（薬学的に許容される担体とも呼ばれる）を含有する医薬組成物内に組み込むことができる。多くの薬学的に許容される賦形剤が当分野で公知であり、一般に、投与経路、処置する状態、および当分野で十分に理解されている他のそのような可変のものに従って選択される。薬学的に許容される賦形剤は、たとえば、A. Gennaro (2000年) Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、Lippincott, Williams, & Wilkins、Pharmaceutical Dosage Forms and D

50

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

【0288】

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

【0289】

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

【0290】

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

【0291】

医薬配合物は、全身性または局所的な注射用調製物などの様々な剤形で提供することができる。構成要素は、マイクロカプセルなどの担体、たとえば、コアセルベーション技法もしくは界面重合によって調製したものなど、たとえば、それぞれヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ (メチルメタクリレート (methyl methacrylate)) マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系 (たとえば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノ

10

20

30

40

50

カプセル)中、またはマクロエマルジョン中で提供することができる。そのような技法は Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol, A. 編(1980年)に開示されている。

【0292】

また、持続放出調製物も AA 含有配合物の範囲内にある。例示的な持続放出調製物には、AA を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれることができ、マトリックスは、造形品、たとえばフィルムまたはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(たとえば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール))、ポリ乳酸(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸と -エチル-L-グルタミン酸とのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOSIT(商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドからなる注射用ミクロスフェア)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、およびポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは100日間を超える分子の放出を可能にする一方で、特定のヒドロゲルはより短い期間の間タンパク質を放出する。

10

【0293】

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

20

【0294】

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

30

【0295】

(a) 処置方法

40

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

【0296】

用語、処置部位または疾患部位とは、図2に図示するように、本明細書中に記載のように、AA が切替可能であるように設計された部位、たとえば、AA の一方または両方の AB の標的および AA の CM を切断することができる切断剤が共局在化している部位をいうことを意味する。処置部位には、局所投与(たとえば、注射、インフュージョン(たとえ

50

ばカテーテルによる)など)または全身投与(たとえば、処置部位から離れた部位への投与)によって接近することができる組織が含まれる。処置部位には、比較的生物学的に閉鎖されているもの(たとえば、器官、嚢、腫瘍部位など)が含まれる。

【0297】

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

【0298】

疾患の種類および重篤度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 15\text{mg}/\text{kg}$ (たとえば $0.1 \sim 20\text{mg}/\text{kg}$)のAAが、たとえば1つまたは複数の別々の投与によるか、持続注入によるかにかかわらず、患者に投与する初期候補用量として役割を果たすことができる。典型的な1日用量の範囲は、本明細書中に言及したものなどの要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 以上であり得る。数日間またはそれ以上にわたる繰り返しの投与には、状態に応じて、疾患症状の所望の抑制が起こるまで処置を持続する。しかし、他の用量レジメンも有用であり得る。

【0299】

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

【0300】

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

【0301】

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

【0302】

(b)罹患した組織対健康な組織におけるAAの使用

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

【0303】

健康な組織とは、特異的に切断するまたは他の様式でAAのCMを改変することができる疾患に特異的な薬剤、たとえば、疾患に特異的なプロテアーゼ、疾患に特異的な酵素、

10

20

30

40

50

または疾患に特異的な還元剤をわずかのみ産生する、または産生しない組織をいう。罹患した組織とは、特異的に切断するまたは他の様式でAAのCMを改変することができる疾患に特異的な薬剤、たとえば、疾患に特異的なプロテアーゼ、疾患に特異的な酵素、または疾患に特異的な還元剤を産生する組織をいう。

【0304】

(c) 疾患の様々な段階の罹患した組織におけるAAの使用

一部の実施形態では、本明細書中に記載のAAは複数のCMとカップリングしている。そのようなAAは、疾患の様々な段階で活性化される、または罹患した組織中の異なる区画中で活性化することができる。例として、MMP-9で切断可能なCMおよびカテプシンDで切断可能なCMの両方とカップリングしたABは、早期腫瘍および末期段階の壊死性腫瘍中で活性化することができる。早期腫瘍中では、CMはMMP-9によって切断することができ、AAはマスキングされていない。末期腫瘍中では、CMは末期腫瘍の死滅しつつある中心でアップレギュレートされているカテプシンDによって切断することができ、AAはマスキングされていない。別の例示的な実施形態では、MMならびにMMP-9で活性化可能なCMおよびカスパーゼで活性化可能なCMとカップリングしたABは、初期および末期腫瘍のどちらでも切断することができる。別では、血管形成（早期腫瘍）の活性部位のプラスミンは、プラスミンで切断可能なCMを切断することができ、侵入するマクロファージを有する疾患組織中のレグメインは、末期腫瘍中でレグメイン（*leugama in*）に特異的なCMを切断することができる。

【0305】

(d) 抗血管形成治療におけるAAの使用

AAが、EGFR、TNFアルファ、CD11a、CSFR、CTLA-4、EpCAM、VEGF、CD40、CD20、Notch1、Notch2、Notch3、Notch4、Jagged1、Jagged2、CD52、MUC1、IGF1R、トランスフェリン、gp130、VCAM-1、CD44、DLL4、またはIL4などの血管形成の媒介物質と結合するABを含有する、例示的な一実施形態では、AAは、血管形成の障害が所望される状態、特にVEGFの障害が目的である状態の処置において使用が見つかる。VEGF結合AAには、VEGFと結合するABおよび線維芽細胞成長因子（たとえばFGF-2）などの第2の成長因子と結合してFGF活性を障害するABを有する二重標的結合AAが含まれることができる。したがって、そのような二重標的結合AAは、2つの血管形成促進因子の障害を提供し、異常な血管形成の部位に共局在化している切断剤（たとえば、酵素、たとえばMMPまたは表3に提示するものなどの他の酵素）によって活性化可能であるように設計することができる。

【0306】

血管形成障害AAは、被験体（たとえばヒト）中の固形腫瘍、特に関連する血管床が腫瘍に養われるために血管形成の障害が障害または腫瘍増殖を提供できる、固形腫瘍の処置において使用が見つかる。また、抗VEGFに基づいた抗血管形成AAは、異常な血管形成の障害による治療を受け入れられる1つまたは複数の症状を有する他の状態においても使用が見つかる。

【0307】

一般に、異常な血管形成は、新しい血管が、疾患状態において過剰に、不十分または不適切に（たとえば、血管形成の位置、タイミング、もしくは発生が医学的観点から望ましくない）、あるいは疾患状態を引き起こすように成長した際に起こる。過剰、不適切または非制御の血管形成は、癌、特に血管新生した固形腫瘍および転移性腫瘍（結腸、肺癌（特に小細胞肺癌）、または前立腺癌が含まれる）、眼球血管新生によって引き起こされる疾患、特に糖尿病性盲目、網膜症、主に糖尿病性網膜症または加齢性黄斑変性症およびルベオシス、乾癬、乾癬性関節炎、血管腫などの血管芽腫、炎症性腎臓病、たとえば、糸球体腎炎、特にメサンギウム増殖性糸球体腎炎、溶血性尿毒症症候群、糖尿病性腎症または高血圧性腎硬化症、様々な炎症性疾患、たとえば、関節炎、特に関節リウマチ、炎症性腸疾患、乾癬（*psoriasis*）、サルコイドシス、動脈硬化症および移植後に起

10

20

30

40

50

こる疾患、子宮内膜症または慢性喘息、ならびに当業者によって容易に認識される他の状態などにおいて、疾患状態の悪化に寄与するまたは疾患状態を引き起こす新しい血管の成長が存在する場合に起こる。新しい血管は罹患した組織を養い、正常組織を破壊することができ、癌の場合は、新しい血管は、腫瘍細胞が循環中に漏れて他の器官中に滞在することを可能にする場合がある（腫瘍の転移）。

【0308】

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

10

【0309】

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

【0310】

20

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

【0311】

30

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

【0312】

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

40

【0313】

50

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

【0314】

(e) 抗炎症性治療における AA の使用

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

10

【0315】

AA を使用する非治療的方法

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

20

【0316】

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

30

【0317】

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

40

50

うな切断の結果としての検出可能な標識が付着しているAA断片の除去が原因の、検出可能なシグナルの低下。

【0318】

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

10

【0319】

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

【0320】

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

20

【0321】

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

30

【0322】

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

【0323】

体内分布の考慮

本明細書中に記載の組成物の治療的潜在性は、改変したABまたはAAのより高い体内分布およびバイオアベイラビリティを可能にする。本明細書中に記載の組成物はバイオアベイラビリティが向上した抗体治療剤を提供し、抗体治療剤と標的との結合の親和性は、罹患した組織よりも健康な組織で低い。MMとカップリングしたABを含む医薬組成物は、健康な組織よりも罹患した組織で高い、標的に対する親和性を表示することができる。好ましい実施形態では、罹患した組織中の親和性は、健康な組織中の親和性よりも5~10,000,000倍高い。

40

【0324】

概説すると、本開示は、バイオアベイラビリティが向上した抗体治療剤を提供し、第1

50

の組織中での抗体治療剤とその標的との結合の親和性は、抗体治療剤と第2の組織中のその標的との結合よりも低い。例として、様々な実施形態では、第1の組織は健康な組織であり、第2の組織は罹患した組織であるか、または、第1の組織は早期腫瘍であり、第2の組織は末期腫瘍であるか、第1の組織は良性腫瘍であり、第2の組織は悪性腫瘍であり、第1の組織および第2の組織は空間的に分離されているか、または、具体例では、第1の組織は上皮組織であり、第2の組織は、乳房、頭部、頸部、肺、膵臓、神経系、肝臓、前立腺、泌尿生殖器、もしくは子宮頸部の組織である。

【実施例】

【0325】

(実施例1)

候補マスキング部分(MM)のスクリーニング

所望の最適な結合および解離の特徴を有するMMとカップリングした抗体およびその断片(AB)を含む組成物を生成するために、候補MMのライブラリをスクリーニングする。様々な可変のアミノ酸配列、変動するシステインの位置、様々な長さなどを有するMMを作製する。候補MMは、目的のABとの結合の親和性について試験する。好ましくは、ABの結合パートナーのネイティブアミノ酸配列を含有しないMMを改変抗体の構築に選択する。

【0326】

約1~10nMの親和性を有するMMを選択するために、目的のABのMMの親和性成熟を実施する。

【0327】

(実施例2)

改変抗体および活性化可能な抗体(AA)のライブラリのスクリーニング

所望の切替特徴(すなわち、マスキングされたおよび/または切断されたコンホメーションでの標的結合と比較して、マスキングされたおよび/または切断されていないコンホメーションでの標的結合が減少している)を有する改変抗体およびAAを同定するために、マスキング部分(MM)中の様々な可変のアミノ酸配列、MM中の変動するシステインの位置、様々なリンカー長さ、および親ABとの様々な付着点を有する候補改変抗体および候補AAのライブラリを作製する。

【0328】

切替可能な表現型を表示する候補AAを同定するための、スクリーニング/分別の方法のスキームをここで提供する。発現ベクターを介してライブラリを導入し、その結果、細菌細胞の表面上にAAの表示がもたらされる。培養によってライブラリを拡大した後、AAポリペプチドを表示する細胞を適切な酵素または還元剤で処理して、CMの切断または還元を提供する。その後、処理した細胞を蛍光標識した標的と接触させ、細胞をFACSによって分別して、切断/還元後に標的と結合するAAを表示する細胞を単離する。その後、標的結合構築体を表示する細胞を、培養で成長させることによって拡大する。その後、細胞を標識した標的と接触させ、FACSによって分別して、酵素/還元剤の非存在下で標識した標的と結合しないAAを表示する細胞を単離する。これらのステップがスクリーニング手順の1サイクルを表す。その後、培養で成長させることによる拡大によって細胞を追加のサイクルに供し、培養物をスクリーニングステップの全体または一部にさらに供することができる。

【0329】

また、ライブラリのスクリーニングおよび分別は、酵素/還元剤処理の非存在下で標識した標的と結合しない(すなわち、切断/還元されていない場合に標的と結合しない)候補を最初に選択することによって開始することもできる。

【0330】

(実施例3)

MMのマスキング効率を決定するための改変抗体の*in vitro*スクリーニング
マスキングされた際に最適な特徴を示す、たとえば、マスキングされた状態で標的の存

10

20

30

40

50

在下にある場合に10%の標的との結合しか示さない改変抗体およびAAをスクリーニングするために、異なるMMカップリングしたAB、または同じMMと異なる付着点でカップリングしたAB、または異なる長さおよび/または配列のリンカーを介して同じMMとカップリングしたABを作製した。

【0331】

MMのマスキング効率は、ABに対するMMの親和性およびABとその標的との結合の妨害に対するMMの空間的な関係性によって決定することができる。有効なMMの発見は、親和性および任意選択でマスキング効率の経験的尺度に基づく。改変抗体またはAA中のMMの時間依存性の標的置換は、MMについて最適化および選択するために測定することができる。免疫吸着標的置換アッセイ(TDA)は、効率的にマスキングされた抗体の発見および妥当性確認のために本明細書中に記載されている。

10

【0332】

TDAアッセイでは、治療上関連性のある濃度および時間における、ABとその標的との結合を阻害するMMの能力を測定する。このアッセイにより、MMの時間依存性の標的置換が可能となる。

【0333】

手短に述べると、抗体標的を、ELISAプレートのウェルに、終夜、約4で吸着させる。約150μlのPBS中の2%の無脂肪粉乳(NFDM)、約0.5%(v/v)のTween20(PBST)を加えることによってプレートを遮断し、室温で約1時間インキュベーションする。その後、プレートをPBSTで約3回洗浄する。約50μlのsuperblockを加え(Thermo Scientific)、プロテアーゼ阻害剤(Complete, Roche)を添加する。約50μlのMMとカップリングしたABを、プロテアーゼ阻害剤(Complete, Roch)を含むsuperblockに溶かし、約37で様々な一定期間の間インキュベーションする。プレートをPBSTで約3回洗浄する。約100mlの抗huIgG-HRPを約2%のNFDM/PBST中で加え、室温で約1時間インキュベーションする。プレートをPBSTで約4回、PBSで約2回洗浄する。アッセイは、TMB(Thermo Scientific)を用いて、製造者の指示に従って展開する。

20

【0334】

(実施例4)

ABとしてscFvを含むAA

抗Jagged1 scFvを含むAAの例を本明細書中に記載する。これらのAAは、付着したMMが原因で、正常な条件下では不活性である(マスキングされている)。しかし、scFvが疾患部位に達した際、ADAM17などの疾患に特異的な酵素がペプチド阻害剤をscFvと接続している基質リンカーを切断して、それがJagged1と結合することが可能となる。細菌細胞表面ディスプレイを使用して抗Jagged1 scFvの適切なMMを見つける。この例では、選択されたMMを、プロテアーゼで活性化した後、標的化結合に適格となるscFv構築体を作製するためのトリガーとして使用する酵素基質と合わせる。

30

【0335】

プロテアーゼで活性化される抗体の構築

Jagged1抗体を単鎖形態で含むAAをコードしている遺伝子を重複伸長PCRまたは全遺伝子合成によって生成し、同様に消化した発現プラスミドまたは当業者が精通した任意の他の適切な細菌、酵母、もしくは哺乳動物発現ベクター内にライゲーションする。あるいは、半減期延長部分(たとえば、IgGのFc領域、血清アルブミン、またはトランスフェリン)を組み込んだ市販の発現ベクターおよび当業者が精通した方法を用いて完全長抗体を生成することができる。その後、発現プラスミドを、E.coliのBL21またはHEK293t細胞などの適切な発現宿主内に形質転換またはトランスフェクトする。単鎖抗体を、ペリプラズム画分抽出キット(Pierce)を用いて終夜培養物から収集し、固定金属イオンアフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマト

40

50

グラフィーによって精製する。

【0336】

*in vitro*の抗体の切替活性のアッセイ

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

10

【0337】

(実施例5)

抗VEGF scFv ABのクローニング

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

20

【0338】

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

30

40

【0339】

【表7】

表7:抗VEGF scFv ABのヌクレオチド配列

gataftcaactgaccagagcccttctcctgagtgccagcgtgggtgaccgtgtacgatactgctcggccagccaagatatttetaactacctgaatt
ggfaccagcagaagccaggaaggcaccaaaagtcctgactcactcacaagctcactgcaftccggcgaccgctcgcgctttagcgggtctggcagtg
taccgactcaccctgactatctcagctctgcaacctgaggatttctacatactgctcagcaatattcgaccgtgcccgtggacgtcgggcagggcac
caaagtggagattaaggggggtggagggcagcgggggaggtggctcagcgggtggagggctggcgaggtccagctggtagaaagcggggcgg
actggtccaaccggggcggatccctgctctgagctgctggcggcctgggttacgacttactactacggaatgaactgggtcggccaagccctgtaaa
ggctcggaaatgggtcggatggaatafacatacactggagaacctactatgctgctgattcacaacgctccttacttctctggatacaagtaagtaac
cgctatctgcaaatgaaacgcctcgtgcagaggacacggctgtgtactattgtcgaaataccttattatggaactfcccactggatttcgatgat
ggggccaggtactctgggtacagtgctc

50

【 0 3 4 0 】

【 表 8 】

表8:抗VEGF scFv ABのアミノ酸配列

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGVWINTYTGPEPTYAADFRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLVTVS
--

(実施例 6)

抗 V E G F s c F v の M M の ス ク リ ー ニング および 同定

ラニビズマブを用いて、 X_{15} (8.3×10^9)、 $X_4 C X_7 C X_4$ (3.6×10^9)、または $X_{12} C X_3$ (1.1×10^9) であるペプチド [式中、X は任意のアミノ酸であり、数字はライブラリの多様性の合計を表す] からなるプールしたランダムペプチドライブラリをスクリーニングした。プールしたライブラリの多様性の合計は 1.3×10^{10} であった。スクリーニングは、1 ラウンドの M A C S および 2 ラウンドの F A C S 分別からなっていた。第 1 ラウンドの M A C S スクリーニングでは、 1×10^{11} 個の細胞を 150 nM のビオチン標識したラニビズマブでプロービングし、 5.5×10^7 個の結合細胞が単離された。第 1 の F A C S スクリーニングでは、M A C S スクリーニングで単離された陽性細胞を、500 nM のビオチン標識したラニビズマブでプロービングし、
neutravidin-PE (Molecular Probes、Eugene、OR) で可視化した。第 2 および第 3 ラウンドの F A C S 選択は、500 nM、その後 100 nM の Alexa で標識したラニビズマブを用いて、20 μ M の IgG の存在下で行った。個々のクローンを配列決定し、続いて、F A C S 分析によって抗 V E G F s c F v と結合するその能力を確認した。抗 V E G F s c F v の M M のアミノ酸配列を以下の表 9 に提供する。(これらの配列は、本明細書中以降、283 MM、292 MM、306 M M などと呼ぶ)

【 0 3 4 1 】

【 表 9 】

表9:抗VEGF scFvのMM

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

(実施例 7)

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

【 0 3 4 2 】

【表 10】

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

CX0233 5' gaattcatgggcccaccatcaccatcacggg3'
CX0249 5' gtgagtaagcttttattacgacctgaaccagatccctgg3'
CX0270 5' gtgcatgtgcaactggcccactggcccactgagctggccagactggcctgaaaatacagatttccc3'
CX0271 5' gagtgggccaaggtggccaagtgcacatgccactggctctctggctcggggggtttgatattcaactgaccagagcc3'
CX0288 5' ttcgagctgaacaacaacaacaataacaataacaacaac3'
CX0289 5' gcttaccgcaggtacttccgtagctggccagctg3'
CX0290 5' cgtccatggcccactggccgctgccaccagaaccg3'
CX0308 5' gccagccggccatggccggccagctggccagctgag3'
CX0310 5' ccagtccaagcttttagtggtagtgatgagacactgtaaccagatccctggcc3'
CX0312 5' cttgacgaattggccagctggccagctgag3'
CX0314 5' cagatcaaccatggcgctaccgcccagactgtaaccagatccctg3'

10

M B P 融合体としての A A : M M P - 9 で切断可能なマスキングされた抗 V E G F s c F v のクローニングおよび発現

クローニング : M B P : 抗 V E G F s c F v A B の融合体をクローニングした。M B P (マルトース結合タンパク質) は、融合タンパク質として E . c o l i 中で良好に発現され、融合タンパク質を作製するための当分野で周知の方法であるマルトースカラム上で精製することができる。本実施例では、M B P を用いてマスキングされた s c F v を分離した。H i s 6 タグ付けした抗 V E G F s c F v A B を、p M a l - c 4 x ベクター (N E B) 内に、M B P との C 末端融合体として、複数クローニング部位 (M C S) 中の E c o R I および H i n d I I I 制限部位を用いてクローニングした。プライマー C X 0 2 3 3 および C X 0 2 4 9 (表 1 0) を使用して、抗 V E G F s c F v A B を増幅し、E c o R I および H i n d I I I 部位をそれぞれ導入した。

20

【0343】

A A (ペプチド M M 、抗 V E G F s c F v A B および M M P - 9 C M) の受容ベクターを、重複するプライマー C X 0 2 7 1 および C X 0 2 7 0 を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を使用して合成し、これにより、ペプチド M M 、リンカー配列、および M M P - 9 C M プロテアーゼ部位のクローニング部位が T E V プロテアーゼ部位と抗 V E G F s c F v A B との間に配置された。プライマー C X 0 2 7 1 および C X 0 2 4 9 (表 1 0) を用いて構築体の C 末端部分を増幅し、一方で、プライマー C X 0 2 7 0 および C X 0 2 8 8 (表 1 0) を用いて N 末端部分を増幅した。上記反応の両方からの生成物を合わせ、外部プライマー C X 0 2 4 9 および C X 0 2 8 8 (表 1 0) を用いた最終 P C R 反応を行い、S a c I および H i n d I I I 制限部位を用いて M B P 融合体として p M a l ベクター内にクローニングした。

30

【0344】

【表 11】

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

atggccatcaccatcaccatcacgggaaaatctgatttaccggccagctggccagctcagtgaggccaaggtggccaagtgcacatgccac tggcctctgggctcggggggtctgatattcaactgaccagagccctctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatcactgctggcca gccaagatatttcaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggccaaaagtctgatctacttacaagttactgcattccggcgtaccg tcgcctttagcgggtctggcagtggtaccgacttaccctgactatctcagtgctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcgaatattcagcgt gccgtggagcttggcaggccaccaaagtggagafaaaggggtggaggcagcgggggaggtggctcaggcgggtgagggcttgccgaggtc cagctggtgaaagcgggggggactgggtccaaccggcgatccctcgctgctgagctgcgcggcctcgggttacgacttactactacggaatgaa ctgggttcgccaagccctggtaaaggtctggaatgggtcggatggaatgaaatacatatactggagaacctacttctgctgctgattcacaacgtcgttact ttctcttgatacaagtaagtaaccgctatctgcaatgaacagcctgcgtgcagaggacacggctgtgactattgtgcgaaatacttattatgg aacttccactggtatttcgatgfatgggcccaggtactctggtfacagtgctg

40

3 0 6 M M および 3 1 4 M M (表 9) を、プライマー C X 0 2 8 9 および C X 0 2 9 0 (表 1 0) を用いて e c p X ディスプレイベクターから増幅し、S f i I 制限部位を用いて N 末端がマスキングされたベクター内に指向的にクローニングした。対応するヌクレオチドおよびアミノ酸配列を以下の表 1 2 に提供する。

【0345】

50

【表 1 2】

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

MBP / 306 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv ABのヌクレオチド配列	
atgggccatcaccatcaccatcacgggtggggaaaatctgtatttcaggggccagtctggccagccggtgtctgagtgccagtcgatggtgcagccgcgtt gctattatggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagtgccatgccactgggctcctgggtccggcggttctgatattcaactgacca gagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgacacttgcctggccagccaagatatttcaactacctgaattggtaccagcagaagcc aggaaggcaccaaaagtctgatctacttcacaagttcactgcattccggcgtaccgtcgcgttttagcgggtctggcagtggtaccgactcacctga ctatctcagctctgcaacctgaggattttgtacatattactgtcagcaatattcgaccgtgccgtggacgttcggcagggcaccaaaaggaggattaagg ggggtggaggcagcgggggagggtgctcaggcgggtggagggtctggcaggtccagctggtagaagcggggcgactggtccaaccggggc gatccctgcgtctgagctgcggcctcgggttacgacttactactacggaatgaactgggttcgccaagccctggtaaaggcttggaaatgggtcgg atggattaatacatacactggagaacctactatgctgctgatttcaaacgtcgccttacttctctctggatacaagtaagtaaccgctatctgcaaatgaa cagcctgcgtgcagaggacacggctgtgtactattgtcgaataatccttattattatggaactcccactggtatttcgatgatggggccagggtactctg gttacagtctc	10
MBP / 306 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv ABのアミノ酸配列	
MGHHHHHHGGENLYFQGQSQPCSEWQSMVQPRCYGGGSGGSGQGQVHMPGLGFLGPGG SDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVTPWTFGGQTKVEIKGGGGSGGGGSGG GGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVWGWINTYTG EPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQG TLVTVS	
MBP / 314 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv ABのヌクレオチド配列	
atgggccatcaccatcaccatcacgggtggggaaaatctgtatttcaggggccagtctggccagccgcccgggtgttgcctgattatagatatttggagtc tgaagagtgatggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagtgccatgccactgggctcctgggtccggcggttctgatattcaactgacct agagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgacacttgcctggccagccaagatatttcaactacctgaattggtaccagcagaagc caggaaaggcaccaaaagtctgatctacttcacaagttcactgcattccggcgtaccgtcgcgttttagcgggtctggcagtggtaccgactcacctg actatctcagctctgcaacctgaggattttgtacatattactgtcagcaatattcgaccgtgccgtggacgttcggcagggcaccaaaaggaggattaag gggggtggaggcagcgggggagggtggctcaggcgggtggagggtctggcaggtccagctggtagaagcggggcgactggtccaaccggggc ggatccctgcgtctgagctgcggcctcgggttacgacttactactacggaatgaactgggttcgccaagccctggtaaaggcttggaaatgggtc gatggattaatacatacactggagaacctactatgctgctgatttcaaacgtcgccttacttctctctggatacaagtaagtaaccgctatctgcaaatga acagcctgcgtgcagaggacacggctgtgtactattgtcgaataatccttattattatggaactcccactggtatttcgatgatggggccagggtactct ggttacagtctc	20
MBP / 314 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv ABのアミノ酸配列	
MGHHHHHHGGENLYFQGQSQRPPCCRDYSILECCKSDGGSGGSGQGQVHMPGLGFLGPG GSDIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVTPWTFGGQTKVEIKGGGGSGGGGSGG GGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVWGWINTYTG GEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQ GTLVTVS	30

発現：MBP：AAの融合体の発現をE.coliのK12 TB1株中で実施した。所望の構築体を含むアンピシリン耐性コロニーを用いて、50 μg/mLのアンピシリンを添加したLB培地を含む5 mLの終夜培養液に接種した。終夜培養液全体を用いて、500 mLの、50 μg/mLのアンピシリンおよび0.2%のグルコースを添加した新鮮なLB培地に接種し、37℃、250 rpmの振盪で、O.D. 0.5に達するまで成長させた。その後、イソプロピルチオ-D-ガラクトシダーゼを最終濃度0.3 mMまで加え、培養物をさらに3時間、同じ条件下で成長させ、その後、3000 × gの遠心分離によって細胞を収集した。標準の方法を用いて封入体を精製した。手短に述べると、10 mLのBPER II細胞溶解試薬(Pierce)。不溶性物質を14,000 × gの遠心分離によって収集し、可溶性タンパク質を廃棄した。不溶性物質を、1 mg/mLのリゾチームを添加した5 mLのBPER IIに再懸濁させ、氷上で10分間インキュベーションし、その後、水で1:20に希釈した5 mLのBPER IIを加え、試料を14,000 × gで遠心した。上清を除去し、ペレットを1:20のBPER IIで2回洗浄した。精製した封入体をPBS、8 Mの尿素、10 mMのBME、pH 7.4に溶かした。

【0346】

10

20

30

40

50

M B P融合タンパク質を約1 m g / m Lの濃度まで希釈し、P B S、p H 7 . 4中、8 ~ 0 Mの尿素、6、4、2、0 . 5、および0 Mの尿素での段階的な透析を用いて再折り畳みさせた。4、2、および0 . 5 Mの尿素の段階で、0 . 2 Mのアルギニン、2 m Mの還元グルタチオン、および0 . 5 m Mの酸化グルタチオンを加えた。0 Mの尿素の透析には0 . 2 Mのアルギニンを含めた。尿素を除去した後、タンパク質を0 . 0 5 Mのアルギニンに対して透析し、次いでP B S、p H 7 . 4に対して大量透析した。すべての透析は4、終夜で実施した。凝集体を除去するために、それぞれのタンパク質をs e p h a c r y l S - 2 0 0カラム上のサイズ排除クロマトグラフィーに供した。正しく折り畳まれたタンパク質を含有する画分を、A m i c o n U l t r a遠心フィルターを用いて濃縮した。

10

【 0 3 4 7 】

A A : M M P - 9で切断可能なマスキングされた抗V E G F s c F v C H i s タグのクローニングおよび発現

クローニング：プライマーC X 0 3 0 8およびC X 0 3 1 0（表10）を使用して、（M M受容部位 / M M P - 9 C M / V E G F s c F v A B）ベクターを増幅し、そのそれぞれN c o I制限部位を5'末端に付加し、H i n d I I I制限部位およびH i s 6 タグを3'末端に付加し、続いてこれを、p e l Bシグナルペプチドを含有するベクター内にクローニングした。既に記載のように抗V E G F s c F v M Mをクローニングした。対応するヌクレオチドおよびアミノ酸配列を表13に提供する。

20

【 0 3 4 8 】

【 表 1 3 】

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

<p>306 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv CHis ABのヌクレオチド配列</p> <pre>ggccagctctggccagcggcgttctgagtgccagtcgatgtgcagccgcgttctattatggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagt gcacatgccactgggcttctgggtccggcggttctgatattcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatca cttctcggccagcaagatatttctaactacctgaattgtaccagcagaagccaggaaggcaccacaaaagctctgatctacttcaagttcactgcatt ccggctaccgtcgcctttagcgggtctggcagtggtaccgacttaccctgactatctgagcttcaacctgaggattttgctacatattactgtcagca atattcgaccgtcgcgtggagcgtcgggcagggcaccacaaagtgagattaaggggggtggaggcagcgggggaggtgctcagggcgtggagggt ctggcgaggtccagctggttagaaaagcggggcgactggtccaaccggggcagatccctgcgtctgagctgcgcggcctgggttacgactttactcac tacggaatgaactgggtcggcaagccctggtaaaggtctggaatgggtcggatgattatacactggagaacctacttatgctgctgatttcaaa cgtcgccttactttctctctggatacaagtaagtaaccgcctatctgcaaatgaacagcctgcgtgcagaggacacggctgtgactattgtgcgaaatctc cttattattatggaacttccactggfatttcgatgtatggggccagggtactctggttacagtgctcatcatcaccatcaccac</pre>	30
<p>306 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv CHis ABのアミノ酸配列</p> <pre>GQSGQPCSEWQSMVQPRCYYGGGSGGSGQGQVHMPLGFLGPGGSDIQLTQSPSSLSASV GDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGPTYAADFKRRFTFSL DTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSWYFDVWGQGLTVTVSHHHHHH</pre>	
<p>314 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv CHis ABのヌクレオチド配列</p> <pre>ggccagctctggccagcggcggcggcgttggcgtgattatagattttggagtgctgtaagagtgatggcgggttctggtggcagcggccaaggtggccaag gtgcacatgccactgggcttctgggtccggcggttctgatattcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgat cactgtctggccagccaagatatttctaactacctgaattgtaccagcagaagccaggaaggcaccacaaaagctctgatctacttcaagttcactgc attccggcgtaccgtcgcctttagcgggtctggcagtggtaccgacttaccctgactatctgagcttcaacctgaggattttgctacatattactgtcag caatattcgaccgtcgcgtggagcgtcgggcagggcaccacaaagtgagattaaggggggtggaggcagcgggggaggtggctcaggcgggtggagg gtctggcgaggtccagctggttagaaaagcggggcgactggtccaaccggggcagatccctgcgtctgagctgcgcggcctgggttacgactttactc actacggaatgaactgggtcggcaagccctggtaaaggtctggaatgggtcggatgattatacactggagaacctacttatgctgctgatttca aacgtcgccttactttctctctggatacaagtaagtaaccgcctatctgcaaatgaacagcctgcgtgcagaggacacggctgtgactattgtgcgaaata tcttattattatggaacttccactggfatttcgatgtatggggccagggtactctggttacagtgctcatcatcaccatcaccactaa</pre>	40
<p>314 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv CHis ABのアミノ酸配列</p> <pre>GQSGQRPPCCRYSILECKSDGGSGGSGQGQVHMPLGFLGPGGSDIQLTQSPSSLSAS VGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGPTYAADFKRRFTFS LDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSWYFDVWGQGLTVTVSHHHHHH</pre>	

発現：抗VEGF scFv His AAの発現をE. coliのK12 TB1株中で実施した。所望の構築体を含有するアンピシリン耐性コロニーを用いて、50 µg/mLのアンピシリンを添加したLB培地を含有する5 mLの終夜培養液に接種した。2.5 mLの終夜培養液を用いて、250 mLの、50 µg/mLのアンピシリンおよび0.2%のグルコースを添加した新鮮なLB培地に接種し、37 °C、250 rpmの振盪で、O.D. 1.0に達するまで成長させた。その後、イソプロピルチオ-D-ガラクトシダーゼ (galactosidase) を最終濃度0.3 mMまで加え、培養物をさらに5時間、30 °Cで成長させ、その後、3000 × gの遠心分離によって細胞を収集した。リゾチーム/浸透圧ショック方法を用いてペリプラズム画分をすぐに精製した。手短に述べると、細胞ペレットを3 mLの50 mMのトリス、200 mMのNaCl、10 mMのEDTA、20%のスクロース、pH 7.4に再懸濁させ、2 µL/mLのすぐ使用できるリゾチーム溶液を加えた。15分間氷上でインキュベーションした後、1.5倍体積の水(4.5 mL)を加え、細胞を氷上でさらに15分間インキュベーションした。可溶性ペリプラズム画分を14,000 × gの遠心分離によって回収した。

10

【0349】

Ni-NTA樹脂を用いて抗VEGF scFv Hisタンパク質を部分精製した。粗ペリプラズム抽出物を0.5 mLのNi-NTA樹脂上に載せ、50 mMのホスフェート、300 mMのNaCl、pH 7.4で洗浄した。Hisタグ付けしたタンパク質を50 mMのホスフェート、300 mMのNaCl、200 mMのイミダゾール (Imidazole)、pH 6.0で溶出させた。タンパク質を約600 µLまで濃縮し、Amicon Ultra遠心濃縮器を用いて緩衝液をPBSに交換した。

20

【0350】

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

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

30

【0351】

【表 1 4】

表14:306MM/MMP-9CM/抗VEGF scFv-Fc ABの配列

<p>306 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv-Fc ABのヌクレオチド配列</p> <pre> ggccagctctggccagccgctgtctgagtgccagctgatggcagccggctgtctattatggggggcgttctggcgcagcggccaaggtggccaagtg cacatgccactgggcttctgggtccggggcgggtctgatattcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtttacgateactf gctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagctctgatctactcacaagttactgcattccg gcgtaccgtcgcgctttagcgggtctggcagtggtaccgactcaccctgactatctcagctctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagcaatatt cgaccgtcgcgctggacgtcggggcagggcaccaaaagtgagattaaggggggtggagcagcgggggaggtggctcagcgggtggagggtctggc gaggtccagctggtagaaagcggggcgggactggccaaccggggcggatccctgcgtctgagctgcgcggcctggggttacgactttactcactacgg aatgaactgggttcgccaagccctggtaaggtctggaatgggtgggatggattaatacatacactggagaacctactatgctgctgattcaaacgtcg cttactttctctctggatacaagtaagcaaccgectatctgcaaatgaacagcctgcgtgcagaggacacggctgtgactattgtgcgaaatattcctfatta ttatggaacttcccactggatttcgatgatggggccagggactctgggtacagtgctggggcggtagcggcgccatgggttagatctgacaaaaactcacac atgcccaccgtgcccagcactgaactctggggggaccgtcagttctctctctcccccaaaaccaagacacctcctatgatctcccggaccctgag gtcacatgctggtggtggagctgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtagctggagcggctggagggtgcataatgccaagacaaaagcc gcgggaggagcagtaacaacagcactgactggtggtcagctcctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgaaggtct ccaaaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccaaggtgtacacctgccccatcccggga ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctggtcgaaggtctctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggag aacaactacaagaccagcctcccgtgctggaactcagcggctctctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaa cgtctctctatgctccgtgatgcatgagggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgctcgggtaaa </pre>	10
<p>306 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv-Fc ABのアミノ酸配列</p> <pre> GQSGQPCSEWQSMVQPRCYGGGSGGSGQGQVHMPLGFLGPGGSDIQLTQSPSSLSASV GDRVITICSASQDISNYLNWYQKPKGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSL DTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSGGSGAMVRS D KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKLSLSPGK </pre>	20
<p>314 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv-Fc ABのヌクレオチド配列</p> <pre> ggccagctctggccagcggccggcgtgctgctgattatagatattggagtgctgtaagagtgatggcgggttctggcgcagcggccaaggtggccaag tgcacatgccactgggcttctgggtccggggcgggtctgatattcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtttacgatca cttctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagctctgatctactcacaagttactgcattcc cggcgtaccgtcgcgctttagcgggtctggcagtggtaccgactcaccctgactatctcagctctgcaacctgaggattttgctacatattactgtcagcaat attgaccgtgcccgtggacgtcggggcagggcaccaaaagtgagattaaggggggtggagcagcgggggaggtggctcagcgggtggagggtctg gcgaggtccagctggtagaaagcggggcgggactggccaaccgggcggatccctgcgtctgagctgcgcggcctcgggttacgactttactcactac ggaatgaactgggttcgccaagccctgftaaaggtctggaatgggtggatggattaatacatacactggagaacctactatgctgctgattcaaacgt cgcttactttctctctggatacaagtaagcaaccgectatctgcaaatgaacagcctgcgtgcagaggacacggctgtgactattgtgcgaaatattcctta ttatggaacttcccactggatttcgatgatggggccagggactctgggtacagtgctggggcggtagcggcgccatgggttagatctgacaaaaactcac acatgcccaccgtgcccagcactgaactctggggggaccgtcagttctctctctcccccaaaaccaagacacctcctatgatctcccggaccctg aggtcacatgctggtggtggagctgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggagcggctggagggtgcataatgccaagacaaaag ccggggaggagcagtaacaacagcactgactggtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggt ctcaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgg gaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctggtcgaaggtctctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccgg agaacactacaagaccagcctcccgtgctggaactcagcggctctctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg aacgtctctctatgctccgtgatgcatgagggtctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgctcgggtaaa </pre>	30
<p>314 MM / MMP-9 CM / 抗VEGF scFv-Fc ABのアミノ酸配列</p> <pre> GQSGQRPPCCRYSILECKSDGGSGGSGQGQVHMPLGFLGPGGSDIQLTQSPSSLSAS VGDRVITICSASQDISNYLNWYQKPKGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI ISSLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFS LDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGLVTVSGGSGAMVRS DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKLSLSPGK </pre>	40

発現：10 μg の 306 MM / MMP - 9 CM / 抗 V E G F s c F v - F c、314 M M / M M P - 9 C M / 抗 V E G F s c F v - F c または抗 V E G F s c F v - F c の発現ベクターを、transfectamine 2000 (Invitrogen、CA) を

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

【0352】

(実施例8)

マスキングされたMMP-9で切断可能なAAの活性化の測定

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

【0353】

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

200マイクロリットルの、MMP-9消化緩衝液(50mMのトリス、2mMのCaCl₂、20mMのNaCl、100 μ MのZnCl₂、pH6.8)中の200nMの濃度のビオチン標識したAAを、20UのTEVプロテアーゼを用いて終夜、4で消化して、MBP融合パートナーを除去した。その後、試料を3時間、約3UのMMP-9を用いてまたは用いずに37でインキュベーションし、PBST、10%のSuperblock中に最終濃度100nMまで1:1に希釈し、ELISAウェルに加えた。AAの検出は1:7500の希釈率のアビジン-HRP結合体で達成した。MMP-9で切断可能なマスキングされたMBP:抗VEGF scFv AAの、MMP-9による活性化を図5に提示する。

【0354】

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

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

【0355】

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

50マイクロリットルのHEK細胞上清を200 μ lのMMP-9消化緩衝液に加え、約19UのMMP-9を用いてまたは用いずに、2時間、37でインキュベーションした。その後、試料をPBST、10%のSuperblockで1:1まで希釈し、100 μ lをELISAウェルに加えた。AAの検出は1:2500の希釈率の抗ヒトFc-HRP結合体を用いて達成した。MMP-9で切断可能なマスキングされた抗VEGF scFv-Fcの、MMP-9による活性化を、図7に提示する。

【0356】

10

20

30

40

50

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

抗VEGF scFv-Fc AAを、タンパク質Aカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。手順に述べると、10 mLのHEK細胞上清をPBSで1:1に希釈し、PBSで事前に平衡化した0.5 mLのタンパク質A樹脂に加えた。カラムを10倍カラム体積のPBSで洗浄した後、結合したタンパク質を170 mMのアセテート、300 mLのNaCl、pH 2.5で溶出させ、1 mL画分を200 μ Lの2 Mのトリス、pH 8.0ですぐに中和した。その後、Amicon Ultra遠心濃縮器を用いてタンパク質を含有する画分を濃縮した。ELISAをHEK細胞上清と同様に実施した。タンパク質Aカラムを用いて精製された、MMP-9依存性のVEGFとMM306および314を含有する抗VEGF scFv-Fc AA構築体との結合を示すELISAデータを図8に提示する。

10

【0357】

(実施例9)

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

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

20

【0358】

(実施例10)

抗CTLA4 MMのライブラリスクリーニングおよび単離

Bessetteら(Bessette, P.H., Rice, J.JおよびDougherty, P.S., Rapid isolation of high-affinity protein binding peptides using bacterial display, Protein Eng. Design & Selection, 17巻:10号, 731~739頁, 2004年)の方法に従って、CTLA4抗体マスキング部分(MM)をE.coliの表面上に表示される 10^{10} 個のランダムな15量体ペプチドのコンビナトリアルライブラリから単離した。ビオチン標識したマウス抗CTLA4抗体(クローンUC4 F10-11, 25 nM)をライブラリと共にインキュベーションし、ストレプトアビジンでコーティングした磁気ナノビーズを用いて、推定上の結合ペプチドを発現する、抗体と結合した細菌を、結合しないものから磁氣的に分別した。続いてFACSを用いて濃縮ラウンドを実施した。FACSの初回ラウンドでは、細菌をビオチン標識した標的(5 nM)を用いて分別し、二次標識ステップではストレプトアビジン(streptavidin)フィコエリスリンを用いた。FACSの続くラウンドでは、分別はDyLightで標識した抗体を用いて行い、二次標識ステップの結合力効果を回避し、最高の親和性の結合剤を選択するために、標的の濃度を低下させた(1 nM、その後0.1 nM)。1ラウンドのMACSおよび3ラウンドのFACSの結果、結合剤のプールがもたらされ、そこから個々のクローンを配列決定した。個々のクローンの相対親和性および解離速度のスクリーニングは、細菌表面上での複数のペプチドの発現が原因の、二価抗体の結合力効果を低下させるために、フィシンで消化したDyLight標識したFab抗体断片を用いて行った。標的特異性のさらなる試験として、競合相手として20 μ MのE.Coli枯渇IgGの存在下で、個々のクローンを結合についてスクリーニングした。4つのクローンのアミノ酸およびヌクレオチ

30

40

50

ド配列をMMの最適化用を選択し、表15に示す。これらの配列は、互換性があるように115MM、184MM、182MM、および175MMと呼ぶ。一定範囲の解離速度を有するMM候補を選択して、切断後のMM解離に対する解離速度の効果を決定した。抗CTLA4と結合しなかったMMを陰性対照として使用した。

【0359】

【表15】

表15: 抗CTLA4をマスクングするMMのアミノ酸およびヌクレオチド配列

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

10

20

(実施例11)

抗CTLA4 scFvのクローニング

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

30

40

50

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

10

【0360】

【表16】

表16:ハムスター抗マウス CTLA4 V_L

リーダー
<p>M E S H I H V F M S L F L W V S G S C A D I M M T Q S P S S L S V S A G E K A T I S C K S S Q S L F N S N A K T N Y L N W Y L Q K P G Q S P K L L I Y Y A S T R H T G V P D R F R G S G T D F T L T I S S V Q D E D L A F Y Y C Q Q W Y D Y P Y T F G A G T K V E I K atggaatcacatattcatgtcttcatgtccttgggtgtctgggtctgtgcagacatcatgatgaccagtcctctcctcctcctga gtgtgtcagcgggagagaaagccactatcagctgcaagtcagtcagagctcttcaacagtaacgccaaaacgaactactgaactgg tatttgcagaaaccaggcagctcctctaaactgctgatctattatgcaccactagcactagcactgggtcctctgctcctcagagcagtg gatctgggacggatctcctcaccatcagcagtgctccaggatgaagacctggcattttactgtcagcagtggtatgactaccata cacgttccggagctgggaccaaggtggaatcaaa</p>

20

30

【0361】

【表17】

表17:ハムスター抗マウス CTLA4 V_H

リーダー
<p>K M R L L G L L Y L V T A L P G V L S Q I Q L Q E S G P G L V N P S Q S L S L S C S V T G Y S I T S G Y G W N W I R Q F P G Q K V E W M G F I Y Y E G S T Y Y N P S I K S R I S I T R D T S K N Q F F L Q V N S V T T E D T A T Y Y C A R Q T G Y F D Y W G Q G T M V T V S S aagatgagactgtgggtctctgtactgtgacagccttctgtgtctgtcccagatccagcttcaggagtcaggacctggcctggt gaaccctcacaatcactgtcctctcttctgtctgtcactgggtactccatcaccagtggtatggatggaactggatcaggcagttcccag ggcagaaggtggagtgatggggtatcatatattatgagggtgacacctactacaaccttccatcaagagcccatctccatcaccagag acacatcgaagaaccagttctctctgcaggtgaattctgtgacctgaggacacagccacatattactgtgcgagacaactgggtact ttgattactgggccaaggaacctggtcaccgtctcctca</p>

40

(実施例12)

MMおよびCMを有する抗CTLA4 scFvの構築

発現および機能のための抗CTLA4 scFvの最適な配向を決定するために、続く「重複伸長によるスプライシング」PCR(SOE-PCR, Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K.およびPease, L.R. (1989年) Engineering hybrid genes w

50

without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension.、Gene、77巻、61～68頁)のために(GGGGS)₃リンカーの半分をNまたはC末端のどちらかに、V_HまたはV_LをN末端に用いて、可変軽鎖および重鎖を個々にPCR増幅するためにプライマーを設計した。ヌクレオチド配列の先頭に開始コドンインフレームで製するためにNdeI制限部位をN末端に操作設計し、HisタグおよびストップコドンをC末端に付加した。その後、外部プライマーを用いたソーイングPCRによって軽鎖および重鎖を一緒にして、V_HV_LおよびV_LV_Hの両方中にScFvを作製した(図10)。

【0362】

10

【表18】

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

VL for1	caaggaccatagcatatggacatcatgatgacccagtct
VL リンカー	
rev1	acttcgcctccacctgatccaccaccaccttgattccacctggctcc
リンカー-VH	
for2	ggatcagggtggagcggaagtggaggtggcggtccagatccagcttcaggagtcagga
VH his rev2	ggccggatccaagcttttagtggatgatgatgatgaggagacggtgacctggctcc
VH for3	acaaggaccatagcatatgcagatccagcttcaggagtc
VH リンカー	
rev3	acttcgcctccacctgatccaccaccacctgaggagacggtgacctggctcc
リンカー-VL for4	ggtggatcagggtggagcggaagtggaggtggcggtccgacatcatgatgacccagctcct
VL his rev4	cgccggatccaagcttttagtggatgatgatgatgattccacctggctccagc

20

次に、MMのクローニング用にsfiおよびxho1部位、次いでMMP-9切断配列および(GGS)₂リンカーをScFv構築体上のN末端に付加するために、1組の重複するプライマーを設計した。これらのプライマーを表19に提示し、図10に模式図を示す。

【0363】

【表19】

表19: MM および CM のクローニング用のプライマー

for 1c リンカー	gccagtctggccggtagggctcgagcgccaagtgcacatgccactgggtctctgggtc
for 1d リンカー VL	gccactgggtctctgggtccgggtggaagcggcggtcagacatcatgatgacccagtc
for 1e リンカー VH	gccactgggtctctgggtccgggtggaagcggcggtcagacatccagcttcaggagtc
for 1a	ttaccaacaaggaccatagcatatggccagctctggccggtagggc
VH his rev2	ggccggatccaagcttttagtggatgatgatgatgaggagacggtgacctggctcc
VH リンカー rev3	acttcgcctccacctgatccaccaccacctgaggagacggtgacctggctcc

30

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

【0364】

40

【表20】

表20:MMリンカー—CM—抗CTLA4 scFvリンカーの配列

アミノ酸配列:	(-----MMリンカー-----)(-----CM-----)(---scFvリンカー---
	G G S G G S G G S S G Q V H M P L G F L G P G G S G G S
ヌクレオチド配列:	
	GGCGGTTCTGTTGGCAGCGGTGGCTCGAGCGGCCAAGTGCACATGCCACTGGGCTT
	CCTGGGTCCGGGTGGAAGCGGCGGCTCA

MM配列をPCR増幅し、sfi1およびxho1部位で消化し、リンカー抗CTLA

50

4 s c F v 構築体内にライゲーションさせ、E . C o l i 内に形質転換させ、配列決定した。MM 1 1 5 - C M - A B の完全なヌクレオチドおよびアミノ酸配列をそれぞれ以下の表 2 1 および 2 2 に示す。

【 0 3 6 5 】

【表 2 1】

表21:MM115-抗CTLA4 ScFv ABのアミノ酸配列

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

10

【 0 3 6 6 】

【表 2 2】

表22:MM115-抗CTLA4 ScFv ABのヌクレオチド配列

atgattttgtgtgcggcggtcgacgtgggtggaggcttgcgctaagttagggcggttctggggcagcgggtgctgagcggccaagtga
catgccactgggcttctgggtccgggtggaagcggcgctcacagatccagcttcaggagtcaggacctggcctgggtaaccctcacatcactgtc
ctctcttctgtctgactggttaccatcaccagtggtatggatggaactggatcaggcagctccaggcagaaggtggagtgatgggattcatata
ttatgagggtagcacctactacaaccttccatcaagagccgcctccatcaccagagacacatcgaagaaccagttctctcaggtgaattctgtgac
cactgaggacacagccacatafactgtgcgagacaaactgggtactttgattactggggccaaggaacctggcaccgtctctcaggtgggtgga
tcaggtggagggcgaagtggaggtggcgggtccgacatcatgatgaccagctctctcctcagtggtgcaggggagagaaagccactatcagc
tgcaagtcagtcagagcttttcaacagtaacgccaaaacgaactacttgaactggtattgcagaaaccagggcagctcctaaactgctgatctattatg
catccactaggcactactggggtcctgatcgttcagaggcagtgatcgggacggattcactcaccatcagcagtgctcaggatgaagacctggc
atfttactgtcagcagtggtatgactaccatacacgtcggagctgggaccagggtggaatcaaacatcaccatcaccactaa

20

MM - CM - 抗 C T L A 4 s c F v - F c の融合体を作製するために、表 2 3 に記載の以下のプライマーを設計して、i n f u s i o n 系 (C l o n t e c h) を介して p f u s e F c ベクター内にクローニングするための構築体を P C R 増幅した。プラスミドを E . c o l i 内に形質転換させ、個々のクローンの配列を確認した。

【 0 3 6 7 】

【表 2 3】

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

HLCTLA4ScFv pFuse 逆方向	tcagatetaaccatggcttggatttccacctggctc
LHCTLA4ScFv pFuse 逆方向	tcagatetaaccatggctgaggagacggtgaccatgg
p115CTLA4 pfuse 順方向	cacttgtcacgaattcagatgatttgggtgtgcgcggc
p182CTLA4 pfuse 順方向	cacttgtcacgaattcgtggcggatggtatgctg
p184CTLA4 pfuse 順方向	cacttgtcacgaattcggctgagcgggtgtgcgcgtg
p175CTLA4 pfuse 順方向	cacttgtcacgaattcagtgatggtcgtatggggag
pnegCTLA4 pfuse 順方向	cacttgtcacgaattcggctgttctgagtgccagctc

30

(実施例 1 3)

H E K - 2 9 3 細胞におけるマスキングされた / M M P - 9 / 抗 C T L A 4 s c F v - F c の発現およびアッセイ

40

1 0 u g の、p 1 7 5 C T L A 4 p f u s e 、 p 1 8 2 C T L A 4 p f u s e 、 p 1 8 4 C T L A 4 p f u s e 、 p 1 1 5 C T L A 4 p f u s e 、 または p n e g C T L A 4 p f u s e の発現ベクターを、t r a n s f e c t a m i n e 2 0 0 0 (I n v i t r o g e n) を製造者のプロトコルに従って使用したトランスフェクションによって、1 0 7 個の H E K - 2 9 3 f r e e s t y l e 細胞 (I n v i t r o g e n) 内に導入した。トランスフェクトした細胞をさらに 7 2 時間インキュベーションした。インキュベーション後、馴化培地を収集し、遠心分離によって細胞および細片を除去した。以下に記載のように馴化培地を E L I S A によって活性についてアッセイした。

50

【 0 3 6 8 】

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

【 0 3 6 9 】

100ulのPBS中のネズミCTLA4 - Fc融合タンパク質(R&D systems)の0.5mg/ml溶液を、96ウェルEasy Washプレート(Corning)のウェルに加え、終夜4 でインキュベーションした。その後、ウェルを1時間、室温(RT)で、100ulのPBS中の2%の無脂肪粉乳(NFDM)を用いて遮断し、その後、PBS、0.05%のTween - 20(PBST)で3x洗浄した。50ulの、MMP - 9で事前に処理していないまたは処理した、MM175 - 抗CTLA4 scFv、MM182 - 抗CTLA4 scFv、MM184 - 抗CTLA4 scFv、MM115 - 抗CTLA4 scFv、またはMMneg - 抗CTLA4 scFvを発現するトランスフェクトしたHEK - 293細胞の培養物からの馴化培地をウェルに加え、RTで15分間インキュベーションした。インキュベーション後、0.5ug/mlのビオチン標識したネズミB71 - Fc(R&D systems)を含有する50ulのPBSをそれぞれのウェルに加えた。RTで30分間さらにインキュベーションした後、ウェルを150ulのPBSTで5x洗浄した。アビジン - HRPの1:3000希釈液を含有する100ulのPBSを加え、プレートをRTで45分間インキュベーションし、その後、150ulのPBSTで7x洗浄した。ELISAを100ulのTMB(Pierce)で展開し、100ulの1NのHCLで停止させ、吸光度を450nmで測定した。

【 0 3 7 0 】

(実施例14)

抗CTLA4の構築

表24および25は、それぞれ抗ヒトCTLA - 4 scFvのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。ヒトCTLAと結合することができるM13バクテリオファージは供給されたものである(契約の元、Creative Biolabs、21 Brookhaven Blvd.、Port Jefferson Station、NY 11776による)。ファージをE. coli TG - 1中で産生させ、PEG、NaCl沈殿によって精製した。

【 0 3 7 1 】

【表24】

表24: 抗ヒトCTLA4 scFv ABのヌクレオチド配列

gaaattgttfgaacacagctccaggcaccctgtttgtctccaggggaagagccaccctctctgcagggccagtcagagtgttagcagcagctactf
agcctggtaccagcagaacctggccaggctcccaggctcctcatctatggtgcatccagcagggccactggcatcccagacaggttcagtgccagtg
ggtctgggacagactcactctaccatcagcagactggagcctgaagatttgcagtgatfactctcagcagtaggttagctaccgctcactttcgccg
gagggaccaaggtggaatcaaacgtccggagggtcaccataacttcgataatgtatactatacgaagtatcctcagcgggtaccaggtgcagct
ggtgcagactggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctctgtgcagcctctggatccaccttagcagctatgccatgagctgggt
ccgccaggtccaggggaagggcgtgagtggtctcagctattagtggtagtggtgtagcacatactacgcagactccgtgaagggccgggtcacca
tctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtcgcacaaactcccftactg
gtacttcgatctctggggccgtggcaccctggcactgtctcttcagctagc

【 0 3 7 2 】

10

20

30

40

【表 25】

表25:抗ヒトCTLA4 scFv ABのアミノ酸配列

```

EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG
SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGGTKVEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQV
QLVQTGGGVVQPGRSLRLSCAASGSTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIAGSGGSTYYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCATNSLYWYFDLWGRGTLVTVSSAS

```

CTLA-4 結合のファージ ELISA 測定: 抗 CTLA-4 scFv - C2 の結合を測定するために、100 μl の PBS 中の 0.5 μg/ml のヒト CTLA-4 - IgG または ネズミ CTLA-4 - IgG (R&D Systems) をマイクロウェル (96 ウェル Easy Wash, Corning) に加え、終夜 4 でインキュベーションした。その後、ウェルを 1 時間、室温 (RT) で、150 μl の PBST (PBS、pH 7.4、0.5% の Tween-20) 中の 2% の無脂肪粉乳 (NFDM) を用いて遮断した。その後、ウェルを 300 μl の PBST で 3 × 洗浄した。洗浄後、100 μl の PBST 中の精製した抗 CTLA-4 scFv ファージを 3 つ組のウェルに加え、RT で 1 時間インキュベーションした。その後、ウェルを 300 μl の PBST で 3 × 洗浄した。その後、100 マイクロリットルの抗 M13 HRP と結合体化した抗体を加え、RT で 1 時間インキュベーションした。HRP の検出は、100 μl の TMB one (Pierce) 溶液を用いて完了した。反応を 100 μl の 1N の HCL で停止させ、吸光度を 450 nm で測定した。図 19 は、抗 CTLA4 scFv とネズミおよびヒト CTLA4 の両方との結合を示す。

10

20

【0373】

AB として IgG を含む AA

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

30

【0374】

(実施例 15)

抗 VEGF IgG AA の構築

抗 VEGF IgG 抗体の構築

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

40

【0375】

【表 2 6】

表26: 抗VEGF IgG抗体を構築するためのプライマー
CX0311 cttgtcacgaattcggatattcaactgaccagagc
CX0702 gtgcagccaccgtacgcttaatctccactttggtg
CX0325 tgcttgcactctacgtc
CX0289 gctttcaccgcaggctactccgtagctggccagtctggcc
CX0687 cgtccatgggccacctggccgctgccaccgctcgagcc
CX0700 cacttgcacgaattcggaggctccagctggtagaag
CX0701 ggcccttgggtgctagcgtcgacactgtaaccagagtac

【 0 3 7 6 】

10

【表 2 7】

表27: 重鎖および軽鎖抗VEGF抗体の配列
pFIL2-CL-hk 抗 -VEGF Lc (pFIL2-VEGF-Lc)
gatatcaactgaccagagccctctccctgagtgccagcgtgggtgaccggtgtacgacactgctcggccagccaagatatttcaactacctgaatt ggfaccagcagaagccaggaagcaccacaaaagctctgatctacttcacaagttcactgcatccggcgaccgctcgcctttagcgggtctggcagtggtg taccgacttcacctgactatctcagctetgcaacctgaggattttgacatattactgacgaatattcgaccgtgccgtggacgtcgggcagggcac caaagtggagattaagcgtacggtggtgctgcaccatctgtcttcctcctccgacctgatgagcagttgaaatctggaactgctctgtgtgtgctgctg aataacttetatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtgataaacgacctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaa ggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaacgacagctacgagaacacaaaagtctacgctcgcgaagtacccatcaggcctg agctcggccgtcacaaagagctcaacaggggagagtgttag
DIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

20

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

【 0 3 7 7 】

30

親和性成熟のためのライブラリの構築

ソフトランダム化手法を用いることによって306抗VEGF MMを親和性成熟させた。ecpX細胞ディスプレイライブラリを表28に示すヌクレオチド比で構築した。最終的なライブラリの多様性(306SR)は約 2.45×10^8 であった。

【 0 3 7 8 】

【表 2 8】

表 28

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

40

306SRライブラリスクリーニング

初回のMACSラウンドは、タンパク質Aで標識した磁気ビーズおよびライブラリの100xを超える過剰サンプリングを提供するいくつかの細胞を用いて行った。磁気選択の前に、細胞を100nMの抗VEGF IgGおよび10μMの306ペプチド(306P、PCSEWQSMVQPRCYYG)と共にインキュベーションして、元の306配列に等しいまたはそれよりも低い親和性を有する変異体の結合を減らした。磁気選択により 2×10^7 個の細胞の単離がもたらされた。

50

【0379】

第1ラウンドのFACS分別は、1 nMのDyLight (fluor 530 nM) - 抗VEGFで標識した細胞上で行った。集団に選択圧をかけるために、第2および第3ラウンドのFACSは、1 nMのDyLight - 抗VEGFで標識した細胞を用いて、100 nMの306Pの存在下で行った。選択ゲートは、最も強い結合を有する細胞の5%のみが収集されるように設定した。第3ラウンドで分別された細胞の集団を最初に10 nMのDyLight - 抗VEGFと共にインキュベーションし、次いで306Pを最終濃度100 nMまで加え、37 で20分間インキュベーションした。陽性集団の最も明るい2%を収集し、これは、306Pによって競合されない結合を表す。FACSラウンド5~7は以下のとおりに行った：集団を、10 nMのDyLightで標識した抗VEGFで標識し、その後、標識されていないVEGF (100 nM) を37 で、それぞれ7、10、および15分間、競合により除去した。最も明るい1%がFACSラウンド5~7で分別された。

10

【0380】

【表29】

表 29

306SR M1F7 ペプチドの配列

JS306 PCSEWQSMVQPRCYYG
 JS1825 SCTAWQSMVEQRCYFG 3X
 JS1826 PCSKWESMVEQRCYFA
 JS1827 PCSAWQSMVEQRCYFG 2X
 JS1829 PCSKWESMVLQSCYFG 4X
 JS1830 TCSAWQSMVEQRCYFG 2X
 JS1837 TCSQWESMVEPRCYFG

20

306SR 親和性成熟したペプチドの分析

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

30

【0381】

抗VEGF AAの構築

親和性成熟したeCPX3.0クローン(JS1825、JS1827、およびJS1829)を、プライマーCX0289およびCX0687を用いてPCR増幅し、SfiI制限部位を用いてpFIL2-306mVEGF-Lc内にクローニングして、ベクターpFIL2-1825mVEGF-Lc、pFIL2-1827mVEGF-Lc、およびpFIL2-1829mVEGF-Lcを生成した。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を以下の表に提供する。括弧は様々な配列のドメイン間の境界を示す：(リンカー)(MM)(リンカー)(CM)(リンカー)(AB)。

【0382】

40

【表 3 0】

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

ggccagtctggccagcgggtctgagtgccagtcgatgggtgcagccgcgttctattatggggcggtctggtggcagcggccaaggtggccaagt
gcacatgccactgggtctctgggtccggcggtctgatattcaactgaccagagccctcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatca
cttgctggccagccaagataatttcaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtctgatctactcacaagttactgcatt
ccggcgtaccgtgcgctttagcgggtctggcagtggtaccgactcaccctgactatctcagctctgcaacctgaggattttgctacataactgtcagca
atattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaaagtgagattaagcgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagc
agttgaaatctggaactgcctctggtgtgctcctgctgaataacttctatccagagaggccaaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggt
aactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcaccctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaaca
caaaagtctacgctcgaagtcaccatcaggcctgagctcggcctcacaagagcttcaacaggggagagtgtag

リンカー MM リンカー CM リンカー AB
(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GSGSGSQGG)(QVHMPLGFLGP)(GGS)(DIQLTQSPSSLSA
SVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC)

10

【 0 3 8 3】

【表 3 1】

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

ggccagtctggccagcgggtctgagtgccagtcgatgggtggagcagcgttctattttggggcctcagcgggtggcagcggccaaggtggccaag
tgcacatgccactgggtctctgggtccggcggtctgatattcaactgaccagagccctcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatc
actgtctggccagccaagataatttcaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtctgatctactcacaagttactgcatt
tccggcgtaccgtgcgctttagcgggtctggcagtggtaccgactcaccctgactatctcagctctgcaacctgaggattttgctacataactgtcagc
aatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaaagtgagattaagcgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgag
cagttgaaatctggaactgcctctggtgtgctcctgctgaataacttctatccagagaggccaaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcaccctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaaca
caaaagtctacgctcgaagtcaccatcaggcctgagctcggcctcacaagagcttcaacaggggagagtgtag

リンカー MM リンカー CM リンカー AB
(GQSGQ)(SCTAWQSMVEQRCYFG)(GSSGSGSQGGQ)(VHMPLGFLGP)(GGS)(DIQLTQSPSSLSA
SVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC)

20

30

【 0 3 8 4】

【表 3 2】

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

ggccagtctggccagcgggtctgagtgccagtcgatgggtggagcagcgttctattttggggcctcagcgggtggcagcggccaaggtggccaag
tgcacatgccactgggtctctgggtccggcggtctgatattcaactgaccagagccctcttccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatca
cttgctggccagccaagataatttcaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaaggcaccaaaagtctgatctactcacaagttactgcatt
ccggcgtaccgtgcgctttagcgggtctggcagtggtaccgactcaccctgactatctcagctctgcaacctgaggattttgctacataactgtcagca
atattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccaaaagtgagattaagcgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagc
agttgaaatctggaactgcctctggtgtgctcctgctgaataacttctatccagagaggccaaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggt
aactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcaccctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaaca
caaaagtctacgctcgaagtcaccatcaggcctgagctcggcctcacaagagcttcaacaggggagagtgtag

リンカー MM リンカー CM リンカー AB
(GQSGQ)(PCSAWQSMVEQRCYFG)(GSSGSGSQGGQ)(QVHMPLGFLGP)(GGS)(DIQLTQSPSSLSA
SVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC)

40

50

【 0 3 8 5 】

【 表 3 3 】

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

ggccagctctggccagccgtgttctaagtgggaatcgatgggtgctgcagagttgctattttggcggctcgagcgggtggcagcggccaaggtggccaagtg
cacatgccactgggcttctgggtccgggcggttctgatattcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatcact
tgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaggcaccaaaagctctgacttaccacaagttcactgcattcc
ggcgtaccgtcgcgcttttagcgggtctggcagtggtaccgacttaccctgactatctcgagctctgcaacctgaggatfttctacataactgtcagcaat
attcgaccgtccgtggacgttcgggcagggcaccaaagtggagattaagcgtacgggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagca
gttgaatctggaactgcctctgtgtgctcgtgaataacttctatcccagagaggccaagtacagtggaagggtgataacgccctccaatcgggta
actcccagagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaaacac
aaagtctacgctcgaagtcacccatcagggcctgagctcggcctcacaagagcttcaacaggggagagtgtag

10

リンカー	MM	リンカー	CM	リンカー	AB
(GQSQG)	(PCSKWESMVLQSCYFG)	(GSSGGSGQGG)	(QVHMPLGFLGP)	(GGS)	(DIQLTQSPSSLSAS
VGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE					
DFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNRFYPREAKV					
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN					
RGEC)					

抗 V E G F 抗体および A A の発現および精製

3 μ g の p F I L - V E G F - H c および 3 μ g の p F I L 2 - V E G F - L c を、L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 (I n v i t r o g e n) を用いて、製造者のプロトコルに従って、C H O - S 細胞 (I n v i t r o g e n) 内に同時トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を F r e e s t y l e C H O 培地 (I n v i t r o g e n) 中で培養し、ゼオシン (z e o c i n) およびプラストサイジンに対する耐性について選択した。個々のクローンを限界希釈によって単離し、E L I S A によって E G F R と結合することができるヒト I g G の発現について選択した。すべての抗体および A A は、標準の技法を用いたタンパク質 A クロマトグラフィーによって精製した。

20

【 0 3 8 6 】

同様に、3 μ g の A A の軽鎖のそれぞれの発現ベクター p F I L 2 - 3 0 6 m V E G F - L c 、 p F I L 2 - 1 8 2 5 m V E G F - L c 、 p F I L 2 - 1 8 2 7 m V E G F - L c 、 または p F I L 2 - 1 8 2 9 m V E G F - L c を、3 μ g の p F I L - V E G F - H c と共に C H O - S 細胞内に同時トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を F r e e s t y l e C H O 培地 (I n v i t r o g e n) 中で培養し、ゼオシン (z e i o c i n) およびプラストサイジン (b l a s t i c i d i n) に対する耐性について選択した。個々のクローンを限界希釈によって単離し、E L I S A によって E G F R と結合することができるヒト I g G の発現について選択した。

30

【 0 3 8 7 】

抗 V E G F 抗体および A A の標的置換アッセイ

V E G F を 9 6 ウェルマイクロタイタープレートのウェル上に吸着させ、乳タンパク質で洗浄および遮断する。抗 V E G F 抗体または M M J S 3 0 6 、 J S 1 8 2 5 、 J S 1 8 2 7 および J S 1 8 2 9 を含有する抗 V E G F A A を含有する約 2 5 m l の培養培地をコーティングしたウェルに加え、約 1 、 2 、 4 、 8 または 2 4 時間インキュベーションした。インキュベーション後、ウェルを洗浄し、結合した A A の程度を抗 h u I g G 免疫検出によって測定した。

40

【 0 3 8 8 】

(実施例 1 6)

抗 E G F R I g G A A の構築

抗 E G F R I g G 抗体の構築

B e s s e t t e ら、M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y 、第 2 3 1 巻に記載のように、オリゴ C X 6 3 8 ~ C X 6 5 5 を用いて C 2 2 5 軽鎖可変領域の遺伝子をアセンブリ P C R によって合成した。生じた生成物を B a m H I / N o t I

50

で消化し、BamHI/NotIで消化したpXMa1の大きな断片とライゲーションさせ、プラスミドpX-scfv225-Vkを作製した。同様に、オリゴCX656~CX677を用いてC225重鎖可変領域の遺伝子をアセンブリPCRによって合成し、BglII/NotIで消化し、pXMa1のBamHI/NotIとライゲーションさせて、プラスミドpX-scfv225-Vhを作製した。その後、可変軽鎖遺伝子をpX-scfv225-VkからBamHI/NotI断片としてpX-scfv225-Vhプラスミド内にBamHI/NotIでクローニングして、C225に基づくscfv遺伝子を含むプラスミドpX-scfv225m-HLを作製した。

【0389】

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

10

【0390】

ヒトIgG軽鎖定常領域を、プラスミドpFIL2-CL-hkからのオリゴCX325/CX688を用いた増幅、BsiWI/NheIでの消化、およびpFIL2-CL-hkのBsiWI/NheI内へのクローニングによって、部位特異的に突然変異させて、プラスミドpFIL2-CL₂₂₅がもたらされた。

20

【0391】

ヒトIgG重鎖定常領域を、プラスミドpFIL-CHIg-hG1からのオリゴCX325/CX689、CX690/CX692、およびCX693/CX694を用いた3つのセグメントでの増幅、次いで外部プライマーCX325/CX694を用いた3つすべての生成物の重複PCRによって、部位特異的に突然変異させた。生じた生成物をEcoRI(EcoRI)/AvrIIで消化し、pINFUSE-hIgG1-Fc2のEcoRI/NheI内にクローニングして、プラスミドpFIL-CH₂₂₅がもたらされた。

30

【0392】

可変軽鎖遺伝子セグメントをpX-scfv225m-HLからオリゴCX695/CX696を用いて増幅し、BsaIで消化し、pFIL2-CL₂₂₅のEcoRI/BsiWI内にクローニングして、C225軽鎖発現ベクターpFIL2-C225-軽がもたらされた。

【0393】

可変重鎖遺伝子セグメントをpX-scfv225m-HLからオリゴCX697/CX698を用いて増幅し、BsaIで消化し、pFIL-CH₂₂₅のEcoRI/NheI内にクローニングして、C225重鎖発現ベクターpFIL-C225-重がもたらされた。

40

【0394】

【表 3 3】

表33: 抗EGFR IgG抗体構築に使用するプライマー	
CX268	ccgcaggtacctcgagcgctagccagctctggccag
CX325	tgcttgctcaactctacgtc
CX370	aacttgttattgcagctt
CX448	gagttttgctggatccaccagagccaccgctgccaccgctcgagcc
CX638	gcgtatgcaggatccggcggcgatattctgctgaccagaga
CX639	cacgctcagaatcacgggctctgggtcagcagaatacgc
CX640	gcccggtgattctgagcgtgagcccggcggaacgtgtgag
CX641	ggctcgcgcggcagctaaagctcacacgttcgcccgggct
CX642	ctttagctgccgcgcgagccagagcattggcaccacatt
CX643	gtgcgctgctgataccaatgaatgttggtccaatgctct
CX644	cattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgectgc
CX645	ttcgtcgcataattfaatcagcagcgcgggctgccgttg
CX646	tgattaaatgcgagcgaagcattagcggcattccgag
CX647	tcccgtgccgctaaagcggctcggaatgccgctaattgct

CX648	ccgcttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctg	
CX649	ctftccacgcctgtaatgctcagggtaaaateggfgccgc	
CX650	agcattaacacgcgtgaaagcgaagatattgaggattatt	
CX651	gttgtgtctctgctggcaataataatccgcaatattctcg	
CX652	attgccagcagaacaacaactggccgaccacctttggcgc	
CX653	tcagttccagtttggfgecccgccaaaaggfggfgeccca	
CX654	gggcaccaaaactggaactgaaacggcggcccatcaccat	
CX655	ctcccacgcgtatggtgatgatggtgatggcggccgcgtt	
CX656	cgtatgcaagatctggtagcggtaaccagggtgcagctgaa	
CX657	ccaggccccggccgcctctgtttcagctgcacctgggtacc	
CX658	acagagcggccccggcctggfgcagccgagccagagcctg	10
CX659	ctcagggtgcaggtaatgctcaggctctggctcggctgca	
CX660	agcattacctgcaccgtgagcggctttgacctgaccaact	
CX661	gcgcaccaatgcagccatagttggtcaggctaaagccg	
CX662	atggcgtgcattgggtgcgccagagccccgggcaaaaggcct	
CX663	aaatcacccccagccattccaggcctttgccccggcctctg	
CX664	ggaatggctgggcgtgattggagcggcggcaacaccgat	
CX665	ctggtaaacggggfgttataatcggfgttgcggccgctcc	
CX666	tataacacccccgtttaccagccgcctgagcattaacaag	
CX667	cacctggcctttgctgttattcttgaatgctcaggcgg	
CX668	ataacagcaaaagccagggtgtttttaaataaacagcct	
CX669	tcgcggatcgttgcctttgcaggctgttcattttaaaaa	
CX670	gcaaaagcaacgataccgcgattattattgcgcgcgcg	20
CX671	tcataatcataataggtcagcgcgcgcgcaataataaa	
CX672	ctgacctattatgattatgaatttgcgattggggccagg	
CX673	gctcaccgtcaccagggtgccttggccccatacgcgaat	
CX674	gcaccctgggtgaccgtgagcgcgggtggtagcggtagcgg	
CX675	taccgcccctccagatctccgctaccgctaccaccgc	
CX676	aggatctggagcggcggtagtagtggtggaggatccgggt	
CX677	tggtgatggcggcgcggccaccggatctccaccactac	
CX688	cgagctagctccctctacgctcccctgttgaagctctttg	
CX690	acaagcgcgtgagcccaaatctgtg	
CX692	cagttcaccgggatggggcagggtg	
CX693	ccccatcccgggatgaactgaccaagaaccaggctcagc	
CX694	ctggccacctaggactcattfaccc	
CX695	gcactggtctcgaattcggatattctgctgaccagag	30
CX696	ggtgcggctctcgtacgtttcagttccagtttgggtg	
CX697	gcactggtctcgaattcgcagggtgcagctgaaacagag	
CX698	gagacggctctcgtagccgcgctcaggtcaccag	
CX730	tgcgtatgcaagatctggtagcggtagcagatattctgctgaccagag	
CX731	actactaccgcccctccagatctccgctaccgctaccaccttccagttccagtttgggtg	
CX732	tctggagcggcggtagtagtggtggagcctcaggcggccagggtgcagctgaaacagag	
CX733	gatgggtatggcggccgcggcgtcaccggtcaccag	
CX735	tgtcggatccaccgctaccgcccgcgctcaccggtcaccag	
CX740	tcaggaattcgaaggcagctggtccagggtcagcgggtggcagcgggtggtggtggtccggcgggtggca	
CX741	tgggtggtaccggcgggtggcagcgggtggtggtcggcgggtaccggcgggtagcggtagatctgacaaaactcacac	
CX747	gateccccgtctccagcagcaaatgatgccggaaggcgggtac	
CX748	cgcttccggcaccattttgactggcggagacggg	40

抗EGFR AAの発現ベクターの構築

プラスミド pX - scFv 225m - HL を、プライマー CX730 / CX731 および CX732 / CX733 を用いた別々の反応で PCR 増幅し、生じた生成物を、外部プライマー CX730 / CX733 を用いた重複 PCR によって増幅し、Bg1II / NotI で消化し、pXMa1 の BamHI / NotI 内にクローニングして、プラスミド pX - scFv 225m - LH がもたらされた。

【0395】

リンカー配列を、重複順方向プライマー CX740、CX741 および逆方向プライマー CX370 を用いた反応において、pFUSE - hIgG - Fc2 の PCR 増幅によって、ヒト IgG Fc 断片の遺伝子の N 末端側に付加した。生じた生成物を EcoRI /

B g l I Iで消化し、約115bpの断片をp F U S E - h I g G - F c 2のE c o R I / B g l I I内にクローニングした。生じたプラスミドをK p n I / B g l I Iで消化し、大きな断片を、K p n I / B a m H Iで消化した、p X - s c F v 2 2 5 m - L HをオリゴC X 7 3 6 / C X 7 3 5を用いて増幅したP C Rの産物とライゲーションさせて、プラスミドp P H B 3 7 3 4がもたらされた。

【0396】

生じたプラスミドをS f i I / X h o Iで消化し、マスキングペプチド3690をp P H B 3 6 9 0のS f i I / X h o I断片としてクローニングして、プラスミドp P H B 3 7 8 3がもたらされた。

【0397】

生じたプラスミドをB a m H I / K p n Iで消化し、アニーリングの産物であるリン酸化オリゴC X 7 4 7 / C X 7 4 8とライゲーションさせることによって、プロテアーゼ基質S M 9 8 4を付加して、プラスミドp P H B 3 8 2 2がもたらされた。

【0398】

生じたプラスミドをX h o Iで消化し、5'末端を脱リン酸化し、X h o Iで消化した、p P H B 3 5 7 9をプライマーC X 2 6 8 / C X 4 4 8を用いて増幅したP C R産物をクローニングすることによって、タンデムペプチドマスキングを構築して、プラスミドp P H B 3 8 8 9がもたらされた。

【0399】

p P H B 3 7 8 3、p P H B 3 8 2 2、およびp P H B 3 8 8 9のマスキング領域、リンカー、基質、および軽鎖可変領域を、プライマーC X 3 2 5 / C X 6 9 6を用いたP C Rによって増幅し、E c o R I / B s i W Iで消化し、p F I L 2 - C L 2 2 5のE c o R I / B s i W I内にクローニングして、それぞれA A軽鎖発現ベクターp P H B 4 0 0 7、p P H B 3 9 0 2、およびp P H B 3 9 1 3がもたらされた。

【0400】

親和性成熟したマスキングペプチドを、S f i I / X h o I断片としてクローニングすることによってA A軽鎖発現ベクター内に交換した。プロテアーゼ基質はB a m H I / K p n Iに適合性のある断片として交換した。

【0401】

抗E G F R抗体およびA Aの発現および精製

3 μ gのp F I L - C H 2 2 5 - H Lおよび3 μ gのp F I L 2 - C H 2 2 5 - 軽を、L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 (I n v i t r o g e n)を用いて、製造者のプロトコルに従って、C H O - S細胞(I n v i t r o g e n)内に同時トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞をF r e e s t y l e C H O培地(I n v i t r o g e n)中で培養し、ゼオシンおよびブラストサイジンに対する耐性について選択した。個々のクローンを限界希釈によって単離し、E L I S AによってE G F Rと結合することができるヒトI g Gの発現について選択した。すべての抗体およびA Aは、標準の技法を用いたタンパク質Aクロマトグラフィーによって精製した。

【0402】

同様に、3 μ gのA Aの軽鎖のそれぞれの発現ベクターを、3 μ gのp F I L - C H 2 2 5 - H Lと共にC H O - S細胞内に同時トランスフェクトした。トランスフェクトした細胞をF r e e s t y l e C H O培地(I n v i t r o g e n)中で培養し、ゼオシンおよびブラストサイジンに対する耐性について選択した。個々のクローンを限界希釈によって単離し、E L I S AによってE G F Rと結合することができるヒトI g Gの発現について選択した。

【0403】

親和性成熟した抗E G F R M Mライブラリのスクリーニング。

【0404】

初回のM A C Sラウンドは、S A d y n a b e a d sおよびe c p X 3 - 7 5 5ライブラリからの 1.4×10^8 個の細胞を用いて行った。磁気選択の前に、細胞を3 n Mの

10

20

30

40

50

ビオチン標識したC225 Mabと共にインキュベーションした。磁気選択により、 6×10^6 個の細胞の単離がもたらされた。第1ラウンドのFACS分別は、 0.1 nM のDyLight (fluor 530 nM) - C225 Mabで標識した 2×10^7 個の細胞上で行い、 1.5×10^5 個の陽性結合を有する細胞の単離がもたらされた。集団に増加した選択圧をかけるために、第2ラウンドのFACSは、 10 nM のDyLight - C225 Mabで標識した細胞上で、 $100 \mu\text{M}$ の3690ペプチド(CISPRGC)の存在下、37で行った。選択圧をさらに増加させるために、第3および第4ラウンドは、 100 nM のDyLight - C225 Fabで標識した細胞上で、 $100 \mu\text{M}$ の3690ペプチド(CISPRGC)の存在下、37で行った。陽性集団の最も明るい1%を収集し、これは、3690ペプチドによって競合されない結合を表す。上記スクリーニングから単離された個々のクローンの細胞上親和性測定により、C225に対する親和性が3690(CISPRGC)よりも少なくとも100倍高い3つのペプチド、すなわち、3954(CISPRGCPDGPYVM)、3957(CISPRGCPEPTYVPT)および3958(CISPRGCPGQIWHPP)が明らかとなった。これら3つのMMを抗EGFR AA内に組み込んだ。図22は、EGFR MMの一部の親和性成熟のプロセスを示す。

10

【0405】

C225 MMの親和性測定

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

20

【0406】

抗EGFR AAの標的置換アッセイ

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

30

【0407】

【表34】

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

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

40

【0408】

【表 3 5】

<p>表 35: C225 重鎖</p> <p>caggtgcagctgaaacagagcggccccggcctggcagccgagccagagcctgagcattacctgaccgtgagcggctttagcctgaccaactatg gctgctgattgggtgcccagagccccgggcaaggcctggaatggctgggcgtgattggagcggcggcaacaccgattataacaccccgtttaccag ccgctgagcattaacaaagataacagcaaaagccaggtgttttaaaatgaacagcctgcaaaagcaacgataaccgctgatttatttgcgcgcgcgcg ctgacctattatgattatgaatttgcgtattggggccaggccaccctggcagcctgagcgcggctagcaccaggcccatcggttccccctggcac cctctccaagagcaccctgggggacagcggccccggcctggctgctgtaaggactctccccgaaccgggtgaccgtgtcgtggaactcaggcgc cctgaccagcggcgtgcacacctccccggctgctctacagctcagcactctacctccctcagcagcgtgtgaccgtgccccccagcagcttgggcac ccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagcggctgagcccaaatctgtgacaaaactcacaatgcccac cgtgcccagcactgaaactcctggggggaccgtcagcttctcttcccccaaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcaat gctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtaagtcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaagccggcggg aggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctcacaac aaagccctcccagccccatcgaaaaacctctcaaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccgggatgaa ctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtaaaagctctatccccagcagatcctcggagtgaggagcaatgggcagccgggagaaca actacaagaccagcctccctgctgctgactccagcgtctctctctctcagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaactgc ttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaacctctacacgcagaagcctctccctgtctccgggtaaa</p> <p>QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGLVIWSGGNTDYNTPT SRLSINKDNSKSVFFKMNLSQNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>10</p> <p>20</p>
---	---------------------

【 0 4 0 9 】

【表 3 6】

<p>表 36: 3690-SM984-C225 軽鎖の配列</p> <p>Caagccagcttgcccagtgcatctccccgtggtgtggaggctcgagcgggtggcagcgggtgctctggtggatccccgtctccgccagtcaaaat gatgccggaaggcggfaccagatcttgetgaccagagccccgggtattctgagcgtgagccccggcgaacgtgtgagctttagctgccgcgcgagc cagagcattggcaccacaattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagccccgcctctgattaaatagcagcgaagcattagcggcattccg agccgctttagcggcagcggcagcggcaccgafftacctgagcaftaacagcgtggaaaagcgaagatattgaggattatttgcagcagaacaac aactggccgaccacctttggcggggcaccaaactggaactgaaactgacgggtggctgaccatctgctctcctccccgccatctgatgagcagttga aatetggaactgctctgtgtgtgctgctgaataactctatcccagagaggccaaagtacagtgaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcc caggagatgtcacagagcaggacagcaaggacagcaactacagctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacacaaaagt ctacgctgcgaagtcacctcaaggcctgagctcggcgtcacaagagctcaacagggggagc</p> <p>リンカー MM リンカー CM リンカー AB (QGQSGQ)(CISPRG)(GGSSGGSGGSGS)(PSPVKMMPE)(GG)(TQILLTQSPVILSVSPGERVSFS CRASQSIGTNIHWYQQRNNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGA)</p>	<p>30</p> <p>40</p>
---	---------------------

【 0 4 1 0 】

【表 3 7】

表 37: 3579-NSUB-C225 軽鎖の配列

caaggccagctggccagggtcacattgtctcattctattaacatgggcgcgcgctcatcgggctcgagcgggtggcagcgggtgctctggatccg
 gcgggtggcagcgggtggtgctccggcggtaccagatcttctgaccagagcccgggtgattctgagcgtgagcccggcgaaactgtgagctttagc
 tccgcgcgagccagagcattggcaccacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgctgctgattaatatgcgagcgaagcat
 tagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgatttaccctgagcattaacagcgtggaagcgaagataftgcggattattgctc
 cagcagaacaacaactggccgaccaccctllggcgcgggcaccaaaactggaactgaaacglacgggtggctgcaccatctgcttccatctcccgcctatg
 atgagcagttgaaacttggaaactgcctctgttgtgctgctgtaataactctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaa
 tcgggtaactcccagagagtgacagagcaggacagcaaggacagcaccctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgag
 aaacacaagctacgcctgcgaagtcaccatcagggcctgagctcggcctcacaaagactcaacaggggagcg

リンカー MM リンカー AB
 (QGQSGQ)(GSHCLIPINMGAPSC)(GSSGSGSGSGSGSGSGSGGG)(TQILLTQSPVILSVSPGER
 VSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVESEDIADY
 YCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
 DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGA)

10

【 0 4 1 1 】

【表 3 8】

表 38: 3690-3579-SM984-C225 軽鎖の配列

caaggccagctggccagtgcatctcgccttggtgtggaggctcgagcgcgtagccagctggccagggtcacattgtctcattctattaacatggg
 cgcgcgctcatcgggctcgagcgggtggcagcgggtggtctctgggtatccccctcgcgagcctcaaaatgatccgggaagggggtaccagatctgc
 taccagagcccgggtgattctgagcgtgagcccggcgaaactgtgagcctttagctgcccgcgagccagagcattggcaccacattcattggtatc
 agcagcgcaccaacggcagcccgcgctgctgattaatatgcgagcgaagcattagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggca
 ccgatttaccctgagcattaacagcgtggaagcgaagatattgggattatttggcagcagaacaacaactggccgaccacccttggcgcgggcac
 caaactggaactgaaacgtacgggtgctgcaccatctgcttcatctcccgccatctgatgagcagttgaaactggaaactgcctctgttgtgctgctg
 afaacttctatcccagagaggccaaagfacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacagagcaggacagcaa
 ggacagcaccctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacacaagctacgcctgcgaagtcaccatcagggcctg
 agctcggcctcacaagagcttcaacaggggagcg

リンカー MM リンカー CM
 (QGQSGQ)(CISPRGCGGSSASQSGQGSHCLIPINMGAPSC)(GSSGSGSGSGGS)(PSPVKMMPE)
 リンカー AB
 (GG)(TQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSG
 SSGTDF TLSINSVESEDIADY YCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTL SKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGA)

20

30

【 0 4 1 2 】

【表 3 9】

表 39: 3954-NSUB-C225 軽鎖の配列

caaggccagctggccagtgcatctcaccctggtgtgctccggagcggccatacgtcatgtacggctcgagcgggtggcagcgggtgctctggatcc
 ggcggtggcagcgggtggtgctccggcggtaccagatcttctgaccagagcccgggtgattctgagcgtgagcccggcgaaactgtgagcttta
 gctccgcgcgagccagagcattggcaccacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgctgctgattaatatgcgagcgaagc
 attagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgatttaccctgagcattaacagcgtggaagcgaagataftgcggattattg
 ccagcagaacaacaactggccgaccacccttggcgcgggcaccaaaactggaactgaaacgtacgggtgctgcaccatctgcttcatctcccgcctatg
 gatgagcagttgaaacttggaaactgcctctgttgtgctgctgtaataactctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctcca
 atcgggtaactcccagagagtgacagagcaggacagcaaggacagcaccctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacga
 gaaacacaagctacgcctgcgaagtcaccatcagggcctgagctcggcctcacaagagcttcaacaggggagcg

リンカー MM リンカー AB
 (QGQSGQ)(CISPRGCPDGPYVMY)(GSSGSGSGSGSGSGSGSGGG)(TQILLTQSPVILSVSPGER
 VSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVESEDIADY
 YCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
 DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGA)

40

【 0 4 1 3 】

【表 4 0】

表 40: 3957-NSUB-C225 軽鎖の配列			
caagccagctctggccagtgcattcaccctcgtggtgtgagcctggcaccatgttccaacaggctcgagcggggcagcgggtgctctggtggatecc ggcgggtggcagcgggtggtgctccggcggtaccagatcttctgaccagagcccgggtattctgagcgtgagccccggcgaaacgtgtgagcttta gctgccgcgcgagccagagcattggcaccacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgctgctgattaatatgcgagcgaagc attagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggattatttg ccagcagaacaacaactggccgaccaccttggcgcgggcaccaaaactggaactgaaacgtacgggtgctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctct gatgagcagttgaaatctggaactgctctgtgtgctgctgaataactctatcccagagagccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcca atcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcaccctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacga gaaacacaaagtctacgctgcgaagtcaccatcaggcctgagctcggcctcacaagagcttcaacaggggagcg			
リンカー	MM	リンカー	AB
(QGQSGQ)(CISPRGCEPGTYVPT)(GSSGSGSGSGSGGGSGGGSGG)(TQILLTQSPVILSVSPGER VSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVESEDIADY YCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGA)			

10

【 0 4 1 4 】

【表 4 1】

表 41: 3958-NSUB-C225 軽鎖の配列			
caagccagctctggccagtgcattcaccctcgtggtgtgagcctggcaccatgttccaacaggctcgagcggggcagcgggtgctctggtggatecc ggcgggtggcagcgggtggtgctccggcggtaccagatcttctgaccagagcccgggtattctgagcgtgagccccggcgaaacgtgtgagcttta gctgccgcgcgagccagagcattggcaccacattcattggtatcagcagcgcaccaacggcagcccgcgctgctgattaatatgcgagcgaagc attagcggcattccgagccgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgagcattaacagcgtggaaagcgaagatattgcggattatttg ccagcagaacaacaactggccgaccaccttggcgcgggcaccaaaactggaactgaaacgtacgggtgctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctct gatgagcagttgaaatctggaactgctctgtgtgctgctgaataactctatcccagagagccaaagtacagtggaaggtggataacgccctcca atcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcaccctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcagactacga gaaacacaaagtctacgctgcgaagtcaccatcaggcctgagctcggcctcacaagagcttcaacaggggagcg			
リンカー	MM	リンカー	AB
(QGQSGQ)(CISPRGCPGQIWHPP)(GSSGSGSGSGSGGGSGGGSGG)(TQILLTQSPVILSVSPGER VSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDF TLSINSVESEDIADY YCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGA)			

20

30

【 0 4 1 5 】

【表 4 2】

表 42: C225 MM の配列	
3690	CISPRGCG
3579	GSHCLIPINMGAPSC
3690-3579	CISPRGCGSSASQSGQGSHCLIPINMGAPSC
3954	CISPRGCPDGPYVMY
3957	CISPRGCEPGTYVPT
3958	CISPRGCPGQIWHPP
4124	CNHHYFYTCGCISPRGCPG
4125	ADHVFWGSYGCISPRGCPG
4127	CHHVYWGHCISPRGCPG
4133	CPHFTTTSCGCISPRGCPG
4137	CNHHYHYTCGCISPRGCPG
4138	CPHVSFGSCGCISPRGCPG
4140	CPYYTLSYCGCISPRGCPG
4141	CNHVYFGTCGCISPRGCPG
4143	CNHFTLTTCGCISPRGCPG
4148	CHHFTLTTCGCISPRGCPG
4157	YNPCATPMCCISPRGCPG

40

E G F R MMのコンセンサス配列

E G F R MMのコンセンサス配列を以下に提供する。3690 MMコンセンサス(

50

C I S P R G C) は、主要なコンセンサス配列の 1 つである。

【 0 4 1 6 】

【 表 4 3 】

表 43: C225 EGFR MM のコンセンサス配列	
PHB4124	C N H H Y F Y T C G C I S P R G C G
PHB4137	C N H H Y H Y Y C G C I S P R G C G
PHB4141	C N H V Y F G T C G C I S P R G C G
PHB4127	C H H V Y W G H C G C I S P R G C G
PHB4133	C P H F T T T S C G C I S P R G C G
PHB4143	C N H F T L T T C G C I S P R G C G
PHB4148	C H H F T L T T C G C I S P R G C G
PHB4140	C P Y Y T L S Y C G C I S P R G C G
PHB4138	C P H V S F G S C G C I S P R G C G
PHB4125	A D H V F W G S Y G C I S P R G C G
PHB4157	Y N P C A T P M C C I S P R G C G
PHB4127	C H H V Y W G H C G C I S P R G C G
より高い親和性マスキングのためのスクリーニングの第2ラウンドからのEGFRコンセンサス配列	
	C(N/P)H(H/V/F)(Y/T)(F/W/T/L)(Y/G/T/S)(T/S/Y/H)CGCISPRGCG
	CISPRGCGQPIPSVK
	CISPRGCTOPYHYSE
	CISPRGCNAVSGIIGS

10

20

(実施例 1 7)

選択的基質 / C M の発見および試験

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

【 0 4 1 7 】

u P A 選択的基質の発見

u P A 選択的基質は、E . c o l i の表面の N 末端融合物として発現される、約 10^8 個のランダムな 8 量体基質からなる 8 e C L i P S 細菌ライブラリから単離した。u P A による切断のために最適化され、標的外セリンプロテアーゼ k l k 5 および 7 による切断に抵抗性である基質について濃縮するために、交互に実行した F A C S による陽性および陰性の選択を用いた。ナイーブなライブラリを $8 \mu\text{g} / \text{ml}$ u P A と共に 37°C で 1 時間インキュベーションし、続いて S A P E (赤色) および y P E T m o n a (緑色) で標識した。u P A による切断は、S A P E 標識の消失を生じ、u P A 基質を発現する細菌 (緑色だけ、陽性選択) の、未切断のペプチドを発現する細菌 (赤色 + 緑色) からの選別を可能にする。u P A 基質を F A C S によって選別し、濃縮されたプールを増幅し、次に $5 \text{ ng} / \text{ml}$ K L K 5 および 7 と共に 37°C で 1 時間インキュベーションし、S A P E および y P E T m o n a で標識し、これらの標的外プロテアーゼによる切断の欠如について選別した (赤色 + 緑色、陰性選択) 。プールを増幅し、暫減濃度の u P A ($4 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、 $2 \mu\text{g} / \text{ml}$) および暫増濃度の k l k 5 および 7 ($5 \text{ ng} / \text{ml}$ 、 $10 \text{ ng} / \text{ml}$) を用いて、さらなる 4 ラウンドの陽性および陰性交互 F A C S で選別した。F A C S の最後の 3 ラウンドからの個々のクローンを配列決定し、いくつかのコンセンサスに分類した (表 4 4) 。次に、表 4 4 の標的対標的外プロテアーゼによる切断の特異性について、各コンセンサスからのクローンを、u P A、k l k 5 および 7、ならびにプラスミンの様々な濃度による切断について個々に分析した。図 2 5 は、u P A 対照および基質 S M 1 6 と違って、K K 1 2 0 3、1 2 0 4 および 1 2 1 4 は、K L K 5、K L K 7 およびプラスミンによる切断に抵抗性を示すことを示す。

30

40

【 0 4 1 8 】

【表 4 4】

表 44: uPA コンセンサス配列	
(1)	1 9
kk1203(1)	TARGPS-WV
kk1206(1)	TARGPSRW-
kk1216(1)	TARGPSFK-
コンセンサス (1)	TARGPS W
(1)	1 11
kk1204 (1)	---LGRDNH
kk1208 (1)	GGWHTGNN---
kk1211 (1)	---HIGFSGAL
kk1214 (1)	--PITGRS-
コンセンサス (1)	LTGRSGA
(1)	1 10
kk1217 (1)	AANGFAIH--
kk1219 (1)	--RGFAFNPM
kk1196 (1)	SSKGPAYL--
kk1201 (1)	--RGPATPIM
コンセンサス (1)	RGPA

10

プラスミン選択的基質の発見

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

20

【0419】

第2世代プラスミン10eCLiPSライブラリは、選択のために30pMの低プラスミン濃度を用いて、速やかに切断されたプラスミン基質についてナイーブな8eCLiPSを選択することによって社内で同定されたコンセンサス配列に基づいた。好ましからぬ標的外配列から下方選択するために柔軟性を可能にしつつ、ペプチドをコンセンサス配列の方へ傾かせるために、10量体の中の個々の残基は、ランダム($n=20$)、制限($1 < n < 20$)または固定($n=1$)であった。

30

【0420】

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

40

50

【 0 4 2 1 】

【 表 4 5 】

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

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

10

20

30

u P A 酵素活性化 A A 配列

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

40

【 0 4 2 2 】

【表 4 6】

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

ggccagctctggccagccgtgtctgagtgccagtcgatggtgcagccgcgttctattatggggcggttctggtggcagcggccaagtgccaagg
factggccgtggtccaagctgggtggcagtagcggcggttctgatattcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgta
cgatcacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaggcaccaaaagctctgatctactcacaagttca
ctgcattccggcgtaccgtcgcctttagcgggtctgagcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagctgcaacctgaggatfttgctacatattactg
tcagcaatattcgaccgtgccgtggacgttcggcagggcaccaaaagtgagattaagcgtacgggtgctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctg
atgagcagtgaaatctggaactgctctgtgtgtgctgctgaataactctatcccagagaggccaaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaa
tcgggtaactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaaagcagactacag
aaacacaaaagtctacgctcgaagtcaccatcaggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgftag

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

10

【 0 4 2 3】

【表 4 7】

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

ggccagctctggccagccgtgtctgagtgccagtcgatggtgcagccgcgttctattatggggcggttctggtggcagcggccaagtgccaagg
ctgagcggccgttccgataatcatgagcagtagcggcggttctgatattcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgta
cgatcacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaggcaccaaaagctctgatctactcacaagttca
ctgcattccggcgtaccgtcgcctttagcgggtctgagcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagctgcaacctgaggatfttgctacatattactg
tcagcaatattcgaccgtgccgtggacgttcggcagggcaccaaaagtgagattaagcgtacgggtgctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctg
atgagcagtgaaatctggaactgctctgtgtgtgctgctgaataactctatcccagagaggccaaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaa
tcgggtaactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaaagcagactacag
aaacacaaaagtctacgctcgaagtcaccatcaggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgftag

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

20

30

【 0 4 2 4】

【表 4 8】

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

ggccagctctggccagccgtgtctgagtgccagtcgatggtgcagccgcgttctattatggggcggttctggtggcagcggccaagtgccaacc
actgactggctgtagcgggtggagggaagtagcggcggttctgatattcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgtt
acgatacttgctcggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaggcaccaaaagctctgatctactcacaagttca
actgcattccggcgtaccgtcgcctttagcgggtctgagcagtggtaccgacttcaccctgactatctcgagctgcaacctgaggatfttgctacatattactg
gtcagcaatattcgaccgtgccgtggacgttcggcagggcaccaaaagtgagattaagcgtacgggtgctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatct
gatgagcagtgaaatctggaactgctctgtgtgtgctgctgaataactctatcccagagaggccaaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaa
atcgggtaactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaaagcagactacag
gaaacacaaaagtctacgctcgaagtcaccatcaggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgftag

リンカー MM リンカー CM リンカー AB
(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(PLTGRSGGGSS)(GGS)(DIQLTQSPSSL
SASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC)

40

50

【 0 4 2 5 】

【 表 4 9 】

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

```

ggccagctctggccagccgtgttctgagtgccagtcgatggtgcagccgcgttctattatggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaaga
aactccatctgtaaagactatggccgtagtagcggcggttctgatattcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttac
gatcactgtctggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaagcaccacaaagtcctgacttacttcaagttcact
gcattccggcgtagccgtgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttaccctgactatctcagctgcaacctgaggatttgcacatafactgctc
agcaatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccacaaagtggagatfaagcgtacgggtggtgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgat
gagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgcttgcgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatc
gggtaactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcacctacagccctcagcagcacctgacgctgagcaagcagactacgaga
aacacaaagtctacgctgcgaagtcacccatcagggctgagctgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgtag

```

リンカー MM リンカー CM リンカー AB

GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(ETPSVKTMGRSS)(GGS)(DIQLTQSPSSLS
ASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC)

10

プラスミン活性化 A A 配列

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

20

【 0 4 2 6 】

【 表 5 0 】

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

```

ggccagctctggccagccgtgttctgagtgccagtcgatggtgcagccgcgttctattatggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaagg
ttcccacatfatgaaacttccagcatagtagcggcggttctgatattcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacg
atcactgtctggccagccaagatatttctaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaagcaccacaaagtcctgacttacttcaagttcactg
cattccggcgtagccgtgcgctttagcggttctggcagtggtaccgacttaccctgactatctcagctgcaacctgaggatttgcacatafactgctc
gcaatattcgaccgtgccgtggacgttcgggcagggcaccacaaagtggagatfaagcgtacgggtggtgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgat
agcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgcttgcgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatc
ggtaactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcacctacagccctcagcagcacctgacgctgagcaagcagactacgagaa
acacaaagtctacgctgcgaagtcacccatcagggctgagctgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgtag

```

リンカー MM リンカー CM リンカー AB

(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(GFPHMKTFQHSS)(GGS)(DIQLTQSPSSL
SASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT
KSFNRGEC)

30

レグメイン活性化 A A

レグメイン基質 A A N L および P T N L の配列は、当技術分野で公知である（Li u ら 2003 年。Cancer Research 63 巻、2957~2964 頁；Math i e u ら 2002 年。Molecular and Biochemical Par i s i t o l o g y 121 巻、99~105 頁）。レグメイン酵素活性化抗 V E G F 軽鎖 A A のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を、下の表に提供する。括弧は、様々な配列のドメイン間の境界を示す：（リンカー）（MM）（リンカー）（CM）（リンカー）（AB）。

40

【 0 4 2 7 】

【表 5 1】

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

ggccagctctggccagccgctgtctgagtgccagctcgatggtgcagccgcgttgctattatggggcggttctggtggcagcggccaagtgccaagc
agctaatctggcagcggaggaagtagcggcggttctgataftcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatc
actgtctggccagccaagatatttcaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaagcaccacaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcat
fccggcgtaccgtcgcctttagcgggttctggcagtggtaccgacttcacctgactatctcgagctcgaacctgaggattttgctacatattactgtcagc
aatattcgaccgtgccgtggacgttcggcgagggcaccacaaagtggagattaagcgtacgggtgctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgag
cagttgaaatctggaactgctctgtgtgtgctcctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaaagcagactacgagaaca
caaaagtctacgctcgaagtcaccatcaggcctgagctcggcctcacaagagctcaacaggggagagtgtag

リンカー MM リンカー CM リンカー AB
(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGSGQGGQ)(AANLGGSS)(GGS)(DIQLTQSPSSLSA
SVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC)

10

【 0 4 2 8 】

【表 5 2】

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

ggccagctctggccagccgctgtctgagtgccagctcgatggtgcagccgcgttgctattatggggcggttctggtggcagcggccaagtgccaacc
gactaatctggcagcggaggaagtagcggcggttctgataftcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatc
actgtctggccagccaagatatttcaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaagcaccacaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcat
fccggcgtaccgtcgcctttagcgggttctggcagtggtaccgacttcacctgactatctcgagctcgaacctgaggattttgctacatattactgtcagc
aatattcgaccgtgccgtggacgttcggcgagggcaccacaaagtggagattaagcgtacgggtgctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgag
cagttgaaatctggaactgctctgtgtgtgctcctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaaagcagactacgagaaca
caaaagtctacgctcgaagtcaccatcaggcctgagctcggcctcacaagagctcaacaggggagagtgtag

リンカー MM リンカー CM リンカー AB
(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGSGQGGQ)(PTNLGGSS)(GGS)(DIQLTQSPSSLSAS
VGDRVTITCSASQDISNYLNWYQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
RGEC)

20

30

【 0 4 2 9 】

【表 5 3】

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

ggccagctctggccagccgctgtctgagtgccagctcgatggtgcagccgcgttgctattatggggcggttctggtggcagcggccaagtgccaacc
gactaatggtggcagcggaggaagtagcggcggttctgataftcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgatc
actgtctggccagccaagatatttcaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaagcaccacaaaagtcctgatctacttcacaagttcactgcat
fccggcgtaccgtcgcctttagcgggttctggcagtggtaccgacttcacctgactatctcgagctcgaacctgaggattttgctacatattactgtcagc
aatattcgaccgtgccgtggacgttcggcgagggcaccacaaagtggagattaagcgtacgggtgctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgag
cagttgaaatctggaactgctctgtgtgtgctcctgctgaataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcggg
taactcccaggagagtgctacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaaagcagactacgagaaca
caaaagtctacgctcgaagtcaccatcaggcctgagctcggcctcacaagagctcaacaggggagagtgtag

リンカー MM リンカー CM リンカー AB
(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGSGQGGQ)(PTNGGSGSS)(GGS)(DIQLTQSPSSLSA
SVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC)

40

50

カスパーゼ活性化 A A

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

【 0 4 3 0 】
【表 5 4】

表 54: PFIL2-CLlg-HK- 抗 VegF 306 DEVD LC						
ggccagtctggccagccggtgtctgagtgccagtcgattggtgcagccgcgttgcattatggggcggttctggtggcagcggccaaggtggccaaga						10
cgaagtcgatggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactgaccagagcccttctccctgagtgccagcgtgggtgaccgtgttacgac						
acttgctcggccagccaagatatttcaactacctgaattggtaccagcagaagccaggaaagccacaaaagctctgatctactcacaagttcactgcat						
tcggcgtaccgtcgcgtttagcgggtctggcagtggtaccgacttaccctgactatctcagctcgaacctgaggattttgctacataactgtcagc						
aataftcagaccgtgccgtggacgttcggcagggcaccaaaagtgagattaagcgtacgggtgctgcaccatctgtcttctatctcccgccatctgatgag						
cagttgaaatctggaactgcctctgttctgctcgtgaataactctatccagagaggccaaaagtagtggaaggtggataacgccctccaatcggg						
taactcccagagagtgctcacagagcaggacagcaaggacacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaacgagactacgagaaaca						
caagtctacgcctgcgaagtcaccatcaggcctgagctcggccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgtag						
リンカー	MM	リンカー	CM	リンカー	AB	
(GQSGQ)(PCSEWQSMVQPRCYYG)(GGSGGSGQGGQ)(DEVDGSGGSS)(GGG)(DIQLTQSPSSLSA						
SVGDRVITCSASQDISNYLNWYQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQP						
EDFATYYCQYSTVWPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK						
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF						
NRGEC)						20

レグマインおよびカスパーゼ活性化 A A 発現ベクターの構築

基質は、2段階法で構築された。第一に、C X 0 3 2 5 フォワードプライマーを基質特異的リバープライマー(C X 0 7 2 0 A A N L、C X 0 7 2 2 P T N L、C X 0 7 2 4 P T N および C X 0 7 5 8 D E V D)と一緒に用いて2つの生成物をPCR増幅し、他は、C X 0 5 6 4 リバープライマーを基質特異的フォワードプライマー(C X 0 7 2 1 A A N L、C X 0 7 2 3 P T N L、C X 0 7 2 5 P T N および C X 0 7 5 4 D E V D)と一緒に用いてPCR増幅した。いずれの場合にも、PCRの基質は、抗 V E G F m m p - 9 3 0 6 s c F vであった。第二に、2つの生成物を合わせ、外側プライマーC X 0 3 2 5 および C X 0 5 6 4 を用いてPCR増幅した。E c o R I および X h o I 制限部位を用いて、最終生成物を p F I L 2 - C L - 抗 V E G F L c にクローニングした。

【 0 4 3 1 】
【表 5 5】

表55:レグマインおよびカスパーゼ活性化AA発現ベクターの構築のためのプライマー		
CX0564	agggtgcagactcgagatagtcagggtgaagtc	40
CX0720	tctcgcgtgccagattagctgcttggccaccttggcgcgtgccac	
CX0721	gcagctaatctggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactg	
CX0722	tctcgcgtgccagattagtcggttggccaccttggcgcgtgccac	
CX0723	cgactaatctggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactg	
CX0724	tctcgcgtgccaccattagtcggttggccaccttggcgcgtgccac	
CX0725	cgactaatggtggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactg	
CX0754	gacgaagtcgatggcagcggaggaagtagcggcggttctgatattcaactg	
CX0758	tctcgcgtgccatcgaacttcttggccaccttggcgcgtgccac	

レグマイン活性化 A A の発現および精製

3 μ g の p F I L - V E G F - H L および 3 μ g の p F I L 2 - 3 0 6 - 基質 - V E G F - 軽を、製造業者のプロトコルに従って L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 (I n v i t r o g e n) を用いて、C H O - S 細胞 (I n v i t r o g e n) に同時トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を F r e e s t y l e C H O 培地 (I n v i t r o g e n) で培養し、ゼオシンおよびブラストサイジン抵抗性について選択した。個々

10

20

30

40

50

のクローンを限界希釈によって単離し、EGFRに結合することができるヒトIgGの発現についてELISAによって選択した。標準の技術を用いて、すべての抗体およびAAをプロテインAクロマトグラフィーによって精製する。

【0432】

scFv AA消化物のためのアッセイの説明

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

10

【0433】

レグマイン活性化AAのin vivo安定性

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

20

【0434】

(実施例18)

AAの血清半減期

図29は、マスキングされた単鎖Fv-Fc融合プロ抗体が血清半減期の増大を示すことを示す。マスキングポリペプチドは、マスキングが、抗体結合部位と相互作用して熱学的安定性増大させ、または中和抗体をブロッキングすることができるように、抗体のN末端に取り付けられる。プロテアーゼ基質を使用して、血清または特定の組織において様々な割合でマスキングの除去を可能にすることができる。

30

【0435】

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

40

【0436】

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

50

【表 5 9】

<p>表 59: AA^{NoSubstrate}VEGF AAs は、以下に示すようにマスクングペプチド、GlySer(GS)リンカーおよびVEGFを含有するが、基質は短いリンカーによって結合していない</p>	
マスクングペプチド	基質
<p>PCSEWQSMVQPRCYYGGSGGGSGQSGQGGSGGGSGQGGQGGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCS ASQDISNYLNWYQQKPKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGVWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWVGQGLTVTVSGGSGAMVRSKTHHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK</p>	

10

AA は親の抗体と比較して血清半減期の増大を示す

8匹の12週齢Balb/Cマウスにそれぞれ、MMPで活性化されるAA、AA^M P V E G F、プラスミンで活性化されるAA、AA^{P L A S} V E G Fまたは親の抗VEGF抗体Ab-VEGFの100μgの単回ボラス注射を施した。注射から15分、8時間、1日、3日、7日および10日後、血清を採取した。全AA濃度を血清における全ヒトFcのELISA測定から計算した。図33に、各時点の全AAの濃度を、個々の動物から得られた測定値の平均として示し、最初の用量のパーセントとして表す。AAと親の抗体は同様に期待したとおり分配される。15分で高く等しい濃度に達し、初日の間に組織に分配される。親の抗体が10日間にわたりほぼ完全に除去されたのとは対照的に、AAは両方とも実験の期間中、血清においてより高いレベルで持続する。

20

【0443】

(実施例19)

AAの投与による副作用の低減

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

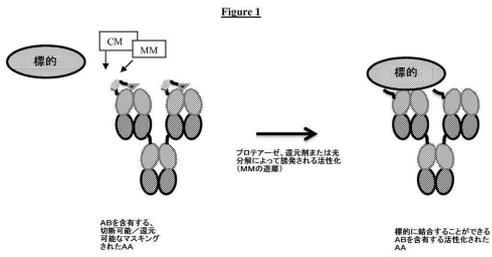
30

【0444】

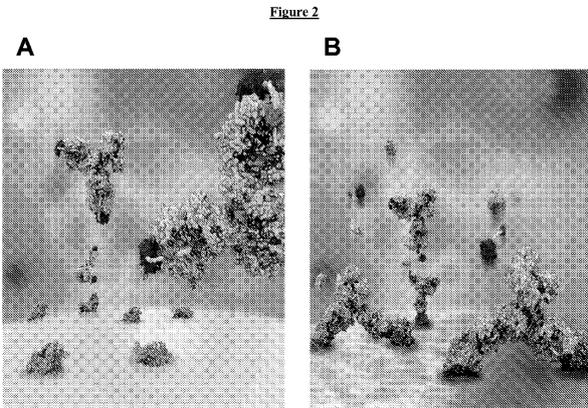
本発明は、その特定の実施形態を参照して記載されるが、当業者であれば、本発明の真の趣旨および範囲から逸脱することなく、様々な変形形態を得ることができ、均等物で置き換えることができると理解されよう。さらに、特定の状況、材料、物質の組成物、プロセス、1つまたは複数のプロセスステップが、本発明の目的、趣旨および範囲に適合するように多くの変形形態を得ることができる。このようなすべての変形形態は、添付の特許請求の範囲内にあるものとする。

40

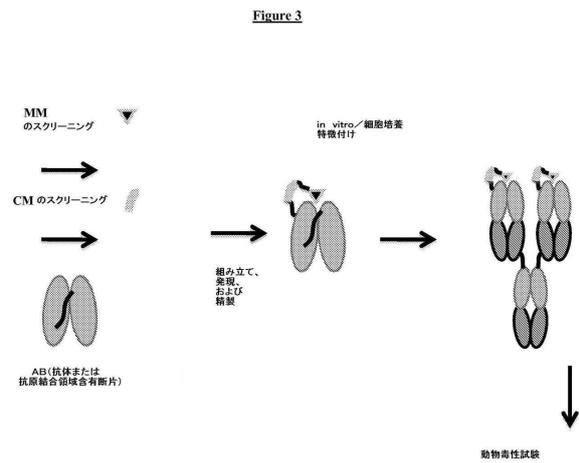
【 図 1 】



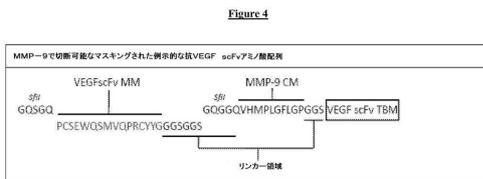
【 図 2 】



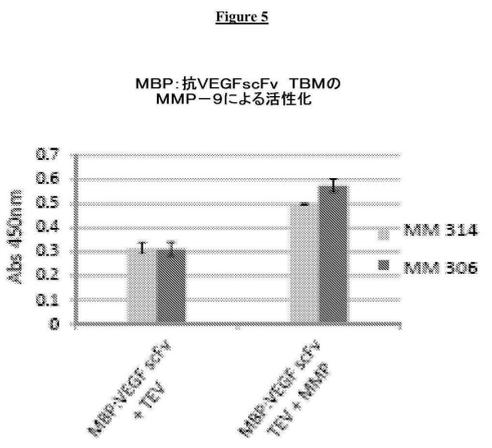
【 図 3 】



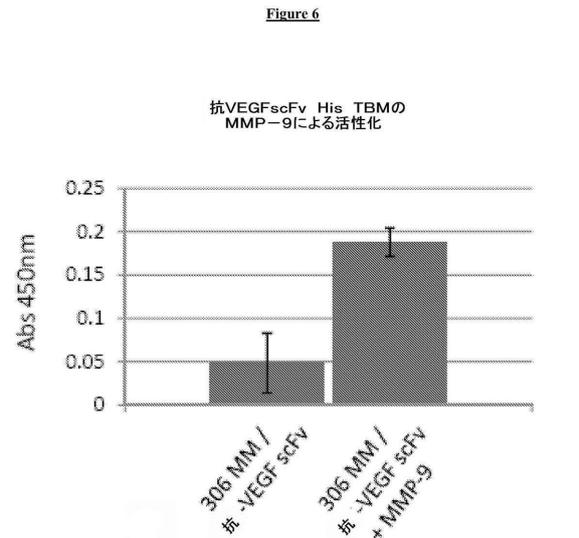
【 図 4 】



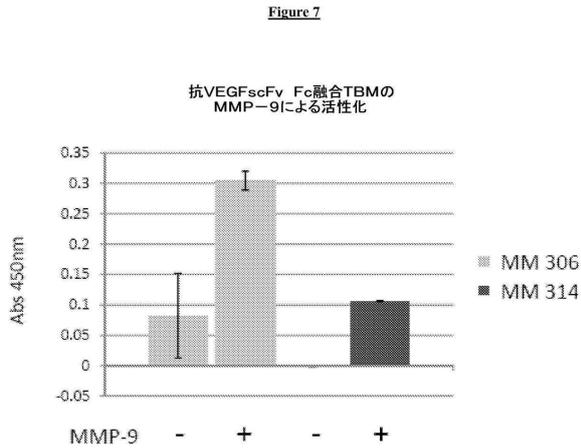
【 図 5 】



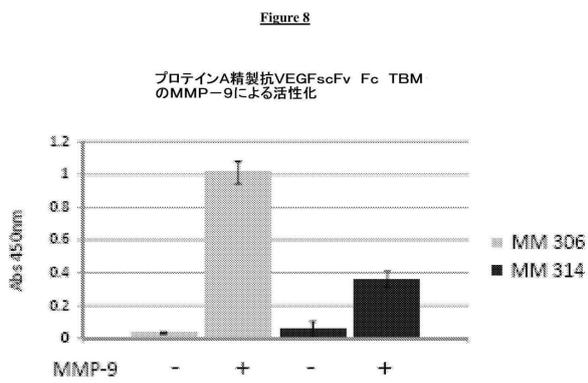
【 図 6 】



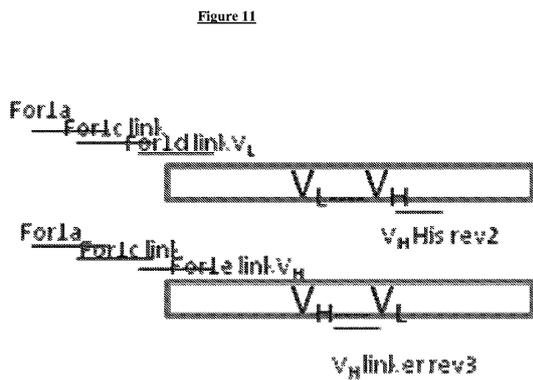
【 図 7 】



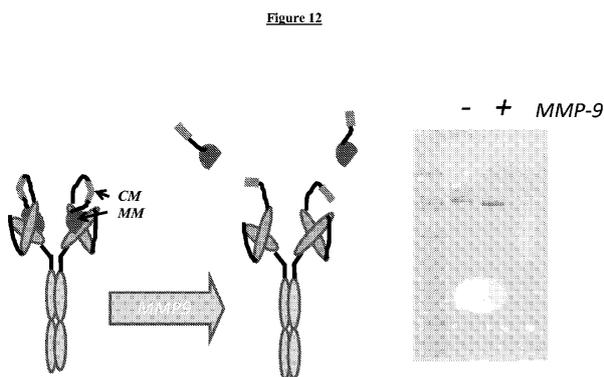
【 図 8 】



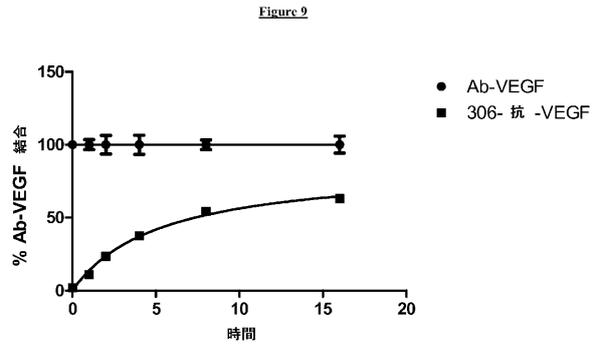
【 図 1 1 】



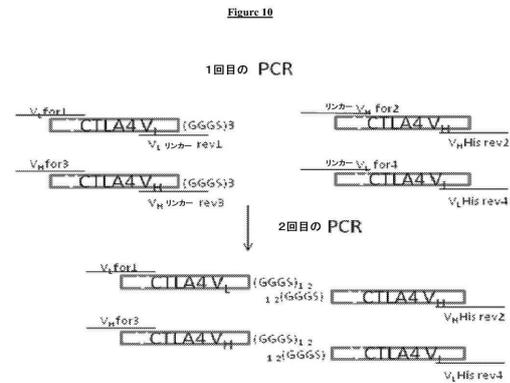
【 図 1 2 】



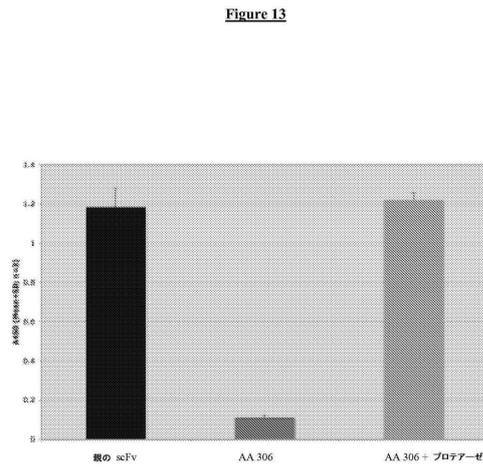
【 図 9 】



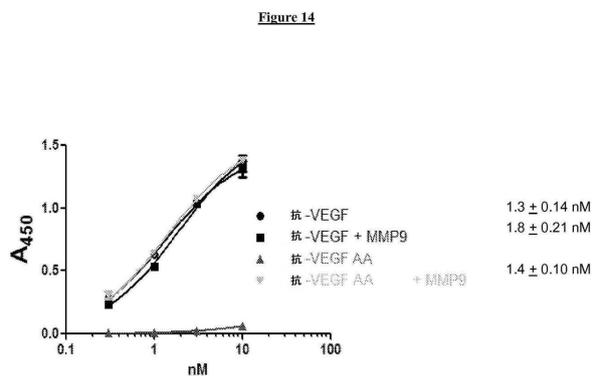
【 図 1 0 】



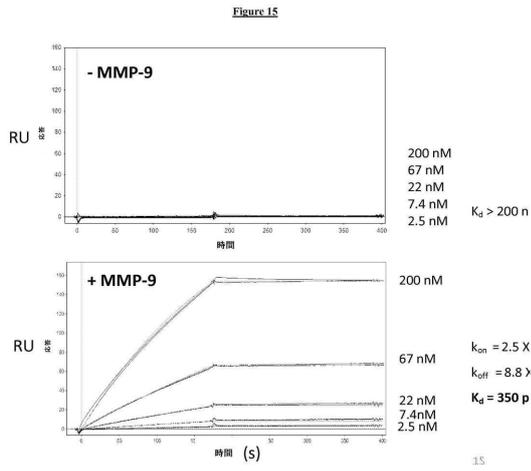
【 図 1 3 】



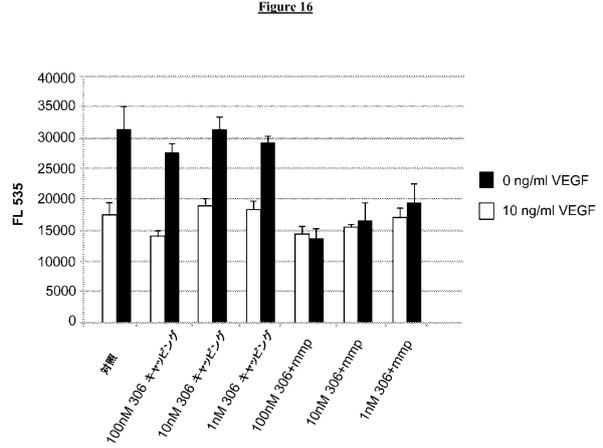
【 図 1 4 】



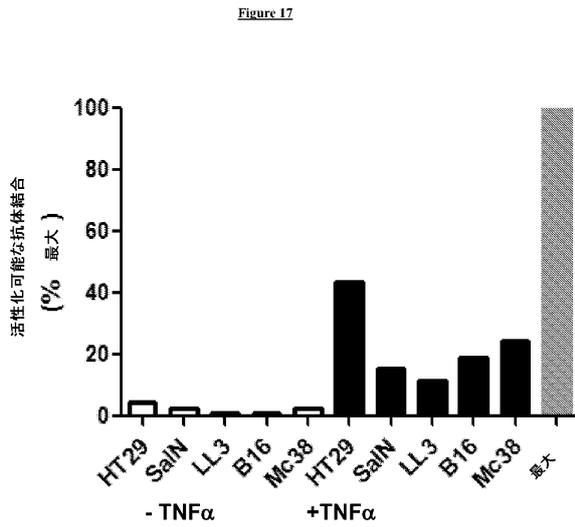
【 図 15 】



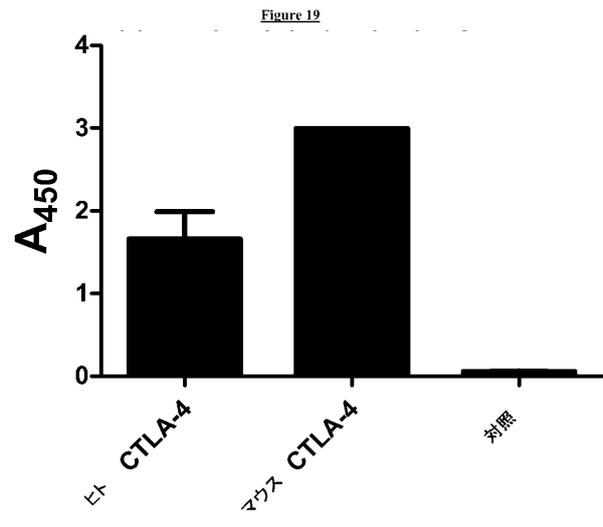
【 図 16 】



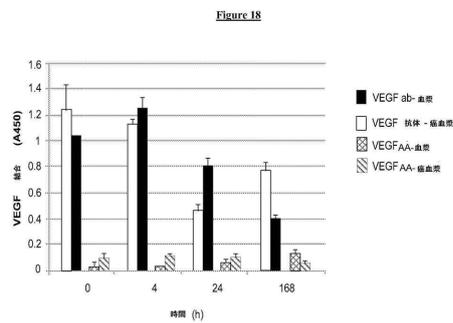
【 図 17 】



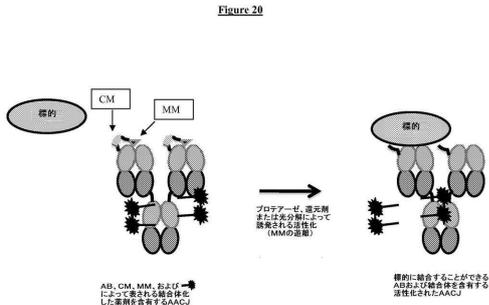
【 図 19 】



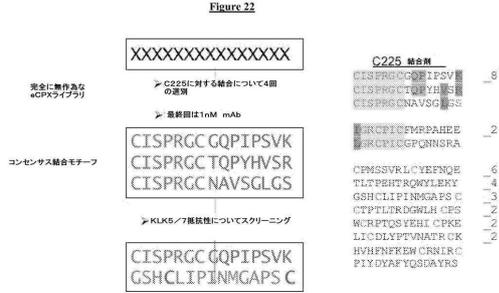
【 図 18 】



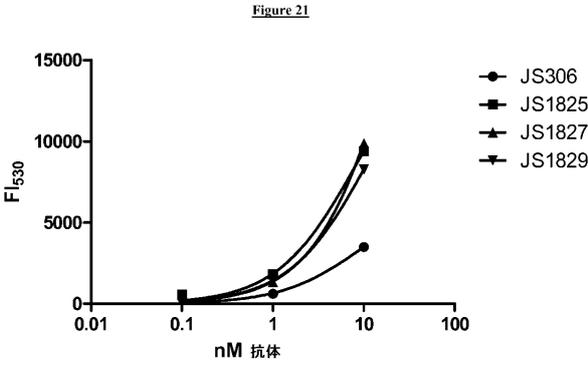
【 図 2 0 】



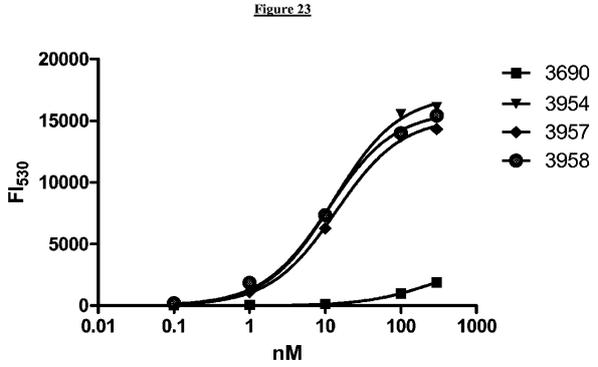
【 図 2 2 】



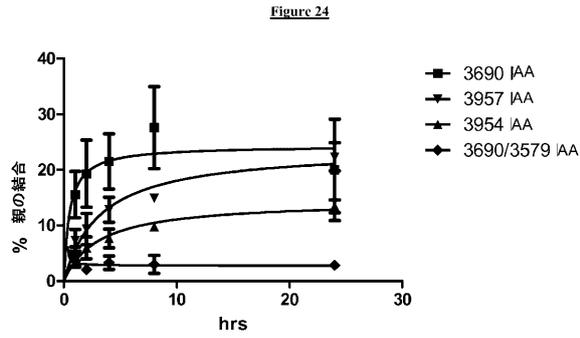
【 図 2 1 】



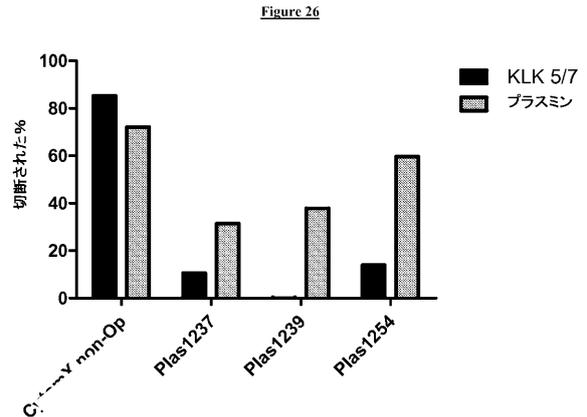
【 図 2 3 】



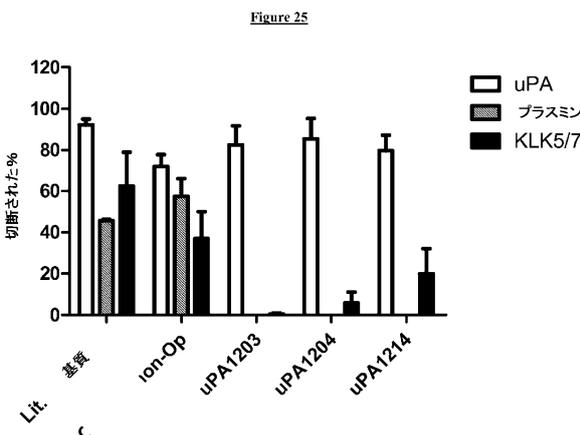
【 図 2 4 】



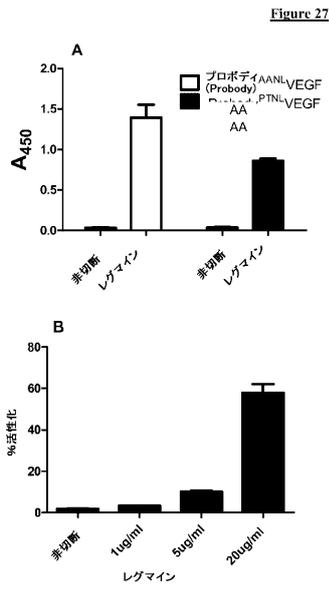
【 図 2 6 】



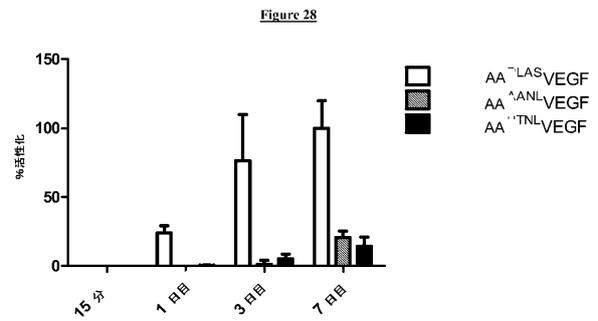
【 図 2 5 】



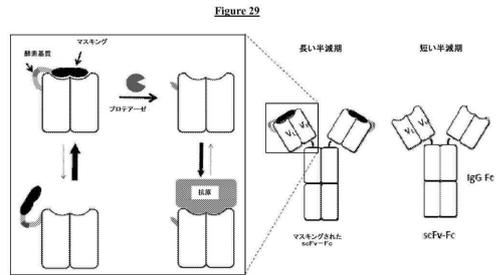
【 図 27 】



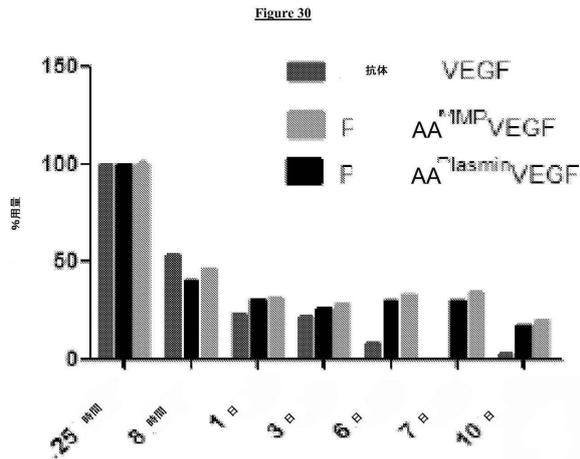
【 図 28 】



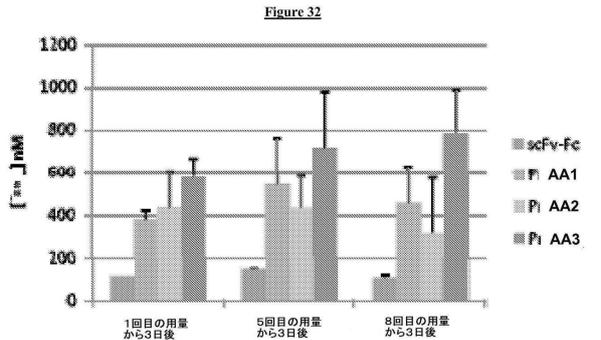
【 図 29 】



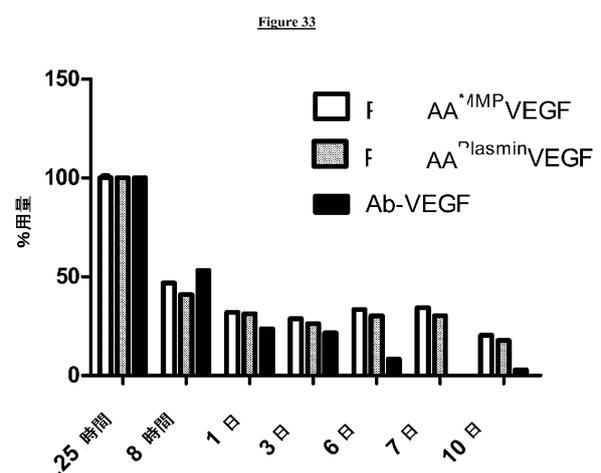
【 図 30 】



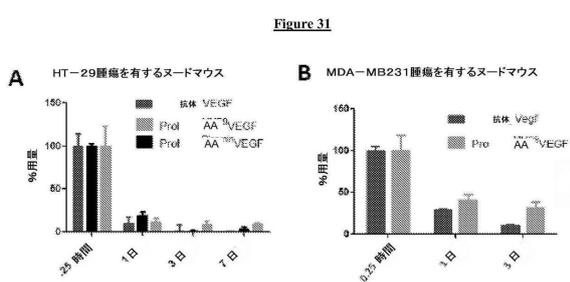
【 図 32 】



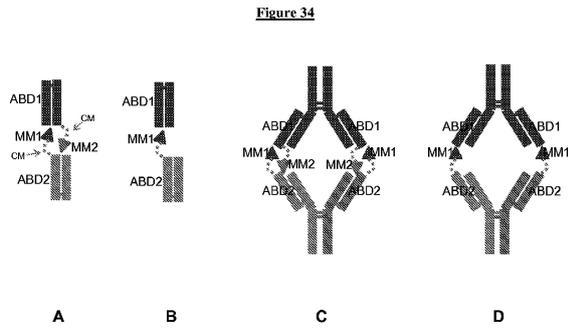
【 図 33 】



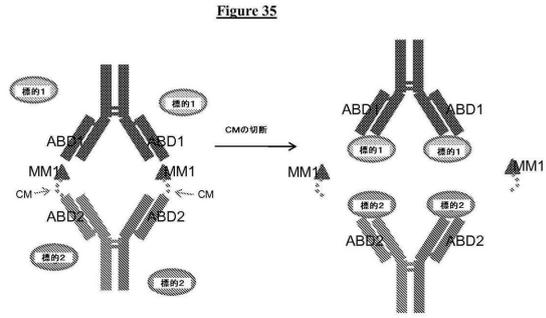
【 図 31 】



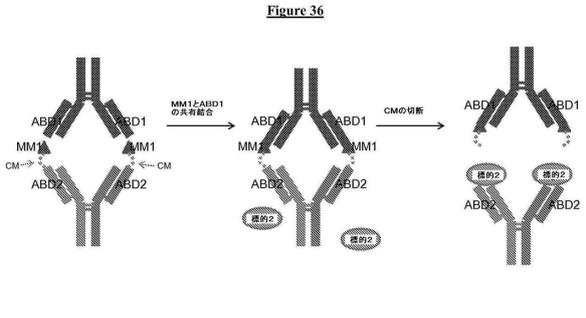
【 図 3 4 】



【 図 3 5 】



【 図 3 6 】



【 配列表 】

0006571730000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D

- (31)優先権主張番号 61/144,105
 (32)優先日 平成21年1月12日(2009.1.12)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/249,416
 (32)優先日 平成21年10月7日(2009.10.7)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

- (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
- (74)代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
- (74)代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
- (74)代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔
- (74)代理人 230113332
 弁護士 山本 健策
- (72)発明者 ナンシー イー． スタグリアノ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア， サンタ バーバラ， ポール ラ マール サークル 6 4
 7， ユニット シー
- (72)発明者 ジェイムズ ダブリュー． ウエスト
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 1 1 0， サンタ バーバラ， シエネギータス ロード
 7 4 8 アpartment エー
- (72)発明者 キャスリン カマス
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 1 0 9， サンタ バーバラ， プレマー ドライブ 3
 2 3 0
- (72)発明者 ポール エイチ． ベセット
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 0 1 0， キャマリロ， アポカド プレイス 4 4 1
- (72)発明者 フレッド グラック
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 1 0 8， サンタ バーバラ， サン イシドロ ロード
 7 4 3
- (72)発明者 ジェイソン サガート
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 1 1 0， サンタ バーバラ， シエネギータス ロード
 9 6 6
- (72)発明者 パトリック ドーアティー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 1 1 1， サンタ バーバラ， エヌ． パターソン ア
 ベニュー 9 1 7

審査官 野村 英雄

- (56)参考文献 特表2001-511346(JP,A)
 特表平09-500102(JP,A)
 特開平02-100685(JP,A)

国際公開第 2 0 0 3 / 0 9 3 4 7 6 (W O , A 1)

GERSPACH, J. et al. , "Target-selective activation of a TNF prodrug by urokinase-type plasminogen activator (uPA) mediated proteolytic processing at the cell surface." , CANCER IMMUNOL. IMMUNOTHER. , 2 0 0 6 年 , Vol.55 , pp.1590-1600 , DOI: 10.1007/s00262-006-0162-6

SUH, C.W. et al. , "Enzymic cleavage of fusion protein using immobilized urokinase covalently conjugated to glyoxyl-agarose." , BIOTECHNOL. APPL. BIOCHEM. , 2 0 0 3 年 , Vol.37 , pp.149-155

LIU, S. et al. , "Targeting of tumor cells by cell surface urokinase plasminogen activator-dependent anthrax toxin." , J. BIOL. CHEM. , 2 0 0 1 年 5 月 2 5 日 , Vol.276 , No.21 , pp.17976-17984 , DOI: 10.1074/jbc.M011085200

LIU, S. et al. , "Potent antitumor activity of a urokinase-activated engineered anthrax toxin." , PROC. NATL. ACAD. SCI. USA , 2 0 0 3 年 1 月 2 1 日 , Vol.100 , No.2 , pp.657-662 , DOI: 10.1073/pnas.0236849100

JANSSEN, S. et al. , "Screening a combinatorial peptide library to develop a human glandular kallikrein 2-activated prodrug as targeted therapy for prostate cancer." , MOL. CANCER THER. , 2 0 0 4 年 1 1 月 , Vol.3 , No.11 , pp.1439-1450

SCHILLING, O. et al. , "Proteome-derived, database-searchable peptide libraries for identifying protease cleavage sites." , NATURE BIOTECHNOLOGY , 2 0 0 8 年 6 月 , Vol.26 , No.6 , pp.685-694 , DOI: 10.1038/nbt1408

RIJKEN, D.C. et al. , "Substrate specificity of tissue-type and urokinase-type plasminogen activators." , BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS , 1 9 9 1 年 1 月 3 1 日 , Vol.174 , No.2 , pp.432-438 , ISSN 0006-291X

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d