

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7611820号
(P7611820)

(45)発行日 令和7年1月10日(2025.1.10)

(24)登録日 令和6年12月26日(2024.12.26)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
請求項の数 48 (全234頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-520217(P2021-520217)	(73)特許権者	524252194
(86)(22)出願日	令和1年10月9日(2019.10.9)		インヒブルクス バイオサイエンシズ インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2022-504822(P2022-504822 A)		アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア ラ ホーヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1 0 2 5 スイート 1 4 0
(43)公表日	令和4年1月13日(2022.1.13)	(74)代理人	100102978
(86)国際出願番号	PCT/US2019/055436		弁理士 清水 初志
(87)国際公開番号	WO2020/076977	(74)代理人	100205707
(87)国際公開日	令和2年4月16日(2020.4.16)		弁理士 小寺 秀紀
審査請求日	令和4年10月7日(2022.10.7)	(74)代理人	100160923
(31)優先権主張番号	62/744,638		弁理士 山口 裕孝
(32)優先日	平成30年10月11日(2018.10.11)	(74)代理人	100119507
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 刑部 俊
(31)優先権主張番号	62/832,265	(74)代理人	100142929
(32)優先日	平成31年4月10日(2019.4.10)		
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 DLL3 シングルドメイン抗体およびその治療用組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項 1】

- (i)それぞれSEQ ID NO:319、336、および354；
- (ii)それぞれSEQ ID NO:319、337、および354；
- (iii)それぞれSEQ ID NO:319、338、および354；
- (iv)それぞれSEQ ID NO:320、338、および354；
- (v)それぞれSEQ ID NO:321、338、および354；
- (vi)それぞれSEQ ID NO:322、338、および354；
- (vii)それぞれSEQ ID NO:323、338、および354；
- (viii)それぞれSEQ ID NO:324、338、および354；
- (ix)それぞれSEQ ID NO:325、338、および354；または、
- (x)それぞれSEQ ID NO:326、338、および354

に示されるアミノ酸配列を含む、相補性決定領域1（CDR1）、相補性決定領域2（CDR2）、および相補性決定領域3（CDR3）を含む、DLL3と特異的に結合する少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン（DLL3 VHHドメイン）を含む、DLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 2】
DLL3以外の標的と結合する1つまたは複数の追加の結合ドメインを含む、請求項1記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 3】

前記DLL3がヒトDLL3である、請求項1または2記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項4】

前記1つまたは複数の追加の結合ドメインが、免疫細胞上の活性化受容体と結合する、請求項2または3記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項5】

前記活性化受容体が、T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞上にある、請求項4記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項6】

前記活性化受容体がCD3またはCD16である、請求項4または5記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項7】

放射性作用物質をさらに含む、請求項1～6のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項8】

前記1つまたは複数の追加の結合ドメインが、サイトカインであるか、またはサイトカイン受容体と結合することができるその切断型断片もしくはバリエーションである、請求項2～6のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項9】

前記1つまたは複数の追加の結合ドメインが、抗体またはその抗原結合断片を含み、該抗体またはその抗原結合断片が、Fv、ジスルフィド安定化Fv（dsFv）、scFv、Fab、シングルドメイン抗体（sdAb）、VNAR、またはVHHである、請求項2～8のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項10】

前記ポリペプチドが、免疫グロブリンFc領域を含むか、または該免疫グロブリンFc領域が、前記少なくとも1つのVHHドメインと前記1つもしくは複数の追加の結合ドメインとを連結する、請求項2～8のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項11】

前記ポリペプチドがヘテロ二量体Fc領域を含む、請求項2～8のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項12】

前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、DLL3と結合し、かつSEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、もしくはSEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに対して少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、ただし、VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3において変異を含まない、請求項1～11のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項13】

（a）第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドを含むヘテロ二量体Fc領域を含む、第1の構成要素、ならびに（b）可変重鎖領域（VH）および可変軽鎖領域（VL）を含む抗CD3抗体または抗原結合断片を含む、第2の構成要素を含み、

抗CD3抗体または抗原結合断片を構成するVHおよびVLがヘテロ二量体Fcの相対するポリペプチドに連結されており；

第1および第2の構成要素がリンカーによってカップリングされており、ヘテロ二量体Fc領域が抗CD3抗体に対してN末端に位置付けられており；

第1および第2の構成要素のうち的一方または両方が、前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインを含む、

請求項1～12のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項14】

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1および前記第2のFcポリペプチドのうち的一方または両方が、ホモ二量体Fc領域のポリペプチドと比較して、ヘテロ二量体化を誘導する少な

10

20

30

40

50

くとも1つの改変を含む、請求項1～13のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項15】

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1および前記第2のFcポリペプチドのうち的一方または両方が、SEQ ID NO:8に示されるFcポリペプチドまたはその免疫活性断片と比較して、ヘテロ二量体化を誘導する少なくとも1つの改変を含む、請求項1～14のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項16】

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1および前記第2のFcポリペプチドの各々が、ノブイントゥホール(knob-into-hole)改変を含むか、または該ポリペプチドの静電的相補性を増加させる電荷の変異を含む、請求項13記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

10

【請求項17】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片がFv抗体断片である、請求項13～16のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項18】

前記Fv抗体断片がジスルフィド安定化抗CD3結合Fv断片(dsFv)を含む、請求項17記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項19】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、

(a) アミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO:29) を含むVH CDR1 ;

20

アミノ酸配列RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30) を含むVH CDR2 ;

アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31) を含むVH CDR3 ;

アミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32) を含むVL CDR1 ;

アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:33) を含むVL CDR2 ; および

アミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO:34) を含むVL CDR3

を含む、

(b) アミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 461) を含むVH CDR1 ;

アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 462) を含むVH CDR2 ;

アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31) を含むVH CDR3 ;

アミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32) を含むVL CDR1 ;

30

アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:33) を含むVL CDR2 ; および

アミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO:34) を含むVL CDR3

を含む、

(c) アミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 461) を含むVH CDR1 ;

アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 462) を含むVH CDR2 ;

アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31) を含むVH CDR3 ;

アミノ酸配列GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 468) を含むVL CDR1 ;

アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 469) を含むVL CDR2 ; および

アミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 464) を含むVL CDR3

を含む、または

40

(d) アミノ酸配列GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 466) を含むVH CDR1 ;

アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 467) を含むVH CDR2 ;

アミノ酸配列HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 463) を含むVH CDR3 ;

アミノ酸配列GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 468) を含むVL CDR1 ;

アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 469) を含むVL CDR2 ; および

アミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 464) を含むVL CDR3

を含む、

請求項13～18のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項20】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、

50

SEQ ID NO:35～65のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:35～65のうちのいずれかに対して少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有する、ただし、VH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3において変異を含まない、VH；ならびに

SEQ ID NO:66～84および368のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:66～84および368のうちのいずれかに対して少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有する、ただし、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3において変異を含まない、VL

を含む、請求項13～19のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項21】

10

前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、前記DLL3結合ポリペプチド構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端におよび/または該DLL3結合ポリペプチド構築物の前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられている、請求項13～20のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項22】

DLL3と特異的に結合する第1のDLL3 VHHドメインおよびDLL3と特異的に結合する第2のDLL3 VHHドメインを含む、請求項13～21のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項23】

前記DLL3結合ポリペプチド構築物が、DLL3と特異的に結合する第1のDLL3 VHHドメインおよびDLL3と特異的に結合する第2のDLL3 VHHドメインを含み、かつ

20

(a) 前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインが同一であるか、または

(b) 前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインが異なっている、

請求項13～22のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項24】

前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインが、DLL3の別個のもしくは重複しないエピトープと結合し、かつ/またはDLL3への結合について競合しない、請求項23記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項25】

前記第1および前記第2の構成要素のうち的一方または両方が、共刺激受容体と結合する少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)を含む、請求項13～24のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

30

【請求項26】

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、前記DLL3結合ポリペプチド構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端におよび/または該DLL3結合ポリペプチド構築物の前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられている、請求項25記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項27】

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、Fv、scFv、Fab、シングルドメイン抗体(VHHドメイン)、VNAR、またはVHHからなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片である、請求項25または26記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

40

【請求項28】

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、グルコシルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体(BAFF-R)、B細胞成熟抗原(BCMA)、膜貫通型アクチベーターおよびCAMLインタラクタ(Transmembrane activator and CAML interactor)(TACI)、ならびにNKG2D、の中より選択される共刺激受容体と結合する、請求項25～27のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項29】

前記CRBRが41BBと結合する、請求項28記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

50

【請求項 3 0】

前記第1および前記第2の構成要素のうち的一方または両方が、抑制性受容体と結合する少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）を含む、請求項13～29のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 3 1】

前記少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）が、前記DLL3結合ポリペプチド構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端におよび/または該DLL3結合ポリペプチド構築物の前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられている、請求項30記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 3 2】

前記少なくとも1つのIRBRが、Fv、scFv、Fab、シングルドメイン抗体（VHHドメイン）、VNAR、およびVHHからなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片である、請求項30または31記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 3 3】

前記少なくとも1つのIRBRが、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、およびTIM3の中より選択される抑制性受容体と結合する、請求項30～32のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 3 4】

前記リンカーが切断不可能リンカーである、請求項13～33のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 3 5】

前記切断不可能リンカーが、
GS, GGS, GGGGS (SEQ ID NO: 125), GGGGGS (SEQ ID NO: 126)

、およびそれらの組み合わせを含む、請求項34記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 3 6】

前記リンカーが、配列
GGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 127)

であるか、またはそれを含む、請求項34または35記載のDLL3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 3 7】

- (i)それぞれSEQ ID NO:319、336、および354；
- (ii)それぞれSEQ ID NO:319、337、および354；
- (iii)それぞれSEQ ID NO:319、338、および354；
- (iv)それぞれSEQ ID NO:320、338、および354；
- (v)それぞれSEQ ID NO:321、338、および354；
- (vi)それぞれSEQ ID NO:322、338、および354；
- (vii)それぞれSEQ ID NO:323、338、および354；
- (viii)それぞれSEQ ID NO:324、338、および354；
- (ix)それぞれSEQ ID NO:325、338、および354；または、
- (x)それぞれSEQ ID NO:326、338、および354

に示されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）、相補性決定領域2（CDR2）、および相補性決定領域3（CDR3）を含む、DLL3と結合する単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 3 8】

請求項1～36のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 3 9】

請求項13～36のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物の第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチドであって、

10

20

30

40

50

前記第1のポリペプチドが、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHドメインを含み、かつ前記第2のポリペプチドが、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVLドメインを含み、

前記第1および第2のポリペプチドのうちの一方または両方が、少なくとも1つのDLL3 VHHを含む、
ポリヌクレオチド。

【請求項 4 0】

請求項37記載のシングルドメイン抗体をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 4 1】

請求項38～40のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 4 2】

請求項38～40のいずれか一項記載のポリヌクレオチドまたは請求項41記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 4 3】

請求項37記載のシングルドメイン抗体を含む細胞外ドメイン；
膜貫通ドメイン；および
細胞内シグナル伝達ドメイン
を含むキメラ抗原受容体を含む、操作された免疫細胞。

【請求項 4 4】

請求項1～36のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物、請求項37記載のシングルドメイン抗体、または請求項43記載の操作された免疫細胞と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項 4 5】

対象における免疫応答を刺激するかまたは誘導するための医薬の製造のための、請求項1～36のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物、請求項37記載のシングルドメイン抗体、請求項43記載の操作された免疫細胞、または請求項44記載の薬学的組成物の使用。

【請求項 4 6】

対象における疾患または状態を処置するための医薬の製造のための、請求項1～36のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物、請求項37記載のシングルドメイン抗体、請求項43記載の操作された免疫細胞、または請求項44記載の薬学的組成物の使用。

【請求項 4 7】

請求項1～36のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物、請求項37記載のシングルドメイン抗体、または請求項43記載の操作された免疫細胞を含む、対象における免疫応答を刺激するかまたは誘導するための薬学的組成物。

【請求項 4 8】

請求項1～36のいずれか一項記載のDLL3結合ポリペプチド構築物、請求項37記載のシングルドメイン抗体、または請求項43記載の操作された免疫細胞を含む、対象における疾患または状態を処置するための薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、参照によって全ての目的のためその内容全体が組み入れられる、以下の米国仮出願に基づく優先権を主張する：「DLL3シングルドメイン抗体およびその治療用組成物（DLL3 SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND THERAPEUTIC COMPOSITIONS THERE OF）」という名称の2018年10月11日に出願された第62/744,638号；「DLL3シングルドメイン抗体およびその治療用組成物」という名称の2019年4月10日に出願された第62/832,265号；ならびに「DLL3シングルドメイン抗体およびその治療用組成物」という名

10

20

30

40

50

称の2019年7月23日に出願された第62/877,815号。

【0002】

配列表の参照による組み入れ

本願は、電子フォーマットの配列表と共に出願される。配列表は、431キロバイトのサイズである2019年10月8日に作成された744952000640SeqList.TXTという名称のファイルとして提供される。配列表の電子フォーマットでの情報は、参照によってその全体が組み入れられる。

【0003】

分野

本開示は、一般に、DLL3と特異的に結合する結合ポリペプチドを提供する。より具体的には、本開示は、DLL3と少なくとも結合する融合タンパク質、例えば、多価のかつ/または多重特異性の構築物およびキメラ抗原受容体に関する。本開示は、ポリペプチドをコードする核酸分子ならびにそのベクターおよび細胞、ならびに癌のような疾患および状態を処置するための、提供されたDLL3結合ポリペプチドの使用法および使用も提供する。

【背景技術】

【0004】

背景

デルタ様リガンド3 (DLL3) は、腫瘍細胞および癌細胞の細胞表面、例えば、小細胞肺癌 (SCLC) および高悪性度神経内分泌腫瘍の細胞において高度にアップレギュレートされ異常に発現される抑制性ノッチ経路リガンドである。ヒトにおける多様な癌、例えば、固形腫瘍におけるDLL3の発現のため、DLL3は望ましい治療標的である。DLL3を標的とする改善された治療用分子および薬剤が必要とされている。そのような必要を満たす態様が、本明細書中に提供される。

【発明の概要】

【0005】

概要

DLL3と特異的に結合する少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン (DLL3 VHHドメイン) を含むDLL3結合ポリペプチド構築物が、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、DLL3結合構築物は、DLL3以外の標的と結合する1つまたは複数の追加の結合ドメインを含む。

【0006】

少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、および456からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1 (CDR1) ; SEQ ID NO:336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、384、410、および411からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2 (CDR2) ; ならびにSEQ ID NO:354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、395、および412~415からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3 (CDR3) を含み、かつDLL3と結合する、DLL3結合ポリペプチド構築物が、本明細書中に提供される。

【0007】

SEQ ID NO:319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、および456からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1 (CDR1) ; SEQ ID NO:336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、384、410、および411からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2 (CDR2) ; ならびにSEQ ID NO:354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、395、および412~415からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3 (CDR3) を含み、かつDLL3と結合する、DLL3と特異的に結合する少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン (DLL3 VHHドメイン)

10

20

30

40

50

を含むDLL3結合ポリペプチド構築物が、本明細書中に提供される。

【0008】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、および456からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1 (CDR1) ; SEQ ID NO:336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、および353からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2 (CDR2) ; ならびにSEQ ID NO:354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、および367からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3 (CDR3) を含み、かつDLL3と結合する。

10

【0009】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、DLL3はヒトDLL3である。いくつかの態様において、DLL3は、SEQ ID NO:86に示される配列またはシグナル配列を欠くその成熟型を有する。いくつかの態様において、DLL3は、SEQ ID NO:87に示される配列またはシグナル配列を欠くその成熟型を有する。

【0010】

いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、ヒト化されている。いくつかの態様において、DLL3 VHHは、ラクダ科動物VHHである。いくつかの態様において、DLL3 VHHは、ラクダ科動物VHHのヒト化型である。

20

【0011】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、1つまたは複数の追加の結合ドメインは、免疫細胞上の活性化受容体と結合する。いくつかの態様において、免疫細胞は、T細胞である。提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、活性化受容体は、CD3 (CD3) である。いくつかの例において、態様のDLL3結合ポリペプチド構築物は、DLL3およびCD3に対して二重特異性である。いくつかの態様において、免疫細胞は、ナチュラルキラー (NK) 細胞である。

【0012】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、活性化受容体は、CD16 (CD16 a) である。いくつかの例において、DLL3結合ポリペプチド構築物は、DLL3およびCD16aに対して二重特異性である。

30

【0013】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、1つまたは複数の追加の結合ドメインは、サイトカイン受容体と結合する。

【0014】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、1つまたは複数の追加の結合ドメインは、抗体またはその抗原結合断片を含む。いくつかの態様において、1つまたは複数の追加の結合ドメインは、1価である。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、Fv、ジスルフィド安定化Fv (dsFv)、scFv、Fab、シングルドメイン抗体 (sdAb)、VNAR、またはVHHである。いくつかの態様において、シングルドメイン抗体 (sdAb) は、ラクダ科動物VHHである。いくつかの態様において、シングルドメイン抗体 (sdAb) は、ラクダ科動物VHHのヒト化型である。

40

【0015】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、1つまたは複数の追加の結合ドメインは、サイトカインであるか、またはサイトカイン受容体と結合することができるその切断型断片もしくはバリエントである。いくつかの態様において、サイトカインは、インターフェロンであるか、またはインターフェロンの切断型断片もしくはバリエントである。いくつかの態様において、インターフェロンは、I型インターフェロンもしくはII型インターフェロンであるか、I型インターフェロンの切断型断片もしくはバリエントであるか、またはII型インターフェロンの切断型断片もしくはバリエントである。いくつかの態様

50

において、I型インターフェロンが、IFN γ もしくはIFN β であるか、またはその切断型断片もしくはバリエーションである；あるいは、II型インターフェロンが、IFN α であるか、またはその切断型断片もしくはバリエーションである。

【0016】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、ポリペプチドは、免疫グロブリンFc領域を含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは、少なくとも1つのVHHドメインと1つまたは複数の追加の結合ドメインとを連結する免疫グロブリンFc領域を含む。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチド構築物は、二量体である。いくつかの態様において、Fc領域は、ホモ二量体Fc領域である。

【0017】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、Fc領域は、SEQ ID NO:8、10、11、12、もしくは13のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:8、10、11、12、もしくは13のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様において、Fc領域は、ヒトIgG1である。

【0018】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、DLL3結合ポリペプチド構築物は、二量体である。いくつかの態様において、Fc領域は、ホモ二量体Fc領域である。

【0019】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、Fc領域は、ヒトIgG1である。

【0020】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、Fc領域は、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:8に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

【0021】

いくつかの態様において、Fc領域は、ヘテロ二量体Fc領域である。いくつかの態様において、Fc領域は、エフェクター機能を示す。いくつかの態様において、Fc領域は、エフェクター機能を低減させ、かつ/またはFc 受容体もしくはC1qより選択されるエフェクター分子との結合を低減させる、1つまたは複数のアミノ酸改変を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変は、Glu233、Leu234、またはLeu235のうちの1つまたは複数の欠失である。

【0022】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、Fc領域は、SEQ ID NO:9に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:9に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む。

【0023】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:244~318および455のうちのいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO:244~318および455のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

【0024】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:102、244~318、401~409、416、455、476~480~488、および507~518のうちのいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO:102、244~318、401~409、416、455、476~480~488、および507~518のう

10

20

30

40

50

ちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

【0025】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:102、244~275、277~300、302~305、314、401、416、455、476~480~488、および507~518のうちのいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO:102、244~275、277~300、302~305、314、401、416、455、476~480~488、および507~518のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

10

【0026】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO:244に示される配列、(ii) SEQ ID NO:244のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:244に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:319、320、321、322、323、324、325、および326からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:336、337、および338からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:354に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:319、336、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:319、337、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:319、338、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、338、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:321、338、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:322、338、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:323、338、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:324、338、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:325、338、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:326、338、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。前記の態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、DLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:245~257のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:245~257のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:245~257のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

20

30

40

【0027】

50

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO:258に示される配列、(ii) SEQ ID NO:258のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:258に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:327に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:339に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:355に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:327、339、および355に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:259～263のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:259～263のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:259～263のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

【0028】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO:264に示される配列、(ii) SEQ ID NO:264のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:264に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:328、329、または456に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:340に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:356に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:328、340、および356に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:329、340、および356に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:456、340、および356に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。前記の態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、DLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:265～274、416、もしくは455のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:265～274もしくは416もしくは455のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:265～274、416、455、もしくは476～478のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:265～274、416、455、もしくは476～478のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:265～274、416、455、または476～478のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

【0029】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHド

10

20

30

40

50

メインは、(i) SEQ ID NO:275に示される配列、(ii) SEQ ID NO:275のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:275に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:320に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:341に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:357に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:276～279のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:276～279のうちのいずれか1つに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:276～279のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:277～279および479のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:277～279および479のうちのいずれか1つに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:277～279および479のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

10

20

【0030】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO:280に示される配列、(ii) SEQ ID NO:280のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:280に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:330に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:342に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:358に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:281～286のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:281～286のうちのいずれか1つに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:281～286のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

30

【0031】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO:287に示される配列、(ii) SEQ ID NO:287のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:287に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:320に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:345、346、および347からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:359、360、および361からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、345、および359に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、346、および359に示されるCDR1、C

40

50

DR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、347、および359に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、345、および360に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、345、および361に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、347、および360に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、前記の提供されたDLL3 VHHドメインのうちのいずれかは、DLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:288～298もしくは102のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:288～298もしくは102のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:288～298または102のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

【0032】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO:299に示される配列、(ii) SEQ ID NO:299のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:299に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:331に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:348、349、および350からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:356に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:331、348、および356に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:331、349、および356に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:331、350、および356に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、前記の提供されたDLL3 VHHドメインのうちのいずれかは、DLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:300～305のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:300～305のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:300、302～305、および480のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:300、302～305、および480のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:300、302～305、および480のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

【0033】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO:507に示される配列、(ii) SEQ ID NO:507のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:507に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89

10

20

30

40

50

%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO:306に示される配列、(ii) SEQ ID NO:306のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:306に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:332に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:348、349、および350からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:362に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:332、348、および362に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:332、349、および362に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:332、350、および362に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:300～305のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:307～313のうちのいずれか1つに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:307～313のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:508～514のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:508～514のうちのいずれか1つに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:508～514のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

【0034】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO:401に示される配列、(ii) SEQ ID NO:401のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:401に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:320に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:384、410、および411からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:395、412、413、414、および415からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、384、および395に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、410、および395に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、411、および395に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、384、および412に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、384、および413に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、384、および414に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、384

10

20

30

40

50

、および415に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:402~409のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:402~409のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:402~409のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:481~488のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:481~488のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:481~488のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

10

【0035】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:333、351、および363に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれ334、352、および364に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれ320、353、および365に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれ334、339、および366に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、それぞれ335、348、および367に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、DLL3 VHHドメインは、DLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO:314、315、316、317、もしくは318に示される配列、(ii) SEQ ID NO:314、315、316、317、もしくは318のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:314、315、316、317、もしくは318に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:314、315、316、317、または318に示され、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO:314、518、515、516、もしくは517に示される配列、(ii) SEQ ID NO:314、518、515、516、もしくは517のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:314、518、515、516、もしくは517に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:314、518、515、516、または517に示され、かつDLL3と結合する。

20

30

40

【0036】

いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:244に示されるVHHドメイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:251に示されるVHHドメイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:264に示されるVHHドメイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:268に示されるVHHドメイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:275に示されるVHHドメイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:287に示されるVHHド

50

メイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:299に示されるVHHドメイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:507に示されるVHHドメイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:314に示されるVHHドメイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:518に示されるVHHドメイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:515に示されるVHHドメイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:516に示されるVHHドメイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:517に示されるVHHドメイン配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:455に示されるVHHドメイン配列を含む。

10

【0037】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、DLL3 VHHドメインは、例えば、他のポリペプチドのような他のアミノ酸配列との連結のため、N末端および/またはC末端に、追加のアミノ酸を含み得る。提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、DLL3 VHHドメインは、グリシンリンカー、またはGSリンカーとして本明細書において示される、アミノ酸グリシンおよびセリンから主に構成されるリンカーのような、可動性リンカーを含み得る。本開示のそのようなリンカーは、様々な長さ、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20アミノ酸長であり得る。いくつかの態様において、リンカーは、GGSGGS、即ち、(GGG)₂ (SEQ ID NO: 1); GGSGGSGGS、即ち、(GGG)₃ (SEQ ID NO: 2); GGSGGSGGSGGS、即ち、(GGG)₄ (SEQ ID NO: 3); および GGSGGSGGSGGSGGS、即ち、(GGG)₅ (SEQ ID NO: 4); Gly-Gly (GG), GGG, GGGG (SEQ ID NO: 5), GGGGG (SEQ ID NO: 6), および GGGGGG (SEQ ID NO: 7)

20

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、リンカーは、(GGGGG)_n (nは1～5である) (SEQ ID NO:123); (GGGGGS)_n (nは1～4である) (SEQ ID NO:124); GGGGS (SEQ ID NO:125); GGGGGS (SEQ ID NO:126); GGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:127); GGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:128); GGSGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:129); または PGGGG (SEQ ID NO:450)

30

である。いくつかの態様において、リンカーは、GGリンカーである。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、GSリンカーとグリシンリンカーとの組み合わせを含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、例えば、他のポリペプチドのような他のアミノ酸配列との連結のため、C末端に、追加のリンカーを含み得る。提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、DLL3 VHHドメインは、他のポリペプチドのような他のアミノ酸配列との連結のため、N末端に、リンカーを含み得る。

【0038】

40

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO:244に示される配列、(ii) SEQ ID NO:244のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:244に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

【0039】

(a) 第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドを含むヘテロ二量体Fc領域を含む、第1の構成要素、ならびに(b) 可変重鎖領域(VH)および可変軽鎖領域(VL)を含む抗CD3抗体または抗原結合断片を含む、第2の構成要素を含む多重特異性ポリペプチド構築物であって、抗CD3抗体または抗原結合断片を構成するVHおよびVLがヘテロ二量体F

50

cの相対するポリペプチドに連結されており；第1および第2の構成要素がリンカーによってカップリングされており、ヘテロ二量体Fc領域が抗CD3抗体に対してN末端に位置付けられており；第1および第2の構成要素のうち的一方または両方が、DLL3と特異的に結合するVHHドメイン（DLL3 VHHドメイン）を含む少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、多重特異性ポリペプチド構築物が、本明細書中に提供される。具体的な態様において、DLL3 VHHドメインは、提供されたDLL3 VHHドメイン配列のうちのいずれか、例えば、前記のまたは本明細書中の他の場所に記載される任意のものを含み得る。

【0040】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも、(i)ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインを含む、第1のポリペプチド；ならびに(ii)ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意で、第1のポリペプチドに存在するのと同じリンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方を含む、第2のポリペプチドを含み、ここで、第1および第2のポリペプチドのうち的一方または両方は、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインを含む。

10

【0041】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fc領域の第1および第2のFcポリペプチドのうち的一方または両方は、ホモ二量体Fc領域のポリペプチドと比較して、任意で、SEQ ID NO:8に示されるFcポリペプチドまたはその免疫活性断片と比較して、ヘテロ二量体化を誘導する少なくとも1つの改変を含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fc領域の第1および第2のFcポリペプチドの各々は、独立して、少なくとも1つのアミノ酸改変を含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fc領域の第1および第2のFcポリペプチドの各々は、ノブイントゥホール(knob-into-hole)改変を含むか、または該ポリペプチドの静電的相補性を増加させる電荷の変異を含む。

20

【0042】

いくつかの態様において、アミノ酸改変は、ノブイントゥホール改変である。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドは、Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val、およびそれらの組み合わせの中より選択される改変を含み、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチドは、改変Thr366Trpを含む。そのような態様において、第1および第2のFcポリペプチドは、非システイン残基のシステイン残基への改変をさらに含んでいてよく、ここで、第1のFcポリペプチドの改変は、位置Ser354およびTyr349のうち的一方にあり、第2のFcポリペプチドの改変は、位置Ser354およびTyr349のもう一方にある。

30

【0043】

いくつかの態様において、アミノ酸改変は、ポリペプチドの静電的相補性を増加させる電荷の変異である。いくつかの態様において、第1および/もしくは第2のFcポリペプチドは、または第1および第2のFcポリペプチドの各々は、相補的な位置に改変を含み、ここで、改変は、もう一方のポリペプチドの相補的なアミノ酸と反対の電荷を有するアミノ酸での置換である。

【0044】

40

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、ヘテロ二量体Fcの第1または第2のFcポリペプチドのうち的一方は、残基Ile253における改変をさらに含む。いくつかの態様において、改変は、Ile253Argである。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの第1または第2のFcポリペプチドのうち的一方は、残基His435における改変をさらに含む。いくつかの態様において、改変は、His435Argである。

【0045】

いくつかの態様において、提供されたポリペプチドまたは構築物のうちのいずれかのFc領域は、Lys447を欠くポリペプチドを含む。

【0046】

いくつかの態様において、提供されたポリペプチドまたは構築物のうちのいずれかのFc

50

領域は、FcRn結合を増強するための少なくとも1つの改変を含む。いくつかの態様において、改変は、Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される位置にある。いくつかの態様において、改変は、Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される。いくつかの態様において、改変は、位置Met252および位置Met428にある。いくつかの態様において、改変は、Met252YおよびMet428Lである。いくつかの態様において、改変は、Met252YおよびMet428Vである。

【0047】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、ヘテロ二量体Fcの第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:103、107、115、または117のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:104、108、111、113、119、または121のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

10

【0048】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、提供されたポリペプチドまたは構築物のFc領域は、エフェクター機能を低減させ、かつ/またはFc受容体もしくはC1qより選択されるエフェクター分子との結合を低減させる、少なくとも1つのアミノ酸改変を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、1つまたは複数のアミノ酸改変は、Glu233、Leu234、またはLeu235のうちの1つまたは複数の欠失である。

【0049】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、ヘテロ二量体Fcの第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:105、109、116、または118のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:106、110、112、114、120、または122のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

20

【0050】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、抗CD3抗体または抗原結合断片は、1価である。いくつかの態様において、抗CD3抗体または抗原結合断片は、Fv抗体断片である。いくつかの態様において、Fv抗体断片は、ジスルフィド安定化抗CD3結合Fv断片(dsFv)を含む。

【0051】

いくつかの態様において、抗CD3抗体または抗原結合断片は、単鎖抗体ではなく、任意で、単鎖可変断片(scFv)ではない。

30

【0052】

いくつかの態様において、抗CD3抗体または抗原結合断片は、アミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO:29)を含むVH CDR1；

アミノ酸配列

RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30)

を含むVH CDR2；

アミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

40

を含むVH CDR3；

アミノ酸配列

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

を含むVL CDR1；

アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:33) を含むVL CDR2；および

アミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO:34) を含むVL CDR3を含む。いくつかの態様において、抗CD3抗体または抗原結合断片は、SEQ ID NO:35～65のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:35～65のうちのいずれかに対して少なくとも90%、91

50

%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有する、VH；ならびにSEQ ID NO:66～84および368のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:66～84および368のうちのいずれかに対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有する、VLを含む。いくつかの態様において、抗CD3抗体または抗原結合断片は、SEQ ID NO:47のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:75のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗CD3抗体または抗原結合断片は、SEQ ID NO:47のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:368のアミノ酸配列を含む。

【0053】

いくつかの態様において、抗CD3抗体または抗原結合断片のVLは、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドに連結されており、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHは、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチドに連結されている。

【0054】

いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、多重特異性構築物のFc領域に対してアミノ末端におよび/または該多重特異性構築物のCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられている。

【0055】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、DLL3と特異的に結合する第1のDLL3 VHHドメインおよびDLL3と特異的に結合する第2のDLL3 VHHドメインを含む。具体的な態様において、第1のDLL3 VHHドメインまたは第2のDLL3 VHHドメインは、独立して、提供されたDLL3 VHHドメインのうちのいずれか、例えば、前記のまたは本明細書中の他の場所に記載される任意のものを含み得る。いくつかの態様において、第1および第2のDLL3 VHHドメインは、同一である。いくつかの態様において、第1および第2のDLL3 VHHドメインは異なっている。いくつかの態様において、第1および第2のDLL3 VHHドメインは、DLL3の別個のもしくは重複しないエピトープと結合し、かつ/またはDLL3との結合について競合しない。

【0056】

いくつかの態様において、第1または第2のDLL3 VHHドメインは、多重特異性構築物のFc領域に対してアミノ末端に位置付けられており、第1または第2のDLL3 VHHドメインのもう一方は、多重特異性構築物のCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられている。

【0057】

提供された多重特異性ポリペプチド構築物のうちのいずれかのいくつかの態様において、第1の構成要素は、N末端からC末端への順序で、DLL3と結合する第1のDLL3 VHHドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメイン、およびDLL3と結合する第2のDLL3 VHHドメインを含み；第2のポリペプチドは、N末端からC末端への順序で、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意で、第1の構成要素に存在するのと同じリンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方を含む。

【0058】

いくつかの態様において、第1および第2の構成要素のうちの一方または両方は、共刺激受容体と結合する少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）は、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端におよび/または該多重特異性ポリペプチド構築物のCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられている。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、共刺激受容体結合領域（CRBR）を1つだけ含む。

【0059】

提供された多重特異性ポリペプチド構築物のうちのいずれかのいくつかの態様において、第1の構成要素は、N末端からC末端への順序で、DLL3と結合する第1のDLL3 VHHドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原

10

20

30

40

50

結合断片のVHまたはVLドメイン、およびDLL3と結合する第2のDLL3 VHHドメインを含み；第2の構成要素は、CRBRを含み、かつ、N末端からC末端への順序で、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意で、第1の構成要素に存在するのと同じリンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方を含み、ここで、CRBRは、第2の構成要素のFc領域に対してアミノ末端にまたは抗CD3抗体もしくは抗原結合断片に対してカルボキシ末端に位置付けられている。

【0060】

いくつかの態様において、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）は、共刺激受容体の天然同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、または共刺激受容体との結合活性を示すそのバリエーションであるか、あるいはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）は、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、Fv、scFv、Fab、シングルドメイン抗体（VHHドメイン）、VNAR、またはVHHである。いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、VHHドメインである。いくつかの態様において、VHHドメインは、ヒトVHHドメインまたはヒト化VHHドメインである。

【0061】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）は、41BB（CD137）、OX40（CD134）、CD27、グルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質（GITR）、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体（BAFF-R）、B細胞成熟抗原（BCMA）、膜貫通型アクチベーターおよびCAMLインタラクタ（Transmembrane activator and CAML interactor）（TACI）、およびNKGD2の中より選択される共刺激受容体と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）は、41BB（CD137）、OX40（CD134）、およびグルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質（GITR）の中より選択される共刺激受容体と結合する。

【0062】

いくつかの態様において、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）は、SEQ ID NO:210に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:210に示される配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する配列を含み、かつ4-1BBと結合する。

【0063】

いくつかの態様において、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）は、SEQ ID NO:210に示されるアミノ酸の配列を含み、かつ4-1BBと結合する。

【0064】

いくつかの態様において、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）は、SEQ ID NO:470に示されるアミノ酸の配列を含み、かつ4-1BBと結合する。

【0065】

いくつかの態様において、第1および第2の構成要素のうちの一方または両方は、抑制性受容体と結合する少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）は、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端におよび/または該多重特異性ポリペプチド構築物のCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられている。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、抑制性受容体結合領域（IRBR）を1つだけ含む。

【0066】

提供された多重特異性ポリペプチド構築物のうちのいずれかのいくつかの態様において、第1の構成要素は、N末端からC末端への順序で、DLL3と結合する第1のDLL3 VHHドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原

10

20

30

40

50

結合断片のVHまたはVLドメイン、およびDLL3と結合する第2のDLL3 VHHドメインを含み；第2の構成要素は、IRBRを含み、かつ、N末端からC末端への順序で、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意で、第1の構成要素に存在するのと同じリンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方を含み、ここで、IRBRは、第2の構成要素のFc領域に対してアミノ末端にまたは抗CD3抗体もしくは抗原結合断片に対してカルボキシ末端に位置付けられている。

【0067】

いくつかの態様において、少なくとも1つのIRBRは、抑制性受容体の天然同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、または抑制性受容体との結合活性を示すそのバリエーションであるか、あるいはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのIRBRは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合断片は、Fv、scFv、Fab、シングルドメイン抗体（VHHドメイン）、VNAR、またはVHHである。いくつかの態様において、抗体または抗原結合断片は、VHHドメインである。いくつかの態様において、VHHドメインは、ヒトVHHドメインまたはヒト化VHHドメインである。いくつかの態様において、少なくとも1つのIRBRは、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、またはTIM3の中より選択される抑制性受容体と結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのIRBRは、PD-1と結合する。

【0068】

多重特異性ポリペプチド構築物の提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、第1の構成要素は、N末端からC末端への順序で、DLL3と結合する第1のDLL3 VHHドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメイン、およびDLL3と結合する第2のDLL3 VHHドメインを含み；第2の構成要素は、N末端からC末端への順序で、IRBRまたはCRBRのうちの一方、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意で、第1の構成要素に存在するのと同じリンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方、およびCRBRまたはIRBRのもう一方を含む。

【0069】

提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、リンカーは、ペプチドリナーまたはポリペプチドリナーである。いくつかの態様において、リンカーは、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20アミノ酸長である。

【0070】

いくつかの態様において、リンカーは、GS, GGS, GGGGS (SEQ ID NO: 125), GGGGGS (SEQ ID NO: 126)

、およびそれらの組み合わせを含むリンカーのような切断不可能リンカーである。いくつかの態様において、リンカーは、配列GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 127)

であるか、またはそれを含む。

【0071】

いくつかの態様において、リンカーは、プロテアーゼの基質として機能するポリペプチドのような切断可能リンカーである。いくつかの態様において、プロテアーゼは、免疫エフェクター細胞によって、腫瘍によって、または腫瘍微小環境に存在する細胞によって産生される。いくつかの態様において、プロテアーゼは、免疫エフェクター細胞によって産生され、免疫エフェクター細胞は、活性化T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、またはNK T細胞である。いくつかの態様において、プロテアーゼは、マトリプターゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、グランザイムB、またはそれらの組み合わせである。

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、アミノ酸配列
GGSGGGGIEPDIGGSGGS (SEQ ID NO: 171)

を含む。

【0072】

DLL3と結合し、かつ本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメイン配列のうちのいずれか、例えば、前記のまたは本明細書中の他の場所に記載される任意のものを含有する、単離されたシングルドメイン抗体が、本明細書中に提供される。

【0073】

SEQ ID NO:319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、および456からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1 (CDR1) ; SEQ ID NO:336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、384、410、および411からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2 (CDR2) ; ならびにSEQ ID NO:354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、および367、395、および412~415からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3 (CDR3) を含む、DLL3と結合する単離されたシングルドメイン抗体が、本明細書中に提供される。

10

【0074】

本明細書中に提供されたDLL3結合ポリペプチド構築物のうちのいずれかをコードするポリヌクレオチドが、本明細書中に提供される。

20

【0075】

本明細書中に提供された多重特異性ポリペプチド構築物のうちのいずれか、またはその第1もしくは第2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、ポリヌクレオチドは、提供された多重特異性構築物の第1のポリペプチドをコードする第1の核酸と、第2のポリペプチドをコードする第2の核酸とを含み、ここで、第1および第2の核酸配列は、配列内リボソーム進入部位 (IRES) によってまたはT2A、P2A、E2A、もしくはF2Aのような、自己切断ペプチドもしくはリボソームスキッピングを引き起こすペプチドをコードする核酸によって隔てられている。

【0076】

提供されたシングルドメイン抗体のうちのいずれかをコードするポリヌクレオチドも、提供される。

30

【0077】

提供されたポリヌクレオチドのうちのいずれかをコードする発現ベクターのようなベクターも、提供される。

【0078】

提供された1つもしくは複数のポリヌクレオチドのうちのいずれかまたは提供された1つもしくは複数のベクターのうちのいずれかを含有細胞が、本明細書中に提供される。

【0079】

提供された1つもしくは複数のポリヌクレオチドまたは1つもしくは複数のベクターのうちのいずれかを細胞へ導入する工程、および多重特異性ポリペプチド構築物を産生する条件下で細胞を培養する工程を含む、ポリペプチドを産生する方法が、本明細書中に提供される。本明細書中に提供された方法のうちのいずれかによって産生されたポリペプチドが、本明細書中に提供される。

40

【0080】

提供されたDLL3 VHHドメイン配列シングルドメイン抗体のうちのいずれかを含有細胞外ドメイン ; 膜貫通ドメイン ; および細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体を含む操作された免疫細胞が、本明細書中に提供される。

【0081】

提供されたDLL3結合ポリペプチド、多重特異性ポリペプチド構築物、シングルドメイ

50

ン抗体、または操作された免疫細胞のうちのいずれかを含有する薬学的組成物が、本明細書中に提供される。

【0082】

その必要がある対象に、提供されたDLL3結合ポリペプチド、多重特異性ポリペプチド構築物、シングルドメイン抗体、または操作された免疫細胞、または薬学的組成物のうちのいずれかを投与する工程を含む、対象における免疫応答を刺激するかまたは誘導する方法が、本明細書中に提供される。

【0083】

その必要がある対象に、治療有効量の、本明細書中に記載されたDLL3結合ポリペプチドのうちのいずれか、本明細書中に記載された多重特異性ポリペプチド構築物のうちのいずれか、本明細書中に記載されたシングルドメイン抗体のうちのいずれか、本明細書中に記載された操作された免疫細胞のうちのいずれか、または本明細書中に記載された薬学的組成物のうちのいずれかを投与する工程を含む、対象における疾患または状態を処置する方法も、本明細書中に提供される。

【図面の簡単な説明】

【0084】

【図1】図1は、様々な抗DLL3シングルドメイン抗体(sdAb)の、細胞表面DLL3と結合する能力を図示するグラフを示す。結合は、DLL3陽性細胞株SHP-77においてフローサイトメトリーによって査定された。ここで、DLL3 sdAb、10D9、10E5、8E7、5A7、5A8、5H8、3G3、6C5、6F1、3B4、3B12、または6B4は、ヒトFcと機能的に連結されていた。

【図2-1】図2A~Lは、DLL3を標的とするsdAbおよびそのヒト化バリエーションの、細胞表面DLL3と結合する能力を図示する一連のグラフを示す。結合は、DLL3陽性細胞株SHP-77またはDLL3をコードするベクターによって一過性トランスフェクトされたHEK-293 freestyle細胞においてフローサイトメトリーによって査定された。図2Aは、SHP-77における3G3およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。図2Bは、SHP-77における5A7およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。図2Cは、SHP-77における3C5およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。図2Dは、SHP-77における6C5およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。図2E~Gは、SHP-77(図2Eおよび2F)およびDLL3によってトランスフェクトされた293FS(FL)(図2G)における5A8およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。図2Hは、SHP-77における10D9およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。図2Iは、SHP-77における10E5およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。図2Jおよび2Kは、それぞれSHP-77およびDLL3によってトランスフェクトされた293FS細胞における8E7およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。図2Lは、SHP-77における6F1およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。ここで、DLL3 sdAbは、ヒトFcと機能的に連結されていた。

【図2-2】図2-1の説明を参照されたい。

【図2-3】図2-1の説明を参照されたい。

【図2-4】図2-1の説明を参照されたい。

【図2-5】図2-1の説明を参照されたい。

【図2-6】図2-1の説明を参照されたい。

【図3A】図3A~3Eは、様々なDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物を表す一連の模式図を図示する。制約されたCD3結合を有する本開示のDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物の基本構成要素。抗原結合ドメインは、アミノ末端におよび/またはカルボキシル末端に位置付けられている。ヘテロ二量体Fc領域のようなFc領域は、CD3結合領域に対してN末端に位置付けられる。CD3結合領域のすぐ近くにおけるFcのこの位置付けは、CD3結合を妨害する。

【図3B】図3Aの説明を参照されたい。

【図3C】図3Aの説明を参照されたい。

【図3D】図3Aの説明を参照されたい。

【図 3 E】図 3A の説明を参照されたい。

【図 4】図 4A ~ 4B は、DLL3 標的制約 CD3 エンゲージング構築物 cx4720 の、DLL3 陽性細胞 SHP-77 との結合（図 4A）、および初代ヒト T 細胞との結合の欠如（図 4B）を証明する。結合は、抗ヒト IgG APC 二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の 200nM におけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

【図 5】図 5A ~ 5B は、DLL3 標的制約 CD3 エンゲージング構築物 cx3715 の、DLL3 陽性細胞 SHP-77 との結合（図 5A）、および初代ヒト T 細胞との結合の欠如（図 5B）を証明する。結合は、抗ヒト IgG APC 二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の 200nM におけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

10

【図 6】図 6A ~ 6B は、DLL3 標的制約 CD3 エンゲージング構築物 cx4422 の、DLL3 陽性細胞 SHP-77 との結合（図 6A）、および初代ヒト T 細胞との結合の欠如（図 6B）を証明する。結合は、抗ヒト IgG APC 二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の 200nM におけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

【図 7】図 7A ~ 7B は、DLL3 標的制約 CD3 エンゲージング構築物 cx3708 の、DLL3 陽性細胞 SHP-77 との結合（図 7A）、および初代ヒト T 細胞との結合の欠如（図 7B）を証明する。結合は、抗ヒト IgG APC 二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の 200nM におけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

20

【図 8】図 8A ~ 8B は、DLL3 標的制約 CD3 エンゲージング構築物 cx4052 の、DLL3 陽性細胞 SHP-77 との結合（図 8A）、および初代ヒト T 細胞との結合の欠如（図 8B）を証明する。結合は、抗ヒト IgG APC 二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の 200nM におけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

【図 9】図 9A ~ 9B は、DLL3 標的制約 CD3 エンゲージング構築物 cx3985 の、DLL3 陽性細胞 SHP-77 との結合（図 9A）、および初代ヒト T 細胞との結合の欠如（図 9B）を証明する。結合は、抗ヒト IgG APC 二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の 200nM におけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

30

【図 10】図 10A ~ 10B は、DLL3 標的制約 CD3 エンゲージング構築物 cx4059 の、DLL3 陽性細胞 SHP-77 との結合（図 10A）、および初代ヒト T 細胞との結合の欠如（図 10B）を証明する。結合は、抗ヒト IgG APC 二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の 200nM におけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

【図 11】図 11A ~ 11B は、DLL3 標的制約 CD3 エンゲージング構築物 cx4087 の、DLL3 陽性細胞 SHP-77 との結合（図 11A）、および初代ヒト T 細胞との結合の欠如（図 11B）を証明する。結合は、抗ヒト IgG APC 二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の 200nM におけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

40

【図 12】図 12A ~ 12B は、DLL3 標的制約 CD3 エンゲージング構築物 cx4088 の、DLL3 陽性細胞 SHP-77 との結合（図 12A）、および初代ヒト T 細胞との結合の欠如（図 12B）を証明する。結合は、抗ヒト IgG APC 二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の 200nM におけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

【図 13】図 13A ~ 13B は、DLL3 標的制約 CD3 エンゲージング構築物 cx4895 の、DLL3 陽性細胞 SHP-77 との結合（図 13A）、および初代ヒト T 細胞との結合の欠如（図 13B）を証明する。結合は、抗ヒト IgG APC 二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の 200nM におけるノーマラ

50

イズされた細胞数対蛍光を示す。

【図 1 4】図14A～14Bは、DLL3標的制約CD3エンゲージング構築物cx3991の、DLL3陽性細胞SHP-77との結合（図14A）、および初代ヒトT細胞との結合の欠如（図14B）を証明する。結合は、抗ヒトIgG APC二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の200nMにおけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

【図 1 5】図15A～15Bは、DLL3標的制約CD3エンゲージング構築物cx3711の、DLL3陽性細胞SHP-77との結合（図15A）、および初代ヒトT細胞との結合の欠如（図15B）を証明する。結合は、抗ヒトIgG APC二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の200nMにおけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

10

【図 1 6】図16A～16Bは、DLL3標的制約CD3エンゲージング構築物cx4887の、DLL3陽性細胞SHP-77との結合（図16A）、および初代ヒトT細胞との結合の欠如（図16B）を証明する。結合は、抗ヒトIgG APC二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の200nMにおけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

【図 1 7】図17A～17Bは、DLL3標的制約CD3エンゲージング構築物cx4896の、DLL3陽性細胞SHP-77との結合（図17A）、および初代ヒトT細胞との結合の欠如（図17B）を証明する。結合は、抗ヒトIgG APC二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の200nMにおけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

20

【図 1 8】図18A～18Bは、DLL3標的制約CD3エンゲージング構築物cx4899の、DLL3陽性細胞SHP-77との結合（図18A）、および初代ヒトT細胞との結合の欠如（図18B）を証明する。結合は、抗ヒトIgG APC二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の200nMにおけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

【図 1 9】図19A～19Bは、DLL3標的制約CD3エンゲージング構築物cx4406の、DLL3陽性細胞SHP-77との結合（図19A）、および初代ヒトT細胞との結合の欠如（図19B）を証明する。結合は、抗ヒトIgG APC二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の200nMにおけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

30

【図 2 0】図20A～20Bは、DLL3標的制約CD3エンゲージング構築物cx3707の、DLL3陽性細胞SHP-77との結合（図20A）、および初代ヒトT細胞との結合の欠如（図20B）を証明する。結合は、抗ヒトIgG APC二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の200nMにおけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

【図 2 1】図21A～21Bは、DLL3標的制約CD3エンゲージング構築物cx3710の、DLL3陽性細胞SHP-77との結合（図21A）、および初代ヒトT細胞との結合の欠如（図21B）を証明する。結合は、抗ヒトIgG APC二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の200nMにおけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

40

【図 2 2】図22A～22Bは、DLL3標的制約CD3エンゲージング構築物cx4888の、DLL3陽性細胞SHP-77との結合（図22A）、および初代ヒトT細胞との結合の欠如（図22B）を証明する。結合は、抗ヒトIgG APC二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の200nMにおけるノーマライズされた細胞数対蛍光を示す。

【図 2 3】図23A～23Bは、DLL3標的制約CD3エンゲージング構築物cx4890の、DLL3陽性細胞SHP-77との結合（図23A）、および初代ヒトT細胞との結合の欠如（図23B）を証明する。結合は、抗ヒトIgG APC二次抗体を使用したフローサイトメトリーによって査定された。ヒストグラムは、他に特記されない限り、各構築物の200nMにおけるノーマラ

50

イズされた細胞数対蛍光を示す。

【図 2 4】図24A～24Bは、DLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物の、DLL3依存的なT細胞活性化を誘発する能力を証明するグラフを図示する。Jurkat CD3 NFAT-GFPレポーター細胞株が、T細胞活性化をモニタリングするために使用された。SHP-77細胞（図24A）およびHEK-293 freestyle細胞（図24B）が、それぞれ、抗原陽性細胞株および陰性細胞株として使用された。

【図 2 5 - 1】図25A～25Dは、2エピトープ性のDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物の、DLL3依存的なT細胞活性化を誘発する能力を証明するグラフを図示する。Jurkat CD3 NFAT-GFPレポーター細胞株が、T細胞活性化をモニタリングするために使用された。SHP-77細胞（図22Aおよび22C）ならびにHEK-293 freestyle細胞（図22Bおよび22D）が、それぞれ、抗原陽性細胞株および陰性細胞株として使用された。

10

【図 2 5 - 2】図25-1の説明を参照されたい。

【図 2 6】図26A～26Bは、DLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物の、DLL3陽性SHP-77細胞（図26A）およびDLL3陰性HEK-293 Freestyle細胞（図26B）において抗原特異的なT細胞細胞傷害を媒介する能力を証明するグラフを図示する。

【図 2 7 - 1】図27A～27Bは、DLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物の、DLL3陽性SHP-77細胞（図27Aおよび27C）ならびにDLL3陰性HEK-293 Freestyle細胞（図27Bおよび27D）において抗原特異的なT細胞活性化を媒介する能力を証明するグラフを図示する。

【図 2 7 - 2】図27-1の説明を参照されたい。

20

【図 2 8】図28は、DLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物の、T細胞からのサイトカイン産生を抗原依存的に誘発する能力を証明する。サイトカイン産生は、ELISA法を使用してモニタリングされた。

【図 2 9 A】図29Aは、2つのポリペプチド、鎖1および鎖2から構成された、DLL3を標的とする3つの制約CD3構築物の模式図である。鎖1は、共刺激受容体ターゲティングsdAbに連結された、G100Cにおいて改変された抗CD3 VLドメインに切断不可能リンカーを介して連結された、ヘテロ二量体Fc「ホール」を含有する。鎖2は、第2のDLL3標的型sdAbに連結された、G44Cにおいて改変された抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結された、相補的なヘテロ二量体Fc「ノブ」に連結された、DLL3標的型sdAb（上）；DLL3標的型sdAbに連結された、G44Cにおいて改変された抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結された、ヘテロ二量体Fc「ノブ」（中央）；またはG44Cによって改変された抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結された、相補的なヘテロ二量体Fc「ノブ」に連結された、DLL3標的型sdAb（下）のいずれかを含有する。得られた構築物は、2価（上）または1価（中央および下）のいずれかでDLL3にエンゲージする。ここでの構築物は、全て、共刺激受容体ターゲティングsdAbを含有する。

30

【図 2 9 B】図29Bは、2つのポリペプチド、鎖1および鎖2から構成された、DLL3を標的とする制約CD3構築物cx5499の模式図である。cx5499は、鎖1のC末端に共刺激受容体ターゲティングsdAbを欠くことを除き、図29A（上）に示されるcx5352と同一である。同時発現させた時、それぞれ、ホールおよびノブにおけるVL:VHの会合を介して、CD3結合ドメインが適切に組み立てられる。VH:VL相互作用は、改変型残基、VHドメインのG44CとVLドメインのG100Cとの間の操作されたジスルフィド結合によって安定化されている。

40

【図 3 0】図30A～30Bは、DLL3を標的とする代表的な1価（cx5800およびcx5801）、2価（cx5352）の制約CD3エンゲージング構築物が、DLL3発現細胞株SHP-77（図30A）と結合し、単離されたT細胞（図30B）とは結合しないことを証明する。結合は、フローサイトメトリーによって査定された。図30Cは、DLL3を標的とする代表的な制約CD3エンゲージング構築物の、DLL3陽性SHP-77細胞の存在下でCD3シグナル伝達を作動させる能力を図示する。DLL3陽性細胞の、DLL3に対して2価であり2エピトープ性である構築物（cx5352）とのエンゲージングは、DLL3に対して1価である構築物（cx5800およびcx5801）より強力なT細胞活性化を誘導した。Jurkat CD3 NFATルシフェラーゼレポ

50

ーター細胞株が、CD3作動を査定するために使用された。

【図31-1】図31A~31Eは、DLL3を標的とする代表的な制約CD3エンゲージング構築物cx5499の、DLL3陽性SHP-77細胞の存在下でT細胞媒介細胞傷害およびT細胞活性化を誘発する能力を証明する。図31Aは、DLL3を標的とする代表的な制約CD3エンゲージング構築物の、DLL3陽性SHP-77細胞の存在下でT細胞媒介細胞傷害を誘発する能力を証明する。図31B~31Eは、CD4+T細胞上のCD25の発現（図31B）、CD4+T細胞上のCD69発現（図31C）、CD8+T細胞上のCD25発現（図31D）、およびCD8+T細胞上のCD69発現（図31E）によって査定された、DLL3を標的とする代表的な制約CD3エンゲージング構築物の、DLL3陽性SHP-77細胞の存在下でT細胞活性化を誘発する能力を証明する。

【図31-2】図31-1の説明を参照されたい。

10

【図32】図32は、41BB結合ドメインを含むDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物cx5352は、41BBシグナル伝達を媒介することができるが、41BB結合ドメインを欠く同一の構築物cx5499は、それができないことを示す。DLL3依存的な41BBシグナル伝達は、親HEK-293細胞またはDLL3の切断型バージョンを一過性発現するHEK-293細胞のいずれかと共培養されたJurkat 41BB NFκBルシフェラーゼレポーター細胞を使用してモニタリングされた。活性は、相対ルシフェラーゼ単位（RLU）として示される。

【図33】図33A~Bは、41BB結合ドメインを含む例示的なDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物cx5352によって、DLL3陽性細胞株SHP-77（図33A）またはDLL3陰性細胞株HEK-293FS（図33B）に対して駆動されたT細胞媒介細胞傷害の効力を図示する。3人の異なるT細胞ドナーが、このアッセイにおいて、エフェクター細胞の起源として使用された。

20

【図34】図34A~Cは、例示的なDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物、41BB結合ドメインを含むcx5352および41BB結合ドメインを含まない構築物cx5499によって駆動されたT細胞媒介細胞傷害の効力の差を示す。ここでは、10:1（図34A）、5:1（図34B）、または1.25:1（図34C）という様々なエフェクター（T細胞）と標的細胞（SHP-77）との比（エフェクター:標的細胞比）を比較した。ヒトPBMCがT細胞の起源として使用された。

【図35】図35は、DLL3陽性細胞株SHP-77の存在下での、代表的なDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物、41BB結合ドメインを含むcx5352および41BB結合ドメインを含まないcx5499の滴定液によって処理されたT細胞によるIFN γ 産生の比較を示す。

30

【図36】図36A~Bは、共刺激受容体結合領域（CRBR）を含む例示的なTAA標的型制約CD3エンゲージャーを図示する。構築物は、ヘテロ二量体の一方の鎖、FcノブのN末端およびC末端に位置付けられた抗原ターゲティングsdAbを有し、ヘテロ二量体の反対の鎖、FcホールのC末端に位置付けられた共刺激受容体結合領域（CRBR）を有するが、相互に反対側に位置付けられたCD3結合FvのVHおよびVLを有する。

【図37-1】図37A~Dは、図36A~Bに記載された例示的な構築物についてのT細胞レポーターアッセイの結果を図示する。図37Aおよび37Bは、TAA陽性細胞株A375またはTAA陰性細胞株CCRF-CEMが、それぞれ、Jurkat CD3 NFAT-GFPレポーター細胞と共培養された時のGFPレポーターの平均蛍光強度（MFI）を図示する。図37Cおよび37Dは、TAA陽性細胞株A375またはTAA陰性細胞株CCRF-CEMが、それぞれ、Jurkat CD3 NFATルシフェラーゼレポーター細胞と共培養された時のルシフェラーゼレポーターの相対発光単位（RLU）を図示する。

40

【図37-2】図37-1の説明を参照されたい。

【図38】図38A~Bは、NFATによって駆動されるルシフェラーゼレポーター遺伝子と共に、CD16aを安定的に発現するよう操作されたJurkatレポーター細胞株を使用したT細胞レポーターアッセイの結果を図示する。図38Aは、DLL3を発現するCHO細胞が、レポーター細胞と共培養され、IgG1 Fcを含有するDLL3標的型構築物の滴定液によって処理された時の、ルシフェラーゼレポーターの相対発光単位（RLU）を図示する。図38Bは、DLL3を発現する細胞の非存在下で、IgG1 Fcを含有するDLL3標的型構築物の滴定液によって処理された時の、ルシフェラーゼレポーターのRLUを図示する。

50

【発明を実施するための形態】

【0085】

詳細な説明

以後、DLL3結合ポリペプチドとも呼ばれる、DLL3と特異的に結合するポリペプチドが、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、提供された結合ポリペプチドは、DLL3と結合する少なくとも1つのVHHドメインを含む。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3結合ポリペプチドは、各々個々にDLL3と結合する1、2、3、4、5、6、7、または8つのVHHドメインを含む。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3結合ポリペプチドは、DLL3と結合する1、2、3、または4つのVHHドメインを含む。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、単一特異性である。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、多重特異性である。例えば、提供されたDLL3結合ポリペプチドには、DLL3と結合する少なくとも1つのVHHドメイン、およびDLL3以外の1つまたは複数の標的タンパク質と結合する1つまたは複数の追加のVHHドメインのような1つまたは複数の追加の結合ドメインを含み得るポリペプチドが含まれる。

10

【0086】

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、DLL3と結合する少なくとも1つのVHHドメイン、およびFcドメインを含む。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3結合ポリペプチドは、DLL3と結合する1、2、3、または4つのVHHドメイン、およびFcドメインを含む。いくつかの態様において、Fcドメインは、生理学的条件においてDLL3結合ポリペプチドの二量体化を媒介し、従って、二量体が形成され、DLL3結合部位の数が2倍になる。例えば、DLL3と結合する3つのVHHドメインおよびFc領域を含むDLL3結合ポリペプチドは、モノマーとしては3価であるが、生理学的条件においては、Fc領域が二量体化を媒介し、従って、そのような条件においては、DLL3結合ポリペプチドは、6価の二量体として存在する。

20

【0087】

DLL3は、デルタタンパク質リガンドファミリーのメンバーである。デルタタンパク質リガンドファミリーは、DSLドメイン、EGFリピート、および膜貫通ドメインを特徴とするノッチリガンドとして機能する。DLL3は、胎児脳において高度に発現されており、正常成体組織においてはそうでない。対照的に、DLL3は、小細胞肺癌（SCLC）、大細胞神経内分泌癌（LCNEC）、および卵巣癌を含むが、これらに限定されるわけではない、多様な腫瘍細胞および腫瘍血管系の表面において発現されている。正常な発達の経過において、ノッチを活性化するデルタタンパク質ファミリーメンバーとは対照的に、DLL3は、ノッチおよびDLL1と相互作用し、それぞれ、エンドソーム/リソソームコンパートメントまたはゴルジへそれらを向け直すか、または保持し、それによって、細胞表面への移行を防止することによって、シス作用性およびトランス作用性のノッチ経路活性化の両方を阻害する（Chapman et al., 2011, Hum Mol Genet. 20(5):905-16.; Serth et al., 2015, PLoS One. 10(4):e0123776.）。注目すべきことに、神経内分泌腫瘍において、ノッチ活性化は、腫瘍成長を抑制する（Kunnimalaiyaan and Chen, 2007, Oncologist. 12(5):335-42）。これらの観察は、DLL3が、ノッチシグナル伝達をダウンレギュレートすることによって、神経内分泌表現型に関連し、従って、神経内分泌腫瘍形成に寄与し得ることを示唆する。DLL3発現は、正常成体組織においては極めて限定されているが、悪性のSCLC、LCNEC、メラノーマ、膠芽腫、肺外神経内分泌癌（NEC）においては広範囲に及ぶ（Saunders et al., 2015, Sci Transl Med. 2015, 7(302):302ra136; Peng et al., 2016, J. Clin. Oncol., 34, no. 15_suppl 11611-11611）。さらに、腫瘍組織における高レベルのDLL3発現は、膠芽腫、甲状腺髄様癌、および神経内分泌膵臓癌（Peng et al., 2016, J. Clin. Oncol., 34, no. 15_suppl 11611-11611）、SCLCおよびLCNEC（Saunders et al., 2015, Sci Transl Med. 2015, 7(302):302ra136）、ならびにいくつかの卵巣癌（Hu et al., 2014, Cancer Res., 74(12):3282-3293）において、腫瘍ステージの進行および/または生存不良と相関した。

30

40

【0088】

50

標準ヒトDLL3の例示的な配列は、以下のように示される。

MVSPRMSGLLSQTIVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPG
LSEEAESPALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSFIETWREELG
DQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRS
APSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSP
RGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNNG
LCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRC
EHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHHGGRCYAHFSG
LVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLV
HVRRRGHSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSSVDWNRPEDVDPQGIYVI
SAPSIYAREVATPLFPPLHTGRAGQRQHLLFPYPSSILSVK (SEQ ID NO:86, 下線部はシグナル配列)

10

【0089】

非標準ヒトDLL3の例示的な配列は、以下のように示される。

MVSPRMSGLLSQTIVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPG
LSEEAESPALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSFIETWREELG
DQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRS
APSRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSP
RGPSSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNNG
LCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRC
EHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHHGGRCYAHFSG
LVCACAPGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLV
HVRRRGHSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSSVDWNRPEDVDPQGIYVI
SAPSIYAREA (SEQ ID NO:87, 下線部はシグナル配列)

20

【0090】

場合によっては、提供されるDLL3結合ポリペプチドは、DLL3の活性を直接遮断するかまたは抑制し、これを、いくつかの局面において、腫瘍細胞の成長または生存を抑制するかまたは低減させるための治療薬として用いることができる。

【0091】

多様なDLL3ポリペプチド結合形式が、提供される。いくつかの例において、DLL3結合ポリペプチドには、DLL3 VHH-Fcポリペプチドが含まれる。いくつかの態様において、Fcは、免疫エフェクター活性、例えば、抗体依存性細胞性細胞傷害活性(ADCC)、抗体依存性細胞性食作用(ADCP)、および/または補体依存性細胞傷害活性(CDC)などの1つまたは複数のエフェクター機能を示すFcである。

30

【0092】

いくつかの態様において、提供されるDLL3結合ポリペプチドを、対象において免疫応答を刺激するために用いることができ、これは、いくつかの局面において、対象においてがんなどの疾患または障害を処置する。いくつかの局面において、DLL3-Fcなどの本明細書で提供されるDLL3結合ポリペプチドは、DLL3発現腫瘍細胞に結合することができ、DLL3を発現する腫瘍細胞に対する能動免疫応答を誘導することができる。いくつかの場合には、能動免疫応答は、がん性細胞の死を引き起こす(例えば、がん細胞に対する抗体結合がアポトーシス性細胞死を誘導する)ことができ、または、がん性細胞の成長を抑制する(例えば、細胞周期の進行を遮断する)ことができる。他の場合には、DLL3 VHH-Fcなどの本明細書で提供されるDLL3結合ポリペプチドは、がん性細胞に結合することができ、抗体依存性細胞性細胞傷害活性(ADCC)が、DLL3結合ポリペプチドが結合するがん性細胞を排除することができる。場合によっては、提供されるDLL3 VHH結合ポリペプチドはまた、細胞性免疫応答および液性免疫応答を両方とも活性化して、より多くのナチュラルキラー細胞、またはがん性細胞を破壊する個体の免疫系をさらに活性化するサイトカイン(例えば、IL-2、IFN- γ 、IL-12、TNF- α 、TNF- β など)の産生増加を動員することができる。さらに別の態様において、DLL3 VHH-FcなどのDLL3結合ポリペプチドは、がん性細胞に結合することができ、マクロファージまたは他の食作用細胞が、例えばCDC

40

50

またはADCPプロセスを介して、がん性細胞をオプソニン化することができる。

【 0 0 9 3 】

他の局面において、また、多重特異性結合を示すVHH結合ポリペプチドも、本明細書において提供される。場合によっては、結合ポリペプチドには、DLL3と、CD3などのT細胞抗原に対して二重親和性を示すポリペプチドが含まれる。いくつかの局面において、そのような二重親和性分子は、腫瘍に発現したDLL3の結合時に、腫瘍の部位でT細胞をエンゲージするかまたは活性化することができる。特に、本明細書で提供されるそのような分子の中には、制約付きCD3結合を示す分子がある。また、DLL3結合ポリペプチドを含有するキメラ抗原受容体を発現する、操作されたT細胞などの操作された細胞も、本明細書において提供される。

10

【 0 0 9 4 】

本出願において言及される特許文書、科学論文、およびデータベースを含むすべての刊行物は、あたかも各々個々の刊行物が個別に参照により組み入れられるのと同じ程度まで、すべての目的でその全体が参照により組み入れられる。本明細書において示される定義が、参照により本明細書に組み入れられる特許、出願、公開出願、および他の刊行物において示される定義と相反するか、または別の形で一貫しない場合は、本明細書において示される定義が、参照により本明細書に組み入れられる定義よりも優先される。

【 0 0 9 5 】

本明細書において記載されるかまたは参照される技法および手順は、概してよく理解されており、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.)のシリーズ: PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL、およびANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Human a Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); およびCancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. De Vita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993); ならびにそれらの最新版に記載される広く利用される方法論などの、従来の方法論を用いて、当業者により一般的に使用される。

20

30

40

【 0 0 9 6 】

本明細書において用いられるセクションの見出しは、組織化の目的だけのものであり、記載されている主題を限定すると解釈されるべきではない。

【 0 0 9 7 】

50

I. 定義

別途定義されない限り、本開示に関連して用いられる科学用語および技術用語は、当業者により一般的に理解されている意味を有するものとする。さらに、別途文脈により必要とされるか、または明白に示されない限り、単数形の用語は複数を含むものとし、複数形の用語は単数を含むものとする。様々な供給源または参照の間での定義におけるいずれかの矛盾については、本明細書で提供される定義が支配することになる。

【0098】

本明細書に記載される本発明の態様は、態様「からなる」および/または態様「から本質的になる」を含むことが理解される。本明細書において用いられる場合、単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その」は、別途示されない限り、複数の言及を含む。本明細書における「または」という用語の使用は、代替物が相互排他的であることを暗示するようには意図されない。

10

【0099】

本出願において、明白に述べられるかまたは当業者により理解されない限り、「または」の使用は、「および/または」を意味する。複数の従属請求項の文脈において、「または」の使用は、1つよりも多い前記の独立請求項または従属請求項に再び言及する。

【0100】

本明細書において用いられる「約」という用語は、この技術分野における当業者には容易にわかる、それぞれの値についての通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」のついた値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体に向けられる態様を含む（および記載する）。例えば、「約X」に言及する記載は、「X」の記載を含む。

20

【0101】

「核酸分子」、「核酸」、および「ポリヌクレオチド」という用語は、互換的に用いられてもよく、ヌクレオチドのポリマーを指す。そのようなヌクレオチドのポリマーは、天然のおよび/または非天然のヌクレオチドを含有してもよく、DNA、RNA、およびPNAを含むが、それらに限定されない。「核酸配列」とは、核酸分子またはポリヌクレオチドに含まれるヌクレオチドの直鎖状配列を指す。

【0102】

本明細書において用いられる「単離されたポリヌクレオチド」という用語は、その起源の理由で（1）天然で見出されるポリヌクレオチドのすべてもしくは一部分と会合していない、（2）天然では連結されていないポリヌクレオチドに機能的に連結されている、または（3）より大きな配列の一部として天然に存在しない、ゲノム、cDNA、もしくは合成起源、またはそのいくつかの組み合わせのポリヌクレオチドを意味するものとする。

30

【0103】

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すように互換的に用いられ、最小の長さ限定されない。そのようなアミノ酸残基のポリマーは、天然のまたは非天然のアミノ酸残基を含有してもよく、アミノ酸残基のペプチド、オリゴペプチド、二量体、三量体、および多量体を含むが、それらに限定されない。完全長タンパク質およびその断片は両方とも、定義により包含される。この用語はまた、ポリペプチドの発現後改変、例えば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、リン酸化なども含む。さらに、本開示の目的で、「ポリペプチド」とは、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然の配列に対して、欠失、付加、および置換（概して、天然で保存的）などの改変を含むタンパク質を指す。これらの改変は、部位特異的変異誘発を通すように計画的であってもよく、またはタンパク質を産生する宿主の変異もしくはPCR増幅によるエラーを通すように偶発的であってもよい。

40

【0104】

本明細書において言及される「単離されたタンパク質」という用語は、対象タンパク質が、（1）天然では典型的にそれと共に見出される少なくともいくつかの他のタンパク質を含まない、（2）同じ供給源由来、例えば、同じ種由来の他のタンパク質を本質的に含まない、（3）異なる種由来の細胞によって発現される、（4）天然ではそれと会合してい

50

るポリヌクレオチド、脂質、糖質、または他の物質の少なくとも約50%から分離されている、(5)「単離されたタンパク質」が天然ではそれと会合しているタンパク質の一部と(共有結合性または非共有結合性の相互作用によって)会合していない、(6)天然ではそれと会合していないポリペプチドと(共有結合性または非共有結合性の相互作用によって)機能的に会合している、または(7)天然に存在しない、ことを意味する。そのような単離されたタンパク質は、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、もしくは他のRNAによってコードされることができ、合成起源であってもよく、またはその任意の組み合わせであってもよい。ある特定の態様において、単離されたタンパク質は、実質的に純粋であるか、または、その用途(治療、診断、予防、研究、もしくはその他)を干渉するであろう、その天然環境で見出されるタンパク質、もしくはポリペプチド、もしくは他の汚染物質を実質的に含まない。

10

【0105】

本明細書において用いられる場合、「実質的に純粋」とは、対象となる種が、存在する主な種である(すなわち、モルベースで、それが組成物における任意の他の個々の種よりも豊富である)ことを意味し、実質的に精製された画分は、対象となる種が、存在するすべての巨大分子種の(モルベースで)少なくとも約50パーセントを構成する組成物である。概して、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在するすべての巨大分子種の約80%よりも多く、例えば、いくつかの態様においては、約85%、90%、95%、および99%よりも多くを構成する。いくつかの態様において、対象となる種は、組成物が単一の巨大分子種から本質的になる、本質的な均質性(従来の検出方法によって組成物中に汚染物質種を検出することができない)まで精製される。

20

【0106】

本明細書において用いられる「機能的に連結される」という用語は、そのように記載される構成要素の位置が、それらが意図される様式で機能することを可能にする関係であることを指す。コード配列に「機能的に連結される」制御配列は、制御配列と適合性である条件下でコード配列の発現が達成されるようにライゲーションされる。

【0107】

抗原またはエピトープに「特異的に結合する」という用語は、当技術分野においてよく理解されている用語であり、そのような特異的結合を判定する方法もまた、当技術分野においてよく知られている。分子は、代替的な細胞または物質と、よりも、特定の細胞または物質と、より頻繁に、より迅速に、より長い持続期間で、かつ/またはより高い親和性で反応するかまたは会合する場合に、「特異的結合」または「優先的結合」を示すと言われる。シングルドメイン抗体(sdAb)またはVHH含有ポリペプチドは、他の物質に結合するよりも高い親和性、結合力で、より容易に、かつ/またはより長い持続期間で結合する場合に、標的に対して「特異的に結合する」か、または「優先的に結合する」。例えば、DLL3エピトープに特異的にまたは優先的に結合するsdAbまたはVHH含有ポリペプチドは、他のDLL3エピトープまたは非DLL3エピトープに結合するよりも高い親和性、結合力で、より容易に、かつ/またはより長い持続期間でこのエピトープに結合するsdAbまたはVHH含有ポリペプチドである。例えば、第1の標的に特異的にまたは優先的に結合するsdAbまたはVHH含有ポリペプチドは、第2の標的に特異的にまたは優先的に結合してもよく、または結合しなくてもよいこともまた、この定義を読むことによって理解される。そのため、「特異的結合」または「優先的結合」は、排他的結合を(含むことはできるが)必ずしも必要としない。必ずではないが、概して、結合への言及は、優先的結合を意味する。「特異性」とは、抗原に選択的に結合する、結合タンパク質の能力を指す。

30

40

【0108】

本明細書において用いられる場合、「エピトープ」という用語は、抗原結合分子(例えば、sdAbまたはVHH含有ポリペプチド)が結合する標的分子(例えば、タンパク質、核酸、糖質、または脂質などの抗原)上の部位を指す。エピトープは、多くの場合、アミノ酸、ポリペプチド、または糖側鎖などの分子の化学的に活性を有する表面配置を含み、特異的な三次元構造特性および特異的な電荷特性を有する。エピトープは、標的分子の隣接

50

残基および/または並んだ非隣接残基（例えば、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、脂質部分）の両方から形成され得る。隣接残基（例えば、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、脂質部分）から形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒への曝露時に保持されるのに対して、三次フォールディングによって形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒での処理時に失われる。エピトープは、少なくとも3、少なくとも5、または8～10残基（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド）を含み得るが、それらに限定されない。いくつかの態様において、エピトープは、長さが20残基（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド）未満、15残基未満、または12残基未満である。2つの抗体は、抗原に対して競合的結合を示す場合には、抗原内の同じエピトープに結合する可能性がある。いくつかの態様において、エピトープは、抗原結合分子上のCDR残基に対するある特定の最小距離によって特定することができる。いくつかの態様において、エピトープは、上記の距離によって特定することができ、さらに、抗原結合分子の残基と抗原残基との間の結合（例えば、水素結合）に関与するそれらの残基に限定され得る。エピトープは、同様に様々なスキャンによって特定することができ、例えば、アラニンスキャンまたはアルギニンスキャンは、抗原結合分子が相互作用し得る1つまたは複数の残基を示すことができる。はっきりと表されない限り、エピトープとしての残基のセットは、他の残基を特定の抗原結合分子に対するエピトープの一部であることから排除しない。むしろ、そのようなセットの存在は、エピトープの最小シリーズ（または種のセット）を示す。したがって、いくつかの態様において、エピトープとして特定された残基のセットは、抗原上のエピトープについての残基の排他的リストよりはむしろ、抗原に関連している最小エピトープを示す。

【0109】

「非直鎖状エピトープ」または「立体構造エピトープ」は、エピトープに特異的な抗原結合分子が結合する抗原タンパク質内の非隣接のポリペプチド、アミノ酸、および/または糖を含む。いくつかの態様において、残基のうちの少なくとも1つは、エピトープの他の言及される残基と非隣接であろう；しかし、残基のうちの1つまたは複数または、他の残基と隣接していることもできる。

【0110】

「直鎖状」エピトープは、エピトープに特異的な抗原結合分子が結合する抗原タンパク質内の隣接のポリペプチド、アミノ酸、および/または糖を含む。いくつかの態様において、直鎖状エピトープ内の残基のすべてが、抗原結合分子に直接結合する（または結合に関与する）必要があるというわけではないことが注目される。いくつかの態様において、直鎖状エピトープは、効果的に直鎖状エピトープの配列からなるペプチドでの免疫由来、または、その配列区分をちょうど有する、（抗原結合分子が少なくとも主として相互作用することができるように）タンパク質の残り部分から相対的に単離されているタンパク質の構造的区分由来であることができる。

【0111】

「抗体」および「抗原結合分子」という用語は、最も広い意味で互換的に用いられ、従来の抗体（典型的には、少なくとも1つの重鎖および少なくとも1つの軽鎖を含む）、シングルドメイン抗体（sdAb、典型的には重鎖に類似している、1つの鎖のみを含む）、VHH含有ポリペプチド（少なくとも1つの重鎖のみ抗体可変ドメイン、すなわちVHHを含むポリペプチド）、および、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、前述のいずれかの断片を含むがそれらに限定されない、抗体様抗原結合ドメインを含む様々なポリペプチドを包含する。いくつかの態様において、抗体は二量体化ドメインを含む。そのような二量体化ドメインには、重鎖定常ドメイン（CH1、ヒンジ、CH2、およびCH3を含む、CH1は、典型的には、軽鎖定常ドメインであるCLとペア形成し、他方、ヒンジは二量体化を媒介する）、およびFcドメイン（ヒンジ、CH2、およびCH3を含む、ヒンジは二量体化を媒介する）が含まれるが、それらに限定されない。

【0112】

抗体という用語はまた、キメラ抗体、ヒト化抗体、および、（ラマを含む）ラクダ科、サメ、マウス、ヒト、カニクイザルなどのような様々な種の抗体も含むが、それらに限定

10

20

30

40

50

されない。

【0113】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に關与する抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変領域（それぞれ V_H および V_L ）は概して、類似した構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）および3つのCDRを含む。（例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照されたい。）単一の V_H または V_L ドメインが、例えば、VHHなどのシングルドメイン抗体に抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体を、抗原に結合する抗体由来の V_H または V_L ドメインを用いて、それぞれ相補的な V_L または V_H ドメインのライブラリをスクリーニングして、単離してもよい。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)を参照されたい。

10

【0114】

「抗体断片」または「抗原結合断片」とは、抗原に結合する少なくとも可変領域を含有する従来のまたは無傷の抗体の一部を含む、従来のまたは無傷の抗体以外の分子を指す。抗体断片の例には、Fv、一本鎖Fv（sdFv）、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ；直鎖状抗体； V_H 領域のみを含むシングルドメイン抗体（VHH）が含まれるが、それらに限定されない。

【0115】

本明細書において用いられる場合、結合分子に関する「一価」とは、標的抗原に特異的である単一の抗原認識部位を有する結合分子を指す。一価結合分子の例には、例えば、一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、またはMHC分子が含まれる。一価抗体断片の例には、Fab断片、Fv断片、および一本鎖Fv断片（scFv）が含まれるが、それらに限定されない。

20

【0116】

「シングルドメイン抗体」、「sdAb」、「VHH」という用語は、単一の単量体ドメインである抗原結合/認識ドメインを有する抗体を指すように、本明細書において互換的に用いられる。そのような抗体には、ラクダ科抗体またはサメ抗体が含まれる。いくつかの態様において、VHHは、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4と命名される3つのCDRおよび4つのフレームワーク領域を含む。いくつかの態様において、VHHは、VHHが抗原結合および特異性を実質的に維持する限り、部分的なFR1および/もしくはFR4のみを含むか、またはそれらのフレームワーク領域の一方もしくは両方を欠如するように、N末端またはC末端で切断されていてもよい。

30

【0117】

「VHH含有ポリペプチド」という用語は、少なくとも1つのVHHドメインを含むポリペプチドを指す。いくつかの態様において、VHHポリペプチドは、2つ、3つ、または4つ、またはそれよりも多いVHHドメインを含み、各VHHドメインは、同じであってもよく、または異なってもよい。いくつかの態様において、VHH含有ポリペプチドは、Fcドメインを含む。いくつかのそのような態様において、VHHポリペプチドは、二量体を形成してもよい。VHH含有ポリペプチドの非限定的な構造には、VHH₁-Fc、VHH₁-VHH₂-Fc、およびVHH₁-VHH₂-VHH₃-Fcが含まれ、VHH₁、VHH₂、およびVHH₃は、同じであってもよく、または異なってもよい。そのような構造のいくつかの態様において、1つのVHHは、リンカーによって別のVHHに接続されてもよく、または1つのVHHは、リンカーによってFcに接続されてもよい。いくつかのそのような態様において、リンカーは、1~20アミノ酸、好ましくは、主にグリシン、および任意でセリンから構成される1~20アミノ酸を含む。いくつかの態様において、VHH含有ポリペプチドがFcを含む場合、それは二量体を形成する。したがって、構造VHH₁-VHH₂-Fcは、それが二量体を形成する場合には、四価とみなされる（すなわち、二量体は4つのVHHドメインを有する）。同様に、構造VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fcは、それが二量体を形成する場合には、六価とみなされる（すなわち、二量体は6つのVHHドメインを有する）。

40

50

【 0 1 1 8 】

本明細書において用いられる場合、DLL3結合ポリペプチドとは、DLL3に特異的に結合するポリペプチドまたはタンパク質である。典型的には、本明細書におけるDLL3結合ポリペプチドは、DLL3に結合する少なくとも1つのVHHドメインを含有する、VHH含有ポリペプチドである。DLL3結合ポリペプチドは、融合タンパク質を含むコンジュゲートを含む。DLL3結合ポリペプチドは、Fcドメインを含有する融合タンパク質を含む、融合タンパク質を含む。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、各々がDLL3に特異的に結合する2つ、3つ、または4つ、またはそれよりも多いVHHドメインを含有し、各VHHドメインは、同じであってもよく、または異なってもよい。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは多価である。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは多重特異性である。場合によっては、DLL3結合ポリペプチドは、DLL3以外の1つまたは複数のさらなるまたは追加の抗原に結合する、1つまたは複数の追加のドメインを含有してもよい。

10

【 0 1 1 9 】

「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質の抗体の集団の（sdAbまたはVHH含有ポリペプチドを含む）抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る可能な天然の変異以外は同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対する。さらに、典型的には様々な決定基（エピトープ）に対する様々な抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対する。したがって、モノクローナル抗体の試料は、抗原上の同じエピトープに結合し得る。修飾語の「モノクローナル」とは、実質的に均質の抗体の集団から得られているとしての抗体の特徴を示し、いずれかの特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, 1975, *Nature* 256:495によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作られてもよく、または、例えば米国特許第4,816,567号に記載されている組換えDNA法によって作られてもよい。モノクローナル抗体はまた、例えば、McCafferty et al., 1990, *Nature* 348:552-554に記載されている技法を用いて作製されるファージライブラリーから単離されてもよい。

20

【 0 1 2 0 】

「CDR」という用語は、当業者に少なくとも1つの特定の様式によって定義されるような相補性決定領域を表す。所与のCDRまたはFRの正確なアミノ酸配列の境界は、数多くの周知のスキームのいずれかを用いて容易に決定することができ、それらのスキームには、以下に記載されるものが含まれる：Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (「Kabat」ナンバリングスキーム)；Al-Lazikani et al., (1997) *JMB* 273,927-948 (「Chothia」ナンバリングスキーム)；MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," *J. Mol. Biol.* 262, 732-745. (「Contact」ナンバリングスキーム)；Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," *Dev Comp Immunol*, 2003 Jan;27(1):55-77 (「IMGT」ナンバリングスキーム)；Honegger A and Pluckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," *J Mol Biol*, 2001 Jun 8;309(3):657-70 (「Aho」ナンバリングスキーム)；およびMartin et al., "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm," *PNAS*, 1989, 86(23):9268-9272 (「AbM」ナンバリングスキーム)。

30

40

【 0 1 2 1 】

所与のCDRまたはFRの境界は、特定に用いられるスキームに応じて変動し得る。例えば、Kabatスキームは構造アラインメントに基づいており、他方、Chothiaスキームは構造情報に基づいている。KabatスキームおよびChothiaスキームの両方のナンバリングは、

50

最も一般的な抗体領域配列の長さに基づいており、挿入文字、例えば「30a」によって調整される挿入、および欠失が、いくつかの抗体に現れる。2つのスキームは、ある特定の挿入および欠失（「インデル（indel）」）を異なる位置に配置し、異なったナンバリングを結果としてもたらす。Contactスキームは、複雑な結晶構造の解析に基づいており、多くの点でChothiaナンバリングスキームと類似している。AbMスキームは、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって用いられるものに基づく、Kabat定義とChothia定義との間の妥協案である。

【 0 1 2 2 】

いくつかの態様において、CDRは、Chothiaナンバリングスキーム、Kabatナンバリングスキーム、KabatとChothiaの組み合わせ、AbM定義、および/またはcontact定義のいずれかに従って定義することができる。VHHは、CDR1、CDR2、およびCDR3と命名される3つのCDRを含む。以下の表1は、それぞれ、Kabat、Chothia、AbM、およびContactスキームによって特定されるCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3の例示的な位置境界を列記する。CDR-H1については、KabatナンバリングスキームおよびChothiaナンバリングスキームの両方を用いて、残基ナンバリングが列記される。FRはCDR間に位置し、例えば、FR-H1はCDR-H1の前に位置し、FR-H2はCDR-H1とCDR-H2との間に位置し、FR-H3はCDR-H2とCDR-H3との間に位置する、といった具合である。示されるKabatナンバリングスキームは、H35AおよびH35Bに挿入を配置するため、示されるKabatナンバリング規則を用いて番号付けされた場合のChothia CDR-H1ループの終わりは、ループの長さに応じてH32とH34との間で変動することが注目される。

【 0 1 2 3 】

（表1）様々なナンバリングスキームによるCDRの境界

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-H1 (Kabat ナンバリング ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia ナンバリング ²)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

1 - Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

2 - Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948

【 0 1 2 4 】

したがって、別途指定されない限り、所与の抗体またはその領域、例えばその可変領域の「CDR」または「相補性決定領域」または個々の指定されたCDR（例えば、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3）は、前述のスキームのいずれかによって定義されるような、ある（または具体的な）相補性決定領域を包含すると理解されるべきである。例えば、特定のCDR（例えば、CDR-H3）が、所与のVHHアミノ酸配列中に対応するCDRのアミノ酸配列を含有することが述べられている場合、そのようなCDRは、前述のスキームのいずれかによって定義されるような、対応するCDR（例えば、CDR-H3）の配列をVHH内に有することが理解される。いくつかの態様において、具体的なCDR配列が指定される。提供される抗体の例示的なCDR配列は、様々なナンバリングスキームを用いて記載される（例えば、表1を参照されたい）が、提供される抗体は、他の前述のナンバリングスキームまたは当業者に公知の他のナンバリングスキームのいずれかに従って記載されるようなCDRを含み得ることが理解される。

【 0 1 2 5 】

本明細書において用いられる場合、「コンジュゲート」、「コンジュゲーション」、またはその文法的変形物は、当技術分野において公知の任意の接合法または連結法による、別の化合物の形成を結果としてもたらす2つ以上の化合物の互いの接合または連結を指す

。これはまた、2つ以上の化合物の互いの接合または連結によって作製される化合物も指すことができる。例えば、1つまたは複数の化学的部分またはポリペプチドに直接または間接的に連結されたVHHドメインは、例示的なコンジュゲートである。そのようなコンジュゲートは、融合タンパク質、化学的コンジュゲートによって生成されたもの、および任意の他の方法によって生成されたものを含む。

【0126】

VHH-Fcなどの免疫グロブリンFc融合物（Fc融合物）は、免疫グロブリンのFc領域に機能的に連結された1つまたは複数のVHHドメインを含む分子である。免疫グロブリンFc領域は、1つまたは複数のVHHドメインに間接的にまたは直接連結されてもよい。様々なリンカーが、当技術分野において公知であり、任意で、Fcを融合パートナーに連結してFc融合物を作製するために用いることができる。いくつかのそのような態様において、リンカーは、1～20アミノ酸、好ましくは、主にグリシン、および任意でセリンからなる1～20アミノ酸を含む。同一の種のFc融合物は、Fc融合物ホモ二量体を形成するか、または同一でない種を用いてFc融合物ヘテロ二量体を形成するように、二量体化され得る。いくつかの態様において、Fcは、ヒトFcなどの哺乳動物Fcである。

【0127】

本明細書において用いられる「重鎖定常領域」という用語は、少なくとも3つの重鎖定常ドメインの、 C_H1 、ヒンジ、 C_H2 、および C_H3 を含む領域を指す。当然、ドメイン内の機能を変更しない欠失および変更が、別途命名されない限り、「重鎖定常領域」という用語の範囲内に包含される。非限定的な例示的な重鎖定常領域には、 γ 、 δ 、および ϵ が含まれる。非限定的な例示的な重鎖定常領域にはまた、 α および μ も含まれる。各重鎖定常領域は、抗体アイソタイプに対応する。例えば、 γ 定常領域を含む抗体はIgG抗体であり、 δ 定常領域を含む抗体はIgD抗体であり、 ϵ 定常領域を含む抗体はIgA抗体である。さらに、 μ 定常領域を含む抗体はIgM抗体であり、 α 定常領域を含む抗体はIgE抗体である。ある特定のアイソタイプは、さらにサブクラスに細分することができる。例えば、IgG抗体には、IgG1（ γ_1 定常領域を含む）、IgG2（ γ_2 定常領域を含む）、IgG3（ γ_3 定常領域を含む）、およびIgG4（ γ_4 定常領域を含む）抗体が含まれるがそれらに限定されず；IgA抗体には、IgA1（ α_1 定常領域を含む）およびIgA2（ α_2 定常領域を含む）抗体が含まれるがそれらに限定されず；IgM抗体には、IgM1およびIgM2が含まれるがそれらに限定されない。

【0128】

本明細書において用いられる「Fc領域」とは、 C_H2 および C_H3 を含む重鎖定常領域の一部分を指す。いくつかの態様において、Fc領域は、ヒンジ、 C_H2 、および C_H3 を含む。様々な態様において、Fc領域がヒンジを含む場合、ヒンジは、2つのFc含有ポリペプチドの間の二量体化を媒介する。Fc領域は、本明細書において議論される任意の抗体重鎖定常領域アイソタイプのものであってもよい。いくつかの態様において、Fc領域は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である。

【0129】

「機能的なFc領域」は、天然配列Fc領域の「エフェクター機能」を保有する。例示的な「エフェクター機能」には、Fc受容体結合；C1q結合および補体依存性細胞傷害活性（CDC）；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害活性（ADCC）；食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御；およびB細胞活性化などが含まれる。そのようなエフェクター機能は、概して、Fc領域が結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と組み合わせられることを必要とし、様々なアッセイを用いて評価することができる。

【0130】

「天然配列Fc領域」は、天然で見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然配列ヒトFc領域には、天然配列ヒトIgG1 Fc領域（非AおよびAアロタイプ）；天然配列ヒトIgG2 Fc領域；天然配列ヒトIgG3 Fc領域；および天然配列ヒトIgG4 Fc領域、ならびに天然に存在するそれらのバリエーションが含まれる。

【0131】

10

20

30

40

50

「バリエーションFc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸改変によって天然配列Fc領域のものとは異なるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、「バリエーションFc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸改変によって天然配列Fc領域のものとは異なるアミノ酸配列を含み、それにもかかわらず天然配列Fc領域の少なくとも1つのエフェクター機能を保持する。いくつかの態様において、バリエーションFc領域は、天然配列Fc領域とまたは親ポリペプチドのFc領域と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、天然配列Fc領域中または親ポリペプチドのFc領域中に約1～約10のアミノ酸置換、および好ましくは、約1～約5のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、本明細書におけるバリエーションFc領域は、天然配列Fc領域とおよび/または親ポリペプチドのFc領域に対して少なくとも約80%の配列同一性、それらに対して少なくとも約90%の配列同一性、それらに対して少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を保有するであろう。

10

【0132】

概して、Fc領域などの免疫グロブリン重鎖またはその一部分における残基のナンバリングは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) におけるようなEUインデックスのものである。「KabatにおけるようなEUインデックス」とは、ヒトIgG1 EU抗体の残基ナンバリングを指す。

【0133】

「Fc受容体」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を説明する。いくつかの態様において、FcRは天然ヒトFcRである。いくつかの態様において、FcRは、IgG抗体に結合するもの（ガンマ受容体）であり、FcRI、FcRII、およびFcRIIIサブクラスの受容体を、それらの受容体の対立遺伝子バリエーションおよびオルタナティブスプライシングされた形態を含めて、含む。FcRII受容体には、FcRIIA（「活性化受容体」）およびFcRIIB（「抑制性受容体」）が含まれ、それらは、主にそれらの細胞質ドメインにおいて異なる、類似したアミノ酸配列を有する。活性化受容体FcRIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ITAM）を含有する。抑制性受容体FcRIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン抑制モチーフ（ITIM）を含有する。（例えば、Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)を参照されたい）。FcRは、例えば、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) において概説されている。他のFcRが、将来特定されるものを含めて、本明細書における「FcR」という用語によって包含される。例えば、「Fc受容体」または「FcR」という用語はまた、母体IgGの胎児への移行（Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)およびKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)）ならびに免疫グロブリンの恒常性の制御を担う、新生児受容体FcRnも含む。FcRnに対する結合を測定する方法は、公知である（例えば、Ghetie and Ward, Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.)を参照されたい）。

20

30

40

【0134】

本明細書において用いられる「アクセプターヒトフレームワーク」とは、本明細書において議論されるような、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する重鎖可変ドメイン（V_H）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来するアクセプターヒトフレームワークは、それらと同じアミノ酸配列を含むことができ、またはアミノ酸配列変化を含有することができる。いくつかの態様において、アミノ酸変化の数は、V_HHなどの単一の抗原結合ドメイン中のヒトフレームワークのすべてにわたって、10未満、または9未満、または8未満、または7未満、または6未満、または5未満、または4未満、または3未満である。

50

【0135】

本明細書において用いられる場合、「キメラ抗原受容体」または「CAR」とは、それが操作されている細胞（例えば、ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、またはそれらの組み合わせなどのT細胞）上に、抗原結合ドメインを介して抗原特異性を導入し、したがって抗原結合ドメインの抗原結合特性とT細胞のT細胞活性（例えば、溶解能力および自己複製）とを組み合わせる、操作された受容体を指す。CARは、典型的には、細胞外抗原結合ドメイン（外部ドメイン）、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。細胞内シグナル伝達ドメインは、概して、例えばCD3に由来する、少なくとも1つのITAMシグナル伝達ドメイン、および任意で、例えばCD28または4-1BBに由来する、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインを含有する。本明細書で提供されるCARにおいて、VHHドメインは、抗原結合ドメインを形成し、細胞において発現させた時には細胞外側に位置する。

10

【0136】

「親和性」とは、分子（例えば、抗体またはVHH含有ポリペプチド）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合性相互作用の総和の強さを指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性または見かけの親和性は、概して、それぞれ解離定数（ K_D ）または K_D -見かけによって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当技術分野において公知の一般的な方法（例えば、ELISA K_D 、KinExA、フローサイトメトリー、および/または表面プラズモン共鳴装置など）によって測定することができる。そのような方法には、BIAcore（登録商標）、Octet（登録商標）、またはフローサイトメトリーを含む方法が含まれるが、それらに限定されない。

20

【0137】

本明細書において用いられる「 K_D 」という用語は、抗原結合分子/抗原の相互作用の平衡解離定数を指す。「 K_D 」という用語が本明細書において用いられる場合、これには、 K_D および K_D -見かけが含まれる。

【0138】

いくつかの態様において、抗原結合分子の K_D は、抗原発現細胞株を用いたフローサイトメトリー、および各抗体濃度で測定された平均蛍光の非線形一部位結合方程式へのフィッティング（Prism Software graphpad）によって測定される。いくつかのそのような態様において、 K_D は K_D -見かけである。

30

【0139】

「生物学的活性」という用語は、（インビボで見出されるように天然に存在しようと、または組換え手段によって提供されるかもしくは可能にされようと）分子の任意の1つまたは複数の生物学的特性を指す。生物学的特性には、リガンドの結合、細胞増殖（例えば、T細胞増殖）の誘導または増加、およびサイトカインの発現の誘導または増加が含まれるが、それらに限定されない。

【0140】

「親和性成熟した」VHH含有ポリペプチドとは、そのような変更を保有しない親VHH含有ポリペプチドと比較して、1つまたは複数のCDR中に1つまたは複数の変更を有するVHH含有ポリペプチドを指し、そのような変更は、VHH含有ポリペプチドの抗原に対する親和性の改善を結果としてもたらす。

40

【0141】

本明細書において用いられる「ヒト化VHH」とは、1つまたは複数のフレームワーク領域が、ヒトフレームワーク領域で実質的に置き換えられているVHHを指す。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンのある特定のフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化VHHは、元のVHHまたはヒトフレームワーク配列のいずれにも見出されないが、VHHまたはVHH含有ポリペプチドの性能をさらに改良し、かつ最適化するために含まれる、残基を含むことができる。いくつかの態様において、ヒト化VHH含有ポリペプチドは、ヒトFc領域を含む。認識されるように、ヒト化配列は、その一次配列によって特定することができ、抗体が創出されたプロセスを必ず

50

しも表さない。

【 0 1 4 2 】

本明細書において用いられる「実質的に同様」または「実質的に同じ」という用語は、当業者が、2つ以上の値間の差がほとんどないとみなすか、または該値によって測定される生物学的特徴の文脈内でいかなる生物学的かつ/もしくは統計学的な有意性もないとみなすような、2つ以上の数値間の十分に高度の類似性を表す。いくつかの態様において、2つ以上の実質的に同様の値は、わずかに約5%、10%、15%、20%、25%、または50%のいずれかの分だけ異なっている。

【 0 1 4 3 】

ポリペプチド「バリエーション」は、配列を整列させて、最大の配列同一性パーセントを達成するように、必要な場合にはギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の一部とみなさずに、天然配列ポリペプチドに対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する、生物学的活性ポリペプチドを意味する。そのようなバリエーションには、例えば、ポリペプチドのN末端またはC末端で、1つまたは複数のアミノ酸残基が付加されているかまたは欠失している、ポリペプチドが含まれる。いくつかの態様において、バリエーションは、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの態様において、バリエーションは、少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの態様において、バリエーションは、天然配列ポリペプチドに対して少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

10

【 0 1 4 4 】

本明細書において用いられる場合、ペプチド、ポリペプチド、または抗体配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」および「相同性」は、配列を整列させて、最大の配列同一性パーセントを達成するように、必要な場合にはギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の一部とみなさずに、特定のペプチドまたはポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMEGALIGN(商標)(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを用いて、当技術分野における技能内である様々な方法で達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含み、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。

20

30

【 0 1 4 5 】

アミノ酸置換は、ポリペプチド中の1つのアミノ酸の別のアミノ酸での置き換えを含み得るが、それに限定されない。例示的な置換を、表2に示す。アミノ酸置換は、関心対象の抗体中に導入されてもよく、産物は、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の減少、またはADCCもしくはCDCの改善についてスクリーニングされてもよい。

【 0 1 4 6 】

(表2)

40

50

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

10

【 0 1 4 7 】

20

アミノ酸は、一般的な側鎖特性に従ってグループ分けされてもよい。

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖の配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【 0 1 4 8 】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを必然的に伴う。

30

【 0 1 4 9 】

「ベクター」という用語は、宿主細胞において増やすことができる、クローニングされた1つまたは複数のポリヌクレオチドを含有するように操作され得るポリヌクレオチドを説明するために用いられる。ベクターは、以下の要素のうちの1つまたは複数を含むことができる：複製起点、関心対象のポリペプチドの発現を制御する1つもしくは複数の制御配列（例えば、プロモーターおよび/もしくはエンハンサーなど）、ならびに/または1つもしくは複数の選択可能なマーカー遺伝子（例えば、抗生物質耐性遺伝子、および比色アッセイにおいて用いることができる遺伝子、例えば、 β -ガラクトシダーゼなど）。「発現ベクター」という用語は、宿主細胞において関心対象のポリペプチドを発現させるために用いられるベクターを指す。

40

【 0 1 5 0 】

「宿主細胞」とは、ベクターまたは単離されたポリヌクレオチドのレシピエントであり得るか、またはレシピエントである細胞を指す。宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であってもよい。例示的な真核細胞には、霊長類または非霊長類動物細胞などの哺乳動物細胞；酵母などの真菌細胞；植物細胞；および昆虫細胞が含まれる。非限定的な例示的な哺乳動物細胞には、NSO細胞、PER.C6（登録商標）細胞（Crucell）、ならびに293およびCHO細胞、ならびに、293-6E、CHO-DG44、CHO-K1、CHO-S、およびCHO-DS細胞などのそれらの誘導体が含まれるが、それらに限定されない。宿主細胞には、単一宿主細胞の子孫が含まれ、子孫は、天然の、偶発的な、または計画的な変異のために、元の親細胞と必ずしも（形態がまたはゲノムDNA補完が）完全に同一でなくてもよい。宿主細胞には

50

、本明細書で提供されるポリヌクレオチドをインピボでトランスフェクトした細胞が含まれる。

【0151】

本明細書において用いられる「単離された」という用語は、典型的にはそれと共に天然で見出されるかまたは産生される、構成要素の少なくともいくつかから分離されている、分子を指す。例えば、ポリペプチドは、その中で産生された細胞の構成要素の少なくともいくつかから分離されている時に、「単離された」と言われる。ポリペプチドが、発現後に細胞により分泌される場合には、ポリペプチドを含有する上清を、それを産生した細胞から物理的に分離することが、ポリペプチドを「単離すること」とみなされる。同様に、ポリヌクレオチドは、それが、典型的にはその中に天然で見出される、より大きなポリヌクレオチド（例えば、DNAポリヌクレオチドの場合には、ゲノムDNAまたはミトコンドリアDNAなど）の一部ではないか、または、例えば、RNAポリヌクレオチドの場合には、その中で産生された細胞の構成要素の少なくともいくつかから分離されている時に、「単離された」と言われる。したがって、宿主細胞の内部でベクターに含有されているDNAポリヌクレオチドは、「単離された」と言われ得る。

10

【0152】

「個体」および「対象」という用語は、動物；例えば哺乳動物を指すように、本明細書において互換的に用いられる。患者という用語は、ヒトおよび獣医学的対象を含む。いくつかの態様において、ヒト、げっ歯類、サル、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、哺乳類の実験動物、哺乳類の家畜、哺乳類のスポーツ動物、および哺乳類のペットを含むがそれらに限定されない、哺乳動物を処置する方法が提供される。対象は、雄または雌であることができ、乳幼児期、若年期、青年期、成体期、および老齢期の対象を含む、任意の適している年齢であることができる。いくつかの例において、「個体」または「対象」とは、疾患または障害のための処置の必要がある個体または対象を指す。いくつかの態様において、処置を受ける対象は、患者であることができ、これは、対象が、処置に関連する障害を有するか、または障害を患うのに十分なりスクがあるとして特定されているという事実を示す。特定の態様において、対象は、ヒト患者などのヒトである。

20

【0153】

本明細書において用いられる「疾患」または「障害」は、処置が必要とされ、かつ/または望まれる状態を指す。

30

【0154】

「腫瘍細胞」、「がん細胞」、「がん」、「腫瘍」、および/または「新生物」という用語は、別途命名されない限り、本明細書において互換的に用いられ、身体の臓器およびシステムの正常な機能化を干渉する、制御されない成長および/または異常な細胞生存の増加および/またはアポトーシスの阻害を示す、1つの細胞（または複数の細胞）を指す。良性および悪性のがん、ポリープ、過形成、ならびに休眠腫瘍または微小転移が、この定義に含まれる。

【0155】

「がん」および「腫瘍」という用語は、固形がんおよび血液学的/リンパ性がんを包含し、悪性、前悪性、および良性の成長、例えば形成異常もまた包含する。また、免疫系によって妨害されない異常な増殖（例えば、免疫回避および免疫逃避機構）を有する細胞（例えば、ウイルス感染細胞）も、この定義に含まれる。例示的ながんには、以下が含まれるが、それらに限定されない：基底細胞癌、胆道がん；膀胱がん；骨がん；脳および中枢神経系のがん；乳がん；腹膜のがん；子宮頸がん；絨毛癌；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；目のがん；頭頸部のがん；胃（gastric）がん（胃腸がんを含む）；神経膠芽腫；肝癌；肝細胞癌；上皮内新生物；腎臓がんまたは腎がん；喉頭がん；白血病；肝臓がん；肺がん（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌）；黒色腫；骨髄腫；神経芽腫；口腔がん（口唇、舌、口、および咽頭）；卵巣がん；脾臓がん；前立腺がん；網膜芽腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺癌；肉腫；皮膚がん；扁平上皮細胞がん；胃（stomach）がん；

40

50

精巣がん；甲状腺がん；子宮がんまたは子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰部がん；ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、ならびにB細胞リンパ腫（低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）を含むリンパ腫；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度/濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切れ込み核細胞（small non-cleaved cell）NHL；巨大腫瘤病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；およびWaldenstromマクログロブリン血症；慢性リンパ球性白血病（CLL）；急性リンパ球性白血病（ALL）；毛様細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；ならびに他の癌腫および肉腫；および移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、ならびに、母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、およびMeigs症候群に関連する異常な血管増殖。

10

【0156】

本明細書において用いられる「非腫瘍細胞」という用語は、正常な細胞または組織を指す。例示的な非腫瘍細胞には、以下が含まれるが、それらに限定されない：T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、上皮細胞、線維芽細胞、肝細胞、腎臓間質細胞、線維芽細胞様滑膜細胞、骨芽細胞、および乳房、骨格筋、脾臓、胃、卵巣、小腸、胎盤、子宮、精巣、腎臓、肺、心臓、脳、肝臓、前立腺、結腸、リンパ器官、骨に位置する細胞、および骨由来間葉系幹細胞。本明細書において用いられる「末梢に位置する細胞または組織」という用語は、腫瘍細胞の近くおよび/または腫瘍微小環境内に位置しない非腫瘍細胞を指す。

【0157】

20

本明細書において用いられる「腫瘍微小環境内の細胞または組織」という用語は、腫瘍細胞を取り囲み、かつ/または腫瘍細胞に給餌する、細胞、分子、細胞外マトリックス、および/または血管を指す。腫瘍微小環境内の例示的な細胞または組織には、以下が含まれるが、それらに限定されない：腫瘍血管系；腫瘍浸潤リンパ球；線維芽細胞；血管内皮前駆細胞（EPC）；がん関連線維芽細胞；周皮細胞；他の間質細胞；細胞外マトリックス（ECM）の構成要素；樹状細胞；抗原提示細胞；T細胞；制御性T細胞（Treg細胞）；マクロファージ；好中球；骨髄由来サプレッサー細胞（MDSC）および腫瘍の近位に位置する他の免疫細胞。腫瘍細胞、および/または腫瘍微小環境内に位置する細胞/組織を特定するための方法は、本明細書において以下に記載されるように、当技術分野において周知である。

30

【0158】

いくつかの態様において、「増加」または「減少」とは、それぞれ、統計学的に有意な増加または減少を指す。当業者に明らかであるように、「調節すること」とはまた、同じであるが試験物質の存在がない条件と比較して、標的または抗原の、そのリガンド、結合パートナー、ホモ多量体型もしくはヘテロ多量体型への会合のためのパートナー、または基質のうちの1つまたは複数に対する親和性、結合力、特異性、および/または選択性における変化（増加または減少のいずれかであることができる）をもたらすこと；標的または抗原が存在する培地または周囲における1つまたは複数の条件（例えば、pH、イオン強度、補因子の存在など）に対する標的または抗原の感受性における変化（増加または減少のいずれかであることができる）をもたらすこと；ならびに/または、細胞増殖またはサイトカイン産生も含むことができる。これは、関与する標的に応じて、任意の適している様式で、および/または本質的に公知であるかもしくは本明細書に記載される任意の適しているアッセイを用いて、判定することができる。

40

【0159】

本明細書において用いられる場合、「免疫応答」とは、疾患（例えば、がんまたはがん転移）を抑制するか、または発症を防止するか、またはその症状を回復させるのに十分である細胞性免疫応答および/または液性免疫応答を包含するように意図される。「免疫応答」は、自然免疫系および適応免疫系の両方の局面を包含し得る。

【0160】

本明細書において用いられる場合、疾患、障害、または状態の「処置すること」、「処

50

置」、「治療」という用語は、有益なまたは望ましい臨床結果を得るためのアプローチである。本明細書において用いられる「処置」は、ヒトを含む哺乳動物における疾患に対する治療薬の任意の投与または適用に及ぶ。本開示の目的で、有益なまたは望ましい臨床結果には、以下のうちの任意の1つまたは複数の含まれるが、それらに限定されない：1つまたは複数の症状の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の広がり（例えば、転移、例えば、肺へのまたはリンパ節への転移）の防止または遅延、疾患の再発の防止または遅延、疾患進行の遅延または減速、疾患状態の回復、疾患または疾患の進行の抑制、疾患またはその進行の抑制または減速、その発生の停止、および寛解（部分的または完全のいずれか）。「処置」によって、増殖性疾患の病理学的結果の低減も包含される。本明細書で提供される方法は、処置のこれらの局面のうちの任意の1つまたは複数の企図する。上記と合致して、処置という用語は、障害のすべての局面の100パーセントの除去を必要としない。

10

【0161】

がんの文脈で本明細書において用いられる場合、がんの「処置」、または「抑制する」、「抑制すること」、もしくは「抑制」という用語は、以下のうちの少なくとも1つを指す：Response Evaluation Criteria for Solid Tumors (RECIST) などであるがそれに限定されない標準的な基準によって測定されるような、腫瘍成長の速度の統計学的に有意な減少、腫瘍成長の休止、または腫瘍のサイズ、質量、代謝活性、もしくは体積の低減、または、無増悪生存期間 (PFS) もしくは全生存期間 (OS) の統計学的に有意な増加。

【0162】

「回復させること」とは、治療剤を投与しないのと比較した、1つまたは複数の症状の低下または改善を意味する。「回復させること」はまた、症状の持続期間の短縮または低減も含む。

20

【0163】

疾患または障害の「防止すること」、「予防」、または「防止」とは、疾患もしくは障害または疾患もしくは障害の症状のいくつかもしくはすべての出現または発症を防止するため、または疾患もしくは障害の発症の可能性を低下させるための、単独または別の化合物との組み合わせのいずれかでの、薬学的組成物の投与を指す。

【0164】

「抑制」または「抑制する」という用語は、任意の表現型特性の減少もしくは休止、またはその特性の発生率、程度、もしくは可能性の減少もしくは休止を指す。「低減させる」または「抑制する」ことは、参照と比較して、活性、機能、および/または量を減少させる、低減させる、または停止することである。いくつかの態様において、「低減させる」または「抑制する」は、10%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。いくつかの態様において、「低減させる」または「抑制する」は、50%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。いくつかの態様において、「低減させる」または「抑制する」は、75%、85%、90%、95%、またはそれ以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。いくつかの態様において、上述の量は、ある期間にわたって、同じ期間にわたる対照と比べて、抑制されているかまたは減少している。

30

【0165】

本明細書において用いられる場合、「疾患の発生を遅延させること」とは、疾患（例えば、がん）の発生を先送りすること、妨げること、減速させること、遅らせること、安定させること、抑えること、および/または延期させることを意味する。この遅延は、疾患歴および/または処置されている個体に応じて、様々な長さの時間であることができる。当業者に明白であるように、十分なまたは有意な遅延は、事実上、個体が疾患を発症しないという点で、防止を包含し得る。例えば、後期段階のがん、例えば転移の発生は、遅延する可能性がある。

40

【0166】

本明細書において用いられる「防止すること」は、疾患に対する素因を有するかもしれないが、未だ疾患と診断されていない対象における疾患の出現または再発に関して、予防を提供することを含む。別途指定されない限り、「低減させる」、「抑制する」、または

50

「防止する」という用語は、すべての時間にわたる完全な防止を表すかまたは必要とすることはなく、測定されている期間にわたるだけである。

【0167】

「抗がん剤」という用語は、1つまたは複数のがんの処置において用いられる剤を指すように、最も広い意味で本明細書において用いられる。そのような剤の例示的な種類には、化学療法剤、抗がん生物製剤（例えば、サイトカイン、受容体細胞外ドメイン-Fc融合物、および抗体）、放射線療法、CAR-T療法、治療用オリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびsiRNA）、ならびに腫瘍溶解性ウイルスが含まれるが、それらに限定されない。

【0168】

「生物学的試料」という用語は、生き物または以前は生き物だったもの由来の、多数の物質を意味する。そのような物質には、血液（例えば、全血）、血漿、血清、尿、羊水、滑液、内皮細胞、白血球、単球、他の細胞、臓器、組織、骨髄、リンパ節、および脾臓が含まれるが、それらに限定されない。

【0169】

「対照」または「参照」という用語は、分析物を含有しないことが既知の組成物（「陰性対照」）または分析物を含有することが既知の組成物（「陽性対照」）を指す。陽性対照は、既知濃度の分析物を含むことができる。

【0170】

「有効量」または「治療的有效量」という用語は、単独で（すなわち、単剤療法として）または追加の治療剤との組み合わせのいずれかで患者中に投与された時に、例えば、疾患の症状および/または原因を回復させることまたは排除することにより、疾患進行における統計学的に有意の減少を生じる、活性成分（例えば、sdAbまたはVHH含有ポリペプチド）を含有する組成物の量および/または濃度を指す。有効量は、疾患もしくは障害に関連する少なくとも1つの症状もしくは生物学的応答もしくは効果を和らげる、低下させる、もしくは緩和する、疾患もしくは障害の進行を阻止する、または患者の身体機能を改善する量であり得る。活性剤を含有する組成物の治療的有效量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに個体において所望の応答を惹起する活性剤の能力などの要因に従って変動し得る。治療的有效量はまた、活性剤の任意の毒性効果または有害効果よりも、治療的に有益な効果が勝るものである。治療的有效量は、1つまたは複数の投与において送達され得る。治療的有效量とは、必要な投薬量でかつ期間にわたって、所望の治療結果および/または予防結果を達成するのに有効な量を指す。

【0171】

本明細書において用いられる場合、組成物とは、細胞を含む、2つ以上の生成物、物質、または化合物の任意の混合物を指す。これは、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。

【0172】

「薬学的製剤」および「薬学的組成物」という用語は、活性成分の生物学的活性が有効であることを可能にするような形態にあり、かつ製剤が投与される対象に対して許容できないように毒性であるいかなる追加の構成要素も含有しない、調製物を指す。したがって、これは、哺乳動物対象、多くの場合ヒトにおける薬学的用途に適している組成物である。薬学的組成物は、典型的には、有効量の活性剤（例えば、sdAbまたはVHH含有ポリペプチド）、および担体、賦形剤、または希釈剤を含む。担体、賦形剤、または希釈剤は、典型的にはそれぞれ、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤である。そのような製剤は、無菌であり得る。

【0173】

「薬学的に許容される担体」とは、対象への投与用の「薬学的組成物」と一緒に構成する治療剤との使用のための、当技術分野における従来の、非毒性の固体、半固体、もしくは液体の充填剤、希釈剤、カプセル化材料、製剤化補助剤、または担体を指す。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量および濃度でレシピエントに対して非毒性であり、

10

20

30

40

50

製剤の他の成分と適合性である。薬学的に許容される担体は、使用される製剤に適切である。

【0174】

1つまたは複数のさらなる治療剤「と組み合わせて」の投与には、同時（同時発生的）投与および任意の順序での連続投与が含まれる。

【0175】

「同時に」という用語は、投与の少なくとも一部が、時間が重複しているか、または1つの治療剤の投与が、他の治療剤の投与に対して短い期間内であるか、または両方の剤の治療効果が、少なくともある期間重複する、2つ以上の治療剤の投与を指すように、本明細書において用いられる。

10

【0176】

「連続的に」という用語は、時間が重複しないか、または剤の治療効果が重複しない、2つ以上の治療剤の投与を指すように、本明細書において用いられる。

【0177】

本明細書において用いられる場合、「と併せて」とは、1つの処置様式の、別の処置様式に加えた投与を指す。そのように、「と併せて」とは、個体に対する1つの処置様式の、もう1つの処置様式の投与の前、その最中、またはその後の投与を指す。

【0178】

「添付文書」という用語は、治療用製品の商用パッケージに通例含まれ、そのような治療用製品の使用に関わる適応症、用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌、および/または警告についての情報を含有する、説明書を指すように用いられる。

20

【0179】

「製造物品」とは、少なくとも1つの試薬、例えば、疾患もしくは障害（例えば、がん）の処置用の薬、または本明細書に記載されるバイオマーカーを特異的に検出するためのプローブを含む、任意の製造品（例えば、パッケージもしくは容器）またはキットである。いくつかの態様において、製造品またはキットは、本明細書に記載される方法を行うためのユニットとして、推進されるか、流通されるか、または販売される。

【0180】

「標識」および「検出可能な標識」という用語は、例えば、特異的結合ペアのメンバー間の反応（例えば、結合）を検出可能にするために、抗体または抗原に付加される部分を意味する。特異的結合ペアの標識されたメンバーは、「検出可能なように標識された」と言われる。したがって、「標識された結合タンパク質」という用語は、結合タンパク質の特定を提供する、組み込まれた標識を有するタンパク質を指す。いくつかの態様において、標識は、視覚または機器を用いる手段、例えば、放射標識アミノ酸の組込み、またはマークされたアビジン（例えば、光学的方法または比色法によって検出され得る蛍光マーカーまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出され得るビオチニル部分のポリペプチドへの付加によって検出可能である、シグナルを生成することができる検出可能なマーカーである。ポリペプチドのための標識の例には、以下が含まれるが、それらに限定されない：放射性同位体または放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 、または ^{153}Sm ）；色素原、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド燐光体（lanthanide phosphor））、酵素標識（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）；化学発光マーカー；ビオチニル基；二次レポーターによって認識されるあらかじめ決定されたポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）；および磁性物質、例えばガドリニウムキレート。イムノアッセイに一般的に使用される標識の代表的な例には、光を生成する部分、例えば、アクリジニウム化合物、および蛍光を生成する部分、例えば、フルオレセインが含まれる。この点について、部分自体は、検出可能なように標識されなくてもよいが、さらに別の部分との反応時に検出可能になり得る。

30

40

【0181】

50

II. DLL3に結合するVHHドメイン

DLL3と特異的に結合する少なくとも1つのVHHドメインを含有するVHH含有ポリペプチドであるDLL3結合ポリペプチドが、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、VHHドメインは、ヒトDLL3と結合する。提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、VHHドメインは、SEQ ID NO:86に示される配列を有するDLL3またはシグナル配列を欠くその成熟型と結合する。提供された態様のうちのいずれかのいくつかにおいて、VHHドメインは、SEQ ID NO:87に示される配列を有するDLL3またはシグナル配列を欠くその成熟型と結合する。

【0182】

いくつかの態様において、VHH含有ポリペプチドは、本明細書で提供されるVHHドメインの複数のコピーを組み込む。そのような態様において、VHH含有ポリペプチドは、同じVHHドメインの複数のコピーを組み込んでよい。いくつかの態様において、VHH含有ポリペプチドは、異なるが、DLL3上の同じエピトープを認識する、VHHドメインの複数のコピーを組み込んでよい。VHH含有ポリペプチドは、下記のセクションIIIに記載されるいずれかを含む、多様な形式で形式化され得る。

【0183】

VHHドメインは、特異的抗原に選択的に結合することができる単一の単量体可変抗体ドメインである、抗体断片である。VHHドメイン（シングルドメイン抗体とも呼ばれる）は、わずか12～15 kDaの分子量を有し、2つのタンパク質重鎖および2つの軽鎖から構成される一般的な抗体（150～160 kDa）よりもずっと小さく、Fab断片（約50 kDa、1つの軽鎖および半分の重鎖）ならびに一本鎖可変断片（約25 kDa、2つの可変ドメイン、軽鎖由来の1つおよび重鎖由来の1つ）よりもさらに小さい。

【0184】

シングルドメイン抗体は、その相補性決定領域が、シングルドメインポリペプチドの一部である抗体である。例には、重鎖抗体、天然で軽鎖が欠けている抗体、従来の4鎖抗体に由来するシングルドメイン抗体、操作された抗体、および抗体に由来するもの以外のシングルドメインスキフォールドが含まれるが、それらに限定されない。シングルドメイン抗体は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、アルパカ、ビクーニャ、グアナコ、サメ、ヤギ、ウサギ、および/またはウシを含むがそれらに限定されない、任意の種に由来し得る。いくつかの態様において、本明細書で用いられるシングルドメイン抗体は、軽鎖が欠けている重鎖抗体として公知の、天然に存在するシングルドメイン抗体である。明瞭さの理由で、天然で軽鎖が欠けている重鎖抗体に由来するこの可変ドメインは、4鎖免疫グロブリンの従来のVHから区別するために、本明細書においてVHHとして示される。そのようなVHH分子は、ラクダ科の種において、例えば、ラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ、ビクーニャ、およびグアナコにおいて生じた抗体に由来し得る。ラクダ科のほかにも他の種が、天然で軽鎖が欠けている重鎖抗体を産生する可能性があり；そのようなVHHは、本開示の範囲内である。

【0185】

DLL3に対して所望の特異性を保有する、VHH結合ポリペプチドを含むVHHドメインのスクリーニングのための方法には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、酵素アッセイ、フローサイトメトリー、および当技術分野内で公知の他の免疫学的に媒介される技法が含まれるが、それらに限定されない。

【0186】

本明細書で提供される、提供されるVHHドメインの中には、DLL3 VHH（ラマ由来）およびヒト化配列、例えば下記のいずれかがあ

【0187】

いくつかの態様において、DLL3に結合するVHHドメインは、ヒト化されていてもよい。抗体治療薬に対する免疫応答、および治療薬の有効性の減少を結果としてもたらし得る非ヒト抗体に対するヒト免疫応答を、ヒト化抗体が低減させるかまたは排除するため、ヒト化抗体（例えば、VHH含有ポリペプチド）は、治療用分子として有用である。概して、

ヒト化抗体は、CDR（またはその一部分）が非ヒト抗体に由来し、FR（またはその一部分）がヒト抗体配列に由来する、1つまたは複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は任意でまた、ヒト定常領域の少なくとも一部分も含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体におけるいくつかのFR残基は、例えば、抗体の特異性または親和性を修復するかまたは改善するために、非ヒト抗体（例えば、CDR残基が由来する抗体）由来の対応する残基で置換される。

【0188】

ヒト化抗体およびそれらを作る方法は、例えば、Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13: 1619-1633において概説され、例えば、Riechmann et al., (1988) *Nature* 332:323-329; Queen et al., (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033; 米国特許第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号、および第7,087,409号; Kashmiri et al., (2005) *Methods* 36:25-34; Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498（「リサーフェシング（resurfacing）」を記載する）; Dall'Acqua et al., (2005) *Methods* 36:43-60（「FRシャッフリング」を記載する）; ならびにOsbourn et al., (2005) *Methods* 36:61-68およびKlimka et al., (2000) *Br. J. Cancer*, 83:252-260（FRシャッフリングに対する「ガイド付き選択」アプローチを記載する）にさらに記載されている。

【0189】

ヒト化に用いることができるヒトフレームワーク領域には、以下が含まれるが、それらに限定されない：「ベストフィット」法（例えば、Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296を参照されたい）を用いて選択されるフレームワーク領域；重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285；およびPresta et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2623を参照されたい）；ヒト成熟（体細胞変異した）フレームワーク領域またはヒト生殖系列フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633を参照されたい）；ならびにFRライブラリーのスクリーニングに由来するフレームワーク領域（例えば、Baca et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684およびRosok et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618を参照されたい）。典型的には、VHHのFR領域は、ヒト化VHHを作るために、ヒトFR領域で置き換えられる。いくつかの態様において、ヒトFRのある特定のFR残基は、ヒト化VHHの1つまたは複数の特性を改善するために置き換えられる。そのような置き換えられた残基を有するVHHドメインは、本明細書において依然として「ヒト化」と言われる。

【0190】

SEQ ID NO:102、244～318、401～409、416、455、および476～480～488、507～518のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:102、244～318、401～409、416、455、および476～480～488、507～518のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、DLL3と結合するVHHドメインが、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:319～335または456のうちのいずれかに示されるCDR1、SEQ ID NO:336～353、384、410、および411のうちのいずれかに示されるCDR2、ならびにSEQ ID NO:354～367、395、および412～415のうちのいずれかに示されるCDR3を含有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:102、244～318、401～409、416、455、および476～480～488、507～518のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:102、244～318、401～409、416、455、および476～480～488、507～518のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、D

LL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:102、244～318、401～409、416、455、および476～480～488、507～518のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0191】

SEQ ID NO:244～318および455のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:244～318および455のうちのいずれかより選択されるV_HH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、DLL3と結合するVHHドメインが、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:319～335のうちのいずれかに示されるCDR1、SEQ ID NO:336～353のうちのいずれかに示されるCDR2、およびSEQ ID NO:354～367のうちのいずれかに示されるCDR3を含有する。提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:1～114のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:244～318のうちのいずれかより選択されるV_HH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:244～318および455のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

10

【0192】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:244に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO:244に示されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:244に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:244に示されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:244に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

20

【0193】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:319、320、321、322、323、324、325、326のうちのいずれかに示されるCDR1、SEQ ID NO:336、337、338のうちのいずれかに示されるCDR2、およびSEQ ID NO:354に示されるCDR3を含有する。

30

【0194】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:319、336、および354のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:319、337、および354のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:319、338、および354のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、338、および354のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:321、338、および354のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:322、338、および354のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:323、338、および354のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:324、338、および354のうちのいずれかに示されるCDR1、

40

50

CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:325、338、および354のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:326、338、および354のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

【0195】

いくつかの局面において、DLL3と結合するVHHドメインは、SEQ ID NO:245～257のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:245～257のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

10

【0196】

いくつかのケースにおいて、提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:245～257のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒト化バリエーションである。いくつかの態様において、DLL3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO:245～257のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0197】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:258に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO:258に示されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:258に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:258に示されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:258に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

20

【0198】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:327に示されるCDR1、SEQ ID NO:339に示されるCDR2、およびSEQ ID NO:355に示されるCDR3を含有する。

30

【0199】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:327、339、および355のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

【0200】

いくつかの局面において、DLL3と結合するVHHドメインは、SEQ ID NO:259～263のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:259～263のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

40

【0201】

いくつかのケースにおいて、提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:259～263のうちのいずれかより選択されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:259～263のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒト化バリエーションである。いくつかの態様において、DLL3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO:259～263のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0202】

50

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:264に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO:264に示されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:264に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:264に示されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:264に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

【0203】

10

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:328、329、または456に示されるCDR1、SEQ ID NO:340に示されるCDR2、およびSEQ ID NO:356に示されるCDR3を含有する。

【0204】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:328、340、356のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:329、340、356のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:456、340、356のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

20

【0205】

いくつかの局面において、DLL3と結合するVHHドメインは、SEQ ID NO:265~274、416、455、もしくは476~478のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:265~274、416、455、もしくは476~478のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

【0206】

いくつかのケースにおいて、提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:265~274、416、455、もしくは476~478のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:265~274、416、455、もしくは476~478のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒト化バリエーションである。いくつかの態様において、DLL3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO:265~274、416、455、または476~478のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

30

【0207】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:275に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO:275に示されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:275に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:105に示されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:275に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

40

【0208】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:320に示されるCDR1、SEQ ID NO:341に示されるCDR2、およびSEQ ID NO:357に

50

示されるCDR3を含有する。

【0209】

いくつかの局面において、DLL3と結合するVHHドメインは、SEQ ID NO:276~279もしくは479のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:276~279もしくは479のうちのいずれかより選択されるV_{HH}領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

【0210】

いくつかのケースにおいて、提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:276~279もしくは479のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:276~279もしくは479のうちのいずれかより選択されるV_{HH}領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒト化バリエーションである。いくつかの態様において、DLL3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO:276~279または479のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0211】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:280に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO:280に示されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:280に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:280に示されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:280に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

【0212】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:330に示されるCDR1、SEQ ID NO:342に示されるCDR2、およびSEQ ID NO:358に示されるCDR3を含有する。

【0213】

いくつかの局面において、DLL3と結合するVHHドメインは、SEQ ID NO:281~286のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:281~286のうちのいずれかより選択されるV_{HH}領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

【0214】

いくつかのケースにおいて、提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:281~286のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:281~286のうちのいずれかより選択されるV_{HH}領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒト化バリエーションである。いくつかの態様において、DLL3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO:281~286のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0215】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:287に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO:287に示されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:287に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:287に示されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する

アミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 287に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

【0216】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:320に示されるCDR1、SEQ ID NO:345、346、347のうちのいずれかに示されるCDR2、およびSEQ ID NO:359、360、361のうちのいずれかに示されるCDR3を含有する。

【0217】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、345、および359のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、346、および359のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、347、および359のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、345、および360のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、345、および361のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、347、および360のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

10

20

【0218】

いくつかの局面において、DLL3と結合するVHHドメインは、SEQ ID NO:288~298もしくは102のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:288~298もしくは102のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

【0219】

いくつかのケースにおいて、提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:288~298もしくは102のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:288~298もしくは102のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒト化バリエーションである。いくつかの態様において、DLL3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO:288~298または102のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

30

【0220】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:299に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO:299に示されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:299に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:299に示されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:299に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

40

【0221】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:331に示されるCDR1、SEQ ID NO:348、349、350のうちのいずれかに示されるCDR2、およびSEQ ID NO:356に示されるCDR3を含有する。

【0222】

50

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:331、348、および356のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:331、349、および356のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:331、350、および356のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

【0223】

いくつかの局面において、DLL3と結合するVHHドメインは、SEQ ID NO:300～305もしくは480のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:300～305もしくは480のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

10

【0224】

いくつかのケースにおいて、提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:300～305もしくは480のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:300～305もしくは480のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒト化バリエーションである。いくつかの態様において、DLL3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO:300～305または480のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

20

【0225】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:306に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO:306に示されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:306に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:306に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:306に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

30

【0226】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:507に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO:507に示されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:507に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:507に示されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:507に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

40

【0227】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:332に示されるCDR1、SEQ ID NO:348、349、350のうちのいずれかに示されるCDR2、およびSEQ ID NO:362に示されるCDR3を含有する。

【0228】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:332、348、および362のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:332、349、および362のうちのいずれかに示されるCDR1、C

50

DR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:332、350、および362のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

【0229】

いくつかの局面において、DLL3と結合するVHHドメインは、SEQ ID NO:307~313のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:307~313のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

【0230】

いくつかのケースにおいて、提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:307~313のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:307~313のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒト化バリエーションである。いくつかの態様において、DLL3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO:307~313のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0231】

いくつかの局面において、DLL3と結合するVHHドメインは、SEQ ID NO:508~514のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:508~514のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

【0232】

いくつかのケースにおいて、提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:508~514のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:508~514のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒト化バリエーションである。いくつかの態様において、DLL3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO:508~514のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0233】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:401に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO:401に示されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:401に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:401に示されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:401に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

【0234】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:320に示されるCDR1、SEQ ID NO:384、410、411のうちのいずれかに示されるCDR2、およびSEQ ID NO:395、412、413、414、415のうちのいずれかに示されるCDR3を含有する。

【0235】

いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、384、および395のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、410、および395のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3

10

20

30

40

50

VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、411、および395のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、384、および412のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、384、および413のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、384、および414のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書中に提供されたDLL3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO:320、384、および415のうちのいずれかに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

10

【0236】

いくつかの局面において、DLL3と結合するVHHドメインは、SEQ ID NO:402~409のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:402~409のうちのいずれかより選択されるV_HH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。いくつかの局面において、DLL3と結合するVHHドメインは、SEQ ID NO:481~488のうちのいずれかより選択されるV_HHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:481~488のうちのいずれかより選択されるV_HH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

20

【0237】

いくつかのケースにおいて、提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:402~409のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:402~409のうちのいずれかより選択されるV_HH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒト化バリエーションである。いくつかの態様において、DLL3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO:402~409のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。いくつかのケースにおいて、提供されたDLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:481~488のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:481~488のうちのいずれかより選択されるV_HH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒト化バリエーションである。いくつかの態様において、DLL3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO:481~488のうちのいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

30

【0238】

III. DLL3結合ポリペプチドを含有する融合タンパク質およびコンジュゲート

1つまたは複数の追加のドメインまたは部分と直接または間接的に連結された、DLL3と特異的に結合する少なくとも1つのVHHドメインを含有するDLL3結合ポリペプチドを含有する融合タンパク質およびコンジュゲートが、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、本開示の融合タンパク質またはコンジュゲートは、単一のポリペプチドから構成される。他の態様において、本開示の融合タンパク質またはコンジュゲートは、複数のポリペプチドから構成される。いくつかの態様において、本開示のDLL3結合ポリペプチドには、DLL3と特異的に結合する少なくとも1つのVHHドメインが組み入れられている。いくつかの局面において、DLL3結合ポリペプチドは、多価である。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、DLL3と特異的に結合するVHHドメインの2コピー以上、例えば、DLL3と特異的に結合するVHHドメインの3コピー以上、4コピー以上、5コピー以上、または6コピー以上を含む。ある種の局面において、DLL3結合ポリペプチドは、多重特異性である。例えば、いくつかのケースにおいて、1つまたは複数の追加のドメインは、1つまたは複数のさらなる抗原またはタンパク質と結合する1つまたは複数の追加の

40

50

結合ドメインであり得る。

【 0 2 3 9 】

いくつかの態様において、本開示のDLL3結合ポリペプチドは、アミノ酸リンカーを介して機能的に連結された2つ以上のポリペプチド配列を含む。いくつかの態様において、これらのリンカーは、アミノ酸グリシンおよびセリンから主に構成され、本明細書においてGSリンカーと示される。本開示の融合タンパク質のGSリンカーは、様々な長さ、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20アミノ酸長であり得る。いくつかの態様において、GSリンカーは、GGSGGS、即ち、(GGS)₂ (SEQ ID NO: 1); GGSGGSGGS、即ち、(GGS)₃ (SEQ ID NO: 2); GGSGGSGGSGGS、即ち、(GGS)₄ (SEQ ID NO: 3); および GGSGGSGGSGGSGGS、即ち、(GGS)₅ (SEQ ID NO: 4)

10

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、リンカーは、非限定的な例として、GG, GGG, GGGG (SEQ ID NO: 5), GGGGG (SEQ ID NO: 6), および GGGGGG (SEQ ID NO: 7)

のようなグリシン残基を含む可動性リンカーである。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、GSリンカーとグリシンリンカーとの組み合わせを含む。いくつかの態様において、リンカーは、(GGGGS)_n (nは1～5である) (SEQ ID NO:123); (GGGGS)_n (nは1～4である) (SEQ ID NO:124); GGGGS

20

(SEQ ID NO:125); GGGGGS (SEQ ID NO:126); GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:127); GGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:128); GGSGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:129); または PGGGG (SEQ ID NO:450)

である。いくつかの態様において、リンカーは、GGリンカーである。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、GSリンカーとグリシンリンカーとの組み合わせを含む。

【 0 2 4 0 】

30

A . Fc融合物

本明細書で提供されるDLL3に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、Fcドメインとを含有する融合タンパク質であるDLL3結合ポリペプチドが、本明細書において提供される。いくつかの態様において、本明細書で提供されるDLL3結合ポリペプチドは、DLL3に結合する1つ、2つ、3つ、または4つのVHHドメインと、Fcドメインとを含む。

【 0 2 4 1 】

いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域の融合タンパク質中への組込みは、いくつかの局面において、二量体を共に形成する2つのポリペプチドから構成され得る。いくつかの態様において、Fcドメインは、DLL3結合部位の数を二倍にする二量体が形成されるように、生理的条件で、例えば、細胞から発現した時に、DLL3結合ポリペプチドの二量体化を媒介する。例えば、DLL3に結合する3つのVHHドメインとFc領域とを含むDLL3結合ポリペプチドは、単量体として三価であるが、Fc領域は、DLL3結合ポリペプチドがそのような条件下で六価の二量体として存在するように、二量体化を媒介し得る。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインをIgG Fc領域に融合させ、これらの態様において、融合タンパク質は、分子当たり2つのDLL3 VHHドメインを有する二価である。いくつかの態様において、2つのDLL3結合ドメイン (2×) をIgG Fc領域に融合させ、これらの態様において、融合タンパク質は、分子当たり4つのDLL3 VHHドメインを有する四価である。いくつかの態様において、3つのDLL3 VHHドメイン (3×) をIgG Fc領域に融合させ、これらの態様において、融合タンパク質は、分子当たり6つのDLL3 VHHドメインを有する六価である。

40

50

【0242】

いくつかの態様において、多価DLL3結合ポリペプチドは二価である。いくつかの態様において、本開示の二価DLL3結合ポリペプチドは、2コピーの、以下の構造：(DLL3 VHH)-リンカー-Fcを有するDLL3結合ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、多価DLL3結合ポリペプチドは四価である。いくつかの態様において、本開示の四価DLL3結合ポリペプチドは、2コピーの、以下の構造：(DLL3 VHH)-リンカー-(DLL3 VHH)-リンカー-Fcを有するDLL3-ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、多価DLL3結合ポリペプチドは六価である。いくつかの態様において、本開示の六価DLL3結合ポリペプチドは、2コピーの、以下の構造：(DLL3 VHH)-リンカー-(DLL3 VHH)-リンカー-(DLL3 VHH)-リンカー-Fcを有するDLL3結合ポリペプチドを含む。

10

【0243】

いくつかの場合には、結果として生じた融合タンパク質が、2つの同一のポリペプチドから形成されるように、Fc領域のCH3ドメインを、ホモ二量体化ドメインとして用いることができる。他の場合には、ヘテロ二量体化を可能にするために、Fc領域のCH3二量体界面領域を変異させることができる。例えば、構築物が非対称融合タンパク質であるように、ヘテロ二量体化ドメインを融合タンパク質中に組み込むことができる。

【0244】

提供される態様のいずれかにおいて、DLL3 VHHドメインは、上記のいずれかであることができる。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、DLL3に結合するヒト化VHHドメインである。

20

【0245】

様々な態様において、DLL3結合ポリペプチドに含まれるFcドメインは、ヒトFcドメインであるか、またはヒトFcドメインに由来する。いくつかの態様において、融合タンパク質は、免疫グロブリンFc領域を含有する。いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域は、IgG1アイソタイプ、IgG2アイソタイプ、IgG3アイソタイプ、およびIgG4サブクラスからなる群より選択されるIgGアイソタイプである。

【0246】

いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域またはその免疫学的活性断片は、IgGアイソタイプである。例えば、融合タンパク質の免疫グロブリンFc領域は、以下のアミノ酸配列を有する、ヒトIgG1アイソタイプのものである。

30

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT
KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

【0247】

いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域またはその免疫学的活性断片は、SEQ ID NO: 8のアミノ酸配列に対して少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヒトIgG1ポリペプチド配列を含む。

40

【0248】

本開示の融合タンパク質がFcポリペプチドを含むいくつかの態様において、Fcポリペプチドを変異させるかまたは改変する。場合によっては、変異には、Fcポリペプチドのエフェクター機能を低減させるための1つまたは複数のアミノ酸置換が含まれる。エフェクター機能を変更する、例えば低減させる、Fcポリペプチドに対する変異の様々な例が、下記のいずれかを含み、公知である。いくつかの態様において、Fc領域におけるアミノ酸置換への言及は、特定のSEQ ID NOに関して説明されない限り、KabatによるEUナンバリング (Kabatナンバリングとも呼ばれる) による。EUナンバリングは、公知であり、ごく最近更新されたIMGT Scientific Chart (IMGT (登録商標)、the international ImMun

50

oGeneTics information system (登録商標)、http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html (作成: 2001年5月17日、最終更新: 2013年1月10日)、およびKabat, E.A. et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991) において報告されているようなEUインデックスに従う。

【0249】

いくつかの態様において、低減したエフェクター機能を示すFc領域は、DLL3結合またはCD3結合が望ましいが、ある特定のエフェクター機能(例えば、CDCおよびADCC)が不必要であるかまたは有害である適用について、望ましい候補であり得る。CDC活性および/またはADCC活性の低減/枯渇を確認するために、インビトロおよび/またはインビボの細胞傷害活性アッセイを実施することができる。例えば、多重特異性ポリペプチド構築物および/またはその切断された構成要素が、Fc R結合を欠如する(したがって、ADCC活性を欠如する可能性が高い)が、FcRn結合能を保持することを確実にするために、Fc受容体(FcR)結合アッセイを実施することができる。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞は、Fc RIIIのみを発現するのに対して、単球は、Fc RI、Fc RII、およびFc

10

RIIIを発現する。関心対象の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号(例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)を参照されたい)およびHellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 米国特許第5,821,337号(Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)を参照されたい)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法が使用されてもよい(例えば、フローサイトメトリー用のACT1(商標)非放射性細胞傷害活性アッセイ(CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.); およびCytoTox 96(商標)非放射性細胞傷害活性アッセイ(Promega, Madison, Wis.)を参照されたい)。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。代替的に、または追加的に、関心対象の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)に開示されるものなどの動物モデルにおいて、評価されてもよい。多重特異性ポリペプチド構築物またはその切断された構成要素が、C1qに結合できず、したがって、CDC活性を欠如することを確認するために、C1q結合アッセイもまた実施されてもよい。例えば、WO 2006/029879およびWO 2005/100402におけるC1qおよびC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイが行われてもよい(例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); およびCragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)を参照されたい)。当技術分野において公知の方法を用いて、FcRn結合およびインビボクリアランス/半減期の決定もまた行うことができる(例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)を参照されたい)。

20

30

【0250】

いくつかの態様において、ヒトIgG Fc領域は、抗体依存性細胞性細胞傷害活性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害活性(CDC)を変更するように改変され、例えば、Natsume et al., 2008 Cancer Res, 68(10): 3863-72; Idusogie et al., 2001 J Immunol, 166(4): 2571-5; Moore et al., 2010 mAbs, 2(2): 181-189; Lazar et al., 2006 PNAS, 103(11): 4005-4010; Shields et al., 2001 JBC, 276(9): 6591-6604; Stavenhagen et al., 2007 Cancer Res, 67(18): 8882-8890; Stavenhagen et al., 2008 Advan. Enzyme Regul., 48: 152-164; Alegre et al, 1992 J Immunol, 148: 3461-3468に記載され; Kaneko and Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1):1-11 において概説されるアミノ酸改変である。

40

【0251】

ADCCを増強する変異の例には、Ser239およびIle332での改変、例えば、Ser239Asp およびIle332Glu(S239D、I332E)が含まれる。CDCを増強する変異の例には、Lys3

50

26およびGlu333での改変が含まれる。いくつかの態様において、Fc領域は、これらの位置の一方または両方で改変され、例えば、Kabatナンバリングシステムを用いたLys326Alaおよび/またはGlu333Ala (K326AおよびE333A) を有する。

【0252】

いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体結合を低減させるために以下の位置のうちの1つまたは複数で変更される：Leu234 (L234)、Leu235 (L235)、Asp265 (D265)、Asp270 (D270)、Ser298 (S298)、Asn297 (N297)、Asn325 (N325)、Ala327 (A327)、またはPro329 (P329)。例えば、Leu234Ala (L234A)、Leu235Ala (L235A)、Leu235Glu (L235E)、Asp265Asn (D265N)、Asp265Ala (D265A)、Asp270Asn (D270N)、Ser298Asn (S298N)、Asn297Ala (N297A)、Pro329Ala (P329A) もしくはPro239Gly (P329G)、Asn325Glu (N325E)、またはAla327Ser (A327S)。好ましい態様において、Fc領域内の改変は、Fc受容体 受容体に対する結合を低減させ、他方、新生児Fc受容体 (FcRn) に対する結合へは最小の影響を有する。

【0253】

いくつかの態様において、ヒトIgG1 Fc領域は、融合タンパク質のグリコシル化を阻止するためにアミノ酸Asn297 (Kabatナンバリング) で改変され、例えば、Asn297Ala (N297A) またはAsn297Asp (N297D) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体相互作用を変更するためにアミノ酸Leu235 (Kabatナンバリング) で改変され、例えば、Leu235Glu (L235E) またはLeu235Ala (L235A) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体相互作用を変更するためにアミノ酸Leu234 (Kabatナンバリング) で改変され、例えば、Leu234Ala (L234A) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体相互作用を変更するためにアミノ酸Leu234 (Kabatナンバリング) で改変され、例えば、Leu235Glu (L235E) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、アミノ酸234および235の両方で変更され、例えば、Leu234AlaおよびLeu235Ala (L234A/L235A) またはLeu234ValおよびLeu235Ala (L234V/L235A) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、234、235、および297のアミノ酸で変更され、例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Asn297Ala (L234A/L235A/N297A) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、234、235、および329のアミノ酸で変更され、例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Pro329Ala (L234A/L235A/P329A) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体相互作用を変更するためにアミノ酸Asp265 (Kabatナンバリング) で改変され、例えば、Asp265Ala (D265A) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体相互作用を変更するためにアミノ酸Pro329 (Kabatナンバリング) で改変され、例えば、Pro329Ala (P329A) またはPro329Gly (P329G) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、アミノ酸265および329の両方で変更され、例えば、Asp265AlaおよびPro329Ala (D265A/P329A) またはAsp265AlaおよびPro329Gly (D265A/P329G) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、234、235、および265のアミノ酸で変更され、例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Asp265Ala (L234A/L235A/D265A) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、234、235、および329のアミノ酸で変更され、例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Pro329Gly (L234A/L235A/P329G) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、234、235、265、および329のアミノ酸で変更され、例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Asp265Ala、Pro329Gly (L234A/L235A/D265A/P329G) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体結合を低減させるためにGly235で変更される。例えば、Gly235を、融合タンパク質から欠失させる。いくつかの態様において、ヒトIgG1 Fc領域は、CD32Aとの相互作用を増強するためにアミノ酸Gly236で改変され、例えば、Gly236Ala (G236A) を有する。いくつかの態様において、ヒトIgG1 Fc領域は、Lys447を欠如している (K

10

20

30

40

50

abat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス)。

【 0 2 5 4 】

いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体結合を低減させるために以下の位置のうちの1つまたは複数のアミノ酸を欠如している：Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、またはLeu235 (L235)。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体結合を低減させるために、以下の位置Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、またはLeu235 (L235)のうちの1つまたは複数のアミノ酸を欠如しており、かつAsp265 (D265)、Asn297 (N297)、またはPro329 (P329)のうちの1つまたは複数で改変されている。例えば、DLL3結合ポリペプチドに含まれるFc領域は、ヒトFcドメインに由来し、IgG1 E233、L234、およびL235に対応するヒンジの下の方に3つのアミノ酸欠失を含む。いくつかの局面において、そのようなFcポリペプチドは、Fc Rをエンゲージせず、したがって、「エフェクターサイレント」または「エフェクターナル」と言われる。例えば、これらの3つのアミノ酸のFc欠失は、補体タンパク質C1q結合を低減させる。いくつかの態様において、これらの3つのアミノ酸のFc欠失を伴うFc領域を有するポリペプチドは、FcRnに対する結合を保持し、したがって、長期の半減期、およびFcRn媒介性リサイクリングに関連するトランスサイトーシスを有する。そのような改変されたFc領域は、「Fc xELL」または「Fc欠失」と言われ、以下のアミノ酸配列を有する。PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR

EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL

PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLT

DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 9)

【 0 2 5 5 】

いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域またはその免疫学的活性断片は、SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列に対して少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヒトIgG1ポリペプチド配列を含む。

【 0 2 5 6 】

いくつかの態様において、ヒトIgG Fc領域は、FcRn結合を増強するように改変される。FcRnに対する結合を増強するFc変異の例は、Met252Tyr、Ser254Thr、Thr256Glu (それぞれM252Y、S254T、T256E) (Kabatナンバリング、Dall'Acqua et al 2006, J. Biol Chem Vol. 281(33) 23514-23524)、Met428LeuおよびAsn434Ser (M428L、N434S) (Zalevsky et al 2010 Nature Biotech, Vol. 28(2) 157-159)、またはMet252Ile、Thr256Asp、Met428Leu (それぞれM252I、T256D、M428L)である (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス)。

【 0 2 5 7 】

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドに含まれるFcドメインは、ヒトFcドメインに由来し、変異M252YおよびM428Vを含み、本明細書において「Fc-YV」と言われる。いくつかの態様において、変異したかまたは改変されたFcポリペプチドは、Kabatナンバリングシステムを用いて以下の変異：M252YおよびM428Lを含む。いくつかの態様において、そのような変異は、エンドソームの酸性pH (6.5付近) でFcRnに対する結合を増強し、他方、中性pH (約7.2) で検出可能な結合を失い、これは、FcRn媒介性リサイクリングの増強および長期の半減期を可能にする。

【 0 2 5 8 】

本明細書で提供される多重特異性ポリペプチド構築物の具体的な態様において、DLL3結合ポリペプチドに含まれるFcドメインは、ヒトFcドメインに由来し、ヘテロ二量体化を誘導する変異を含む。いくつかの態様において、そのような変異には、「ノブ」変異およ

び「ホール」変異と言われるものが含まれる。例えば、Thr366でCH3ドメイン内にアミノ酸改変を有すると、より嵩が高いアミノ酸、例えばTryで置き換えられた場合（T366W）に、位置Thr366、Leu368、およびTyr407に、より嵩が低いアミノ酸、例えば、それぞれSer、Ala、およびValへのアミノ酸改変（T366S/L368A/Y407V）を有する第2のCH3ドメインと優先的にペア形成することができる。いくつかの態様において、「ノブ」Fcドメインは、変異T366Wを含む。いくつかの態様において、「ホール」Fcドメインは、変異T366S、L368A、およびY407Vを含む。CH3改変を介したヘテロ二量体化は、例えば、相対するCH3ドメイン上でSer354をCysに（S354C）およびY349をCysに（Y349C）変化させることによる、ジスルフィド結合の導入によって、さらに安定化させることができる（Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15において概説される）。いくつかの態様において、ヘテロ二量体化に用いられるFcドメインは、追加の変異、例えば、ヘテロ二量体Fcペアの第2のメンバー上の対応する変異Y349Cと非対称性ジスルフィドを形成する、ヘテロ二量体Fcペアの第1のメンバー上の変異S354Cを含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcペアの1つのメンバーは、FcRn結合を維持しながらプロテインA結合を阻止するように、改変H435RまたはH435Kを含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcペアの1つのメンバーは、改変H435RまたはH435Kを含み、他方、ヘテロ二量体Fcペアの第2のメンバーは、H435で改変されない。様々な態様において、ホールFcドメインは、改変H435RまたはH435Kを含み（改変がH435Rであるいくつかの例において、「ホール-R」と言われる）、他方、ノブFcドメインは含まない。いくつかの例において、ホール-R変異は、ヘテロ二量体の精製を、存在し得るホモ二量体ホールFcドメインを上回るように改善する。

【0259】

いくつかの態様において、ヒトIgG Fc領域は、二量体化を阻止するように改変される。これらの態様において、本開示の融合タンパク質は単量体である。例えば、残基Thr366での電荷を有する残基への改変、例えば、Thr366Lys、Thr366Arg、Thr366Asp、またはThr366Glu（それぞれT366K、T366R、T366D、またはT366E）は、CH3-CH3二量体化を阻止する。

【0260】

いくつかの態様において、融合タンパク質の免疫グロブリンFc領域または免疫学的活性断片は、以下のアミノ酸配列を有する、ヒトIgG2アイソタイプのものである。

PAPPVAGPSV FLPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT
LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL
TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 10)

【0261】

いくつかの態様において、融合物またはその免疫学的活性断片は、SEQ ID NO: 10のアミノ酸配列に対して少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヒトIgG2ポリペプチド配列を含む。

【0262】

いくつかの態様において、ヒトIgG2 Fc領域は、アミノ酸Asn297で改変される（例えば、抗体のグリコシル化を阻止するため、例えば、Asn297Ala（N297A）またはAsn297Asp（N297D））。いくつかの態様において、ヒトIgG2 Fc領域は、Lys447を欠如している（Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのE Uインデックス）。

【0263】

いくつかの態様において、融合タンパク質の免疫グロブリンFc領域または免疫学的活性断片は、以下のアミノ酸配列を有する、ヒトIgG3アイソタイプのものである。

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT
 KPREEQYNST FRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKT KGQPREPQVY
 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPPMLD SDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRFTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

【 0 2 6 4 】

いくつかの態様において、抗体またはその免疫学的活性断片は、SEQ ID NO : 11のアミノ酸配列に対して少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヒトIgG3ポリペプチド配列を含む。

10

【 0 2 6 5 】

いくつかの態様において、ヒトIgG3 Fc領域は、抗体のグリコシル化を阻止するためにアミノ酸Asn297 (Kabatナンバリング) で改変され、例えば、Asn297Ala (N297A) またはAsn297Asp (N297D) を有する。いくつかの態様において、ヒトIgG3 Fc領域は、半減期を延長するためにアミノ酸435で改変され、例えば、Arg435His (R435H) を有する。いくつかの態様において、ヒトIgG3 Fc領域は、Lys447を欠如している (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス)。

【 0 2 6 6 】

いくつかの態様において、融合タンパク質の免疫グロブリンFc領域または免疫学的活性断片は、以下のアミノ酸配列を有する、ヒトIgG4アイソタイプのものである。

20

PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT
 KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIKTISKA KGQPREPQVY
 TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR
 LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 12)

【 0 2 6 7 】

いくつかの態様において、抗体またはその免疫学的活性断片は、SEQ ID NO : 12のアミノ酸配列に対して少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヒトIgG4ポリペプチド配列を含む。

30

【 0 2 6 8 】

いくつかの態様において、融合タンパク質の免疫グロブリンFc領域または免疫学的活性断片は、以下のアミノ酸配列を有する、ヒトIgG4アイソタイプのものである。

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT
 KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIKTISKA KGQPREPQVY
 TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR
 LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 13)

40

【 0 2 6 9 】

いくつかの態様において、抗体またはその免疫学的活性断片は、SEQ ID NO : 13のアミノ酸配列に対して少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヒトIgG4ポリペプチド配列を含む。

【 0 2 7 0 】

いくつかの態様において、ヒトIgG4 Fc領域は、Fc受容体相互作用を変更するためにアミノ酸235で改変され、例えば、Leu235Glu (L235E) を有する。いくつかの態様において、ヒトIgG4 Fc領域は、抗体のグリコシル化を阻止するためにアミノ酸Asn297 (Ka

50

batナンバリング)で改変され、例えば、Asn297Ala (N297A) またはAsn297Asp (N297D) を有する。いくつかの態様において、ヒトIgG4 Fc領域は、Lys447を欠如している (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス)。

【0271】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、免疫グロブリンヒンジ領域に由来するポリペプチドを含有する。ヒンジ領域は、ヒトIgGサブクラスのいずれかから選択することができる。例えば、融合タンパク質は、EPKSSDKTHTCPPC (SEQ ID NO: 14)

10

の配列を有する改変型IgG1ヒンジを含有してもよく、ここで、軽鎖のC末端システインとジスルフィドを形成するCys220は、セリンに変異しており、例えば、Cys220Ser (C220S) を有する。他の態様において、融合タンパク質は、配列DKTHTCPPC (SEQ ID NO: 15) を有する切断型ヒンジを含有する。

【0272】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、配列ESKYGPCCPPC (SEQ ID NO: 16) を有する、鎖交換を阻止するかまたは低減させるように改変されている、例えば、Ser228Pro (S228P) を有する、IgG4由来の改変型ヒンジを有する。いくつかの態様において、融合タンパク質は、リンカーポリペプチドを含有する。他の態様において、融合タンパク質は、リンカーおよびヒンジポリペプチドを含有する。

20

【0273】

いくつかの態様において、Fc領域は、N297でのN結合グリカン鎖に付着したフコースが欠如しているか、または低減している。FUT8欠損細胞株における生成；哺乳動物細胞培養培地への阻害剤、例えばカスタノスペルミンの添加；および産生細胞株の代謝操作を含むがそれらに限定されない、フコシル化を阻止する多数の方法がある。

【0274】

いくつかの態様において、Fc領域は、ヒトにおいて見出される既存の抗体による認識を排除するように操作される。いくつかの態様において、本開示のVHH含有ポリペプチドは、位置Leu11の変異、例えば、Leu11Glu (L11E) またはLeu11Lys (L11K) によって改変される。他の態様において、本開示のシングルドメイン抗体は、カルボキシ末端領域における変化によって改変され、例えば、末端配列は、配列GQGTLVTVKPGG (SEQ ID NO: 17) またはGQGTLVTVPEPGG (SEQ ID NO: 18)

30

またはその改変を有する。いくつかの態様において、本開示のVHH含有ポリペプチドは、位置11の変異によって、およびカルボキシ末端領域における変化によって改変される。

【0275】

いくつかの態様において、本開示の融合タンパク質の1つまたは複数のポリペプチドは、アミノ酸リンカーを介して機能的に連結されている。いくつかの態様において、これらのリンカーは、主にアミノ酸グリシンおよびセリンから構成され、本明細書においてGSリンカーと表される。本開示の融合タンパク質のGSリンカーは、様々な長さ、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20アミノ酸の長さのものであることができる。

40

【0276】

いくつかの態様において、GSリンカーは、GGSGGS、すなわち、GGSGGS、即ち、(GGG)₂ (SEQ ID NO: 1); GGSGGSGGS、即ち、(GGG)₃ (SEQ ID NO: 2); GGSGGSGGSGGS、即ち、(GGG)₄ (SEQ ID NO: 3); および GGSGGSGGSGGSGGS、即ち、(GGG)₅ (SEQ ID NO: 4)

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、リンカーは可

50

動性リンカーであり、非限定的な例として、
GG, GGG, GGGG (SEQ ID NO: 5),
GGGGG (SEQ ID NO: 6), および GGGGGG (SEQ ID NO: 7)

などの、グリシン残基を含むグリシンリンカーである。いくつかの態様において、リンカーは、(GGGGS)_nであり、nは1～5であり (SEQ ID NO: 123); (GGGGGS)_nであり、nは1～4であり (SEQ ID NO: 124);
GGGGS (SEQ ID NO:125); GGGGGS (SEQ ID NO:126); GGGGGS GGGGGS GGGGGS
(SEQ ID NO:127); GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:128); GSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:129); または PGGGG (SEQ ID NO:450)

10

である。いくつかの態様において、融合タンパク質は、GSリンカーとグリシンリンカーとの組み合わせを含むことができる。

【0277】

B. コンジュゲート

本明細書において提供されるDLL3に特異的に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、1つまたは複数のさらなる部分とを含む、コンジュゲート、が本明細書において提供される。さらなる部分は、細胞傷害剤などの治療剤であり得るか、または検出剤であり得る。いくつかの態様において、該部分は、ターゲティング部分、低分子薬物 (500ダルトンのモル質量未満の、ポリペプチドではない薬物)、毒素、細胞分裂抑制剤、細胞傷害剤、免疫抑制剤、診断目的に適した放射性作用物質、治療目的での放射性金属イオン、プロドラッグ活性化酵素、生物学的半減期を増加させる作用物質、または診断用のもしくは検出可能な作用物質であり得る。

20

【0278】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、細胞傷害性、細胞分裂阻害性、またはある程度の治療効果をもたらす他の作用のいずれかである、治療剤にコンジュゲートされた、本明細書において提供される1つまたは複数のDLL3 VHHドメインを含む抗体薬物コンジュゲート (ADC、イムノコンジュゲートとも呼ばれる) である。いくつかの態様において、細胞傷害剤は、化学療法剤、薬物、増殖阻害剤、毒素 (例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、またはその断片)、または放射性同位元素 (すなわち、放射性コンジュゲート (radioconjugate)) である。いくつかの態様において、本開示の提供される抗体薬物コンジュゲートは、薬物部分の、腫瘍への標的指向送達を可能にする。いくつかの場合において、これは、標的指向された腫瘍細胞の死滅をもたらすことができる。

30

【0279】

いくつかの態様において、本明細書において、治療剤とコンジュゲートされた、本明細書において提供される少なくとも1つのDLL3 VHHドメインを含むDLL3結合コンジュゲートが提供される。いくつかの態様において、治療剤には、例えば、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサート、およびビンデシンが含まれる (Rowland et al., Cancer Immunol. Immunother. 21:183-187, 1986)。いくつかの態様において、治療剤は細胞内活性を有する。いくつかの態様において、DLL3結合コンジュゲートは内部移行し、治療剤は、細胞のタンパク質合成を遮断する細胞毒であり、その中で細胞死をもたらす。いくつかの態様において、治療剤は、リボソーム不活性化活性を有するポリペプチドを含む細胞毒であり、例えば、ゲロニン、ボウガニン (bougainin)、サボリン、リシン、リシンA鎖、プリオジン (bryodin)、ジフテリア毒素、レストリクトシン、シュードモナス外毒素A、およびそれらのバリエーションを含む。いくつかの態様において、治療剤がリボソーム不活性化活性を有するポリペプチドを含む細胞毒である場合、タンパク質を細胞に対して細胞傷害性にするために、DLL3結合コンジュゲートは、標的細胞への結合時に内部移行しなければならない。

40

【0280】

50

いくつかの態様において、本明細書において、毒素とコンジュゲートされた、本明細書において提供される少なくとも1つのDLL3 VHHドメインを含むDLL3結合コンジュゲートが提供される。いくつかの態様において、毒素には、例えば、ジフテリア毒素などの細菌毒素、リシンなどの植物毒素、ゲルダナマイシン (Mandler et al., J. Nat. Cancer Inst. 92 (19):1573-1581 (2000); Mandler et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028 (2000); Mandler et al., Bioconjugate Chem. 13:786-791 (2002))、マイタンシノイド (EP 1391213; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996))、およびカリケアマイシン (Lode et al., Cancer Res. 58:2928 (1998); Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993))などの低分子毒素が含まれる。毒素は、チューブリン結合、DNA結合、またはトポイソメラーゼ阻害を含むメカニズムによってその細胞傷害作用および細胞分裂阻害作用を発揮し得る。

10

【0281】

いくつかの態様において、本明細書において、検出可能なシグナルを直接的にまたは間接的に発生することができる、標識とコンジュゲートされた、本明細書において提供される少なくとも1つのDLL3 VHHドメインを含むDLL3結合コンジュゲートが提供される。これらのIgSFコンジュゲートは、研究または診断用途で、例えば、がんのインビボ検出において、用いることができる。標識は好ましくは、検出可能なシグナルを直接的にまたは間接的に生じることができる。例えば、標識は、放射線不透過物もしくは放射性同位体、例えば、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I；蛍光（フルオロフォア）もしくは化学発光（クロモフォア）化合物、例えば、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、またはルシフェリン；酵素、例えば、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、もしくはホースラディッシュペルオキシダーゼ；造影剤；または金属イオンであり得る。いくつかの態様において、標識は、シンチグラフィ試験用の放射性原子、例えば、⁹⁹Tcもしくは¹²³I、または核磁気共鳴（NMR）画像法（磁気共鳴画像法、MRIとしても公知）用のスピン標識、例えば、ジルコニウム89、ヨウ素123、ヨウ素131、インジウム111、フッ素19、炭素13、窒素15、酸素17、ガドリニウム、マンガン、もしくは鉄である。ジルコニウム89は、例えばPET画像法用に、さまざまな金属キレート剤と複合体化され、抗体とコンジュゲートされてもよい（WO 2011/056983）。

20

【0282】

DLL3結合コンジュゲートは、当技術分野において公知の任意の方法を用いて調製され得る。例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるWO 2009/067800、WO 2011/133886、および米国特許出願公報第2014322129号を参照されたい。

30

【0283】

いくつかの態様において、結合は、共有結合性または非共有結合性であってもよく、例えば、ビオチン-ストレプトアビジン非共有結合性相互作用を介する。いくつかの態様において、同じまたは異なっている1、2、3、4、または5以上の部分が、DLL3 VHHドメインにコンジュゲート、連結または融合され、DLL3結合コンジュゲートを形成する。いくつかの態様において、そのような部分は、当技術分野において公知の種々の分子生物学的または化学的コンジュゲーションおよび連結方法を用いてVHHドメインに結合させることができる。いくつかの態様において、リンカー、例えば、ペプチドリナー、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、またはコンジュゲーション反応を助けるリンカーは、バリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質にエフェクター部分を連結またはコンジュゲートするために用いることができる。

40

【0284】

いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、リンカー（L）を通じて1つまたは複数の部分、例えば、1個のVHH当たり約1～約20の薬物部分にコンジュゲートされる。いくつかの態様において、DLL3結合コンジュゲートは、以下の構成成分：（VHHドメイン）、（L）_q、および（部分）_mを含み、ここで、VHHドメインは、記載されるようにDLL3に特異的に結合できる記載のVHHドメインのいずれかであり；Lは、タンパク質またはポリペプチドを部分に連結するためのリンカーであり；mは少なくとも1であり；qは0以上

50

であり；結果として生じるDLL3結合コンジュゲートはDLL3に結合する。特定の態様において、mは1～4であり、かつqは0～8である。

【0285】

リンカーは、1つまたは複数のリンカー構成成分で構成され得る。抗体および薬物部分の共有結合では、リンカーは典型的には、2つの反応性官能基、すなわち、反応性という意味では二価性、を有する。2個以上の機能性部分または生物的に活性な部分、例えば、ペプチド、核酸、薬物、毒素、抗体、ハプテン、およびレポーター基などを結合させるのに有用な二価リンカー試薬は公知であり、方法はそれらの結果として生じるコンジュゲートについて記載している（Hermanson, G. T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: New York, p 234-242）。

10

【0286】

例示的なリンカー構成成分には、6-マレイミドカプロイル（「MC」）、マレイミドプロパノイル（「MP」）、バリン-シトルリン（「val-cit」）、アラニン-フェニルアラニン（「ala-phe」）、p-アミノベンジルオキシカルボニル（「PAB」）、N-スクシンイミジル 4-（2-ピリジルチオ）ペンタノアート（「SPP」）、N-スクシンイミジル 4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1 カルボキシラート（「SMCC」）、およびN-スクシンイミジル（4-ヨード-アセチル）アミノベンゾアート（「SIAB」）が含まれる。

【0287】

いくつかの態様において、リンカーはアミノ酸残基を含んでもよい。例示的なアミノ酸リンカー構成成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、またはペンタペプチドが挙げられる。例示的なジペプチドには、バリン-シトルリン（vcまたはval-cit）、アラニン-フェニルアラニン（afまたはala-phe）が挙げられる。例示的なトリペプチドには、グリシン-バリン-シトルリン（gly-val-cit）およびグリシン-グリシン-グリシン（gly-gly-gly）が挙げられる。アミノ酸リンカー構成成分を含むアミノ酸残基には、天然に生じるもの、ならびにマイナーアミノ酸および非天然型のアミノ酸アナログ、例えばシトルリンなどが含まれる。アミノ酸リンカー構成成分は、プラスミンプロテアーゼでの、特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C、およびDによる酵素的切断に対する選択性において設計および最適化することができる。

20

【0288】

VHHドメインと細胞傷害剤とのコンジュゲートは、多種多様な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオール）プロピオナート（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデートHCl）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジル基質）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えば、ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス-（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン）、ジイソシアナート（例えば、トルエン2,6-ジイソシアナート）、およびビス活性フッ素化合物（例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）を用いて製造することができる。

30

【0289】

抗体薬物コンジュゲートは、多種多様な方法、例えば、当業者に公知の有機化学反応、条件、および試薬によって調製することができる。1つの態様において、方法には、（1）共有結合を介しての、VHH-Lを形成するための、VHHドメインの求核基と二価リンカー試薬との反応、続いての薬物部分Dとの反応；および（2）非共有結合を介しての、D-Lを形成するための、薬物部分の求核基と二価リンカー試薬との反応、続いてのVHHドメインの求核基との反応が含まれる。

40

【0290】

VHHドメインを含む抗体上の求核基には、これらに限定されないが、（i）N末端アミン基、（ii）側鎖アミン基、例えば、リジン、（iii）側鎖チオール基、例えば、システイン、および（iv）抗体がグリコシル化されている場合には、糖のヒドロキシル基またはアミノ基が含まれる。アミン基、チオール基、およびヒドロキシル基は求核性であり、（i）N

50

HSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、および酸ハライドなどの活性エステル；(ii) アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基を含む、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と共有結合を形成するように反応することができる。さらなる求核基を、アミンのチオールへの変換を生じさせるリジンと2-イミノチオラン (Traut試薬) との反応を通じて抗体内に導入することができる。反応性チオール基は、1、2、3、4、またはそれを上回るシステイン残基を導入すること (例えば、1つまたは複数の非天然型システインアミノ酸残基を含む変異体抗体を調製すること) によって、抗体 (またはその断片) 内に導入されてもよい。

【0291】

コンジュゲート、例えば抗体薬物コンジュゲートは、リンカー試薬または薬物上の求核性置換基と反応することができる求電性部分を導入する、抗体 (例えばVHHドメイン) の改変によって産生されてもよい。グリコシル化された抗体の糖は、例えば、過ヨウ素酸酸化試薬によって酸化され、リンカー試薬または薬物部分のアミン基によってもたらされ得るアルデヒドまたはケトン基を形成し得る。その結果生じるイミンSchiff塩基基は、安定な連結を形成し得るか、または例えばホウ化水素試薬によって、還元され、安定なアミン連結を形成し得る。1つの態様において、グリコシル化抗体の炭水化物部分とガラクトースオキシダーゼまたはメタ-ヨウ素ナトリウムのいずれかとの反応は、薬物上の適切な基と反応することができるタンパク質中のカルボニル (アルデヒドおよびケトン) 基をもたらし得る (Hermanson, Bioconjugate Techniques)。別の態様において、N末端セリンまたはスレオニン残基を含有するタンパク質は、メタ-ヨウ素ナトリウムと反応し、第1アミノ酸の代わりにアルデヒドの産生をもたらすことができる。そのようなアルデヒドは、薬物部分またはリンカー求核試薬と反応することができる。

【0292】

同様に、薬物部分上の求核基には、これらに限定されないが、(i) NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、および酸ハライドなどの活性エステル；(ii) アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基を含む、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と共有結合を形成するように反応することができる、アミン基、チオール基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、オキシム基、ヒドラジン基、チオセミカルバゾン基、ヒドラジンカルボキシレート基、およびアリアルヒドラジド基が含まれる。

【0293】

あるいは、VHHドメインと細胞傷害剤とを含有する融合タンパク質は、例えば、組換え技術またはペプチド合成によって、製造され得る。DNAの長さは、互いに隣接するか、またはコンジュゲートの望ましい特性を壊さないリンカーペプチドをコードする領域によって隔てられている、コンジュゲートの2つの部分をコードする各々の領域が含まれ得る。

【0294】

C. 多重特異性形式

本明細書において、DLL3に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、1つまたは複数の追加の結合ドメインとを含む、多重特異性であるDLL3結合ポリペプチドが提供される。典型的には、1つまたは複数の追加のドメインは、DLL3以外の第2の抗原またはタンパク質に結合する。いくつかの態様において、1つまたは複数の追加のドメインは、第2の抗原またはタンパク質に特異的な抗体または抗原結合断片である。いくつかの態様において、追加のドメインはVHHドメインである。

【0295】

いくつかの態様において、多重特異性DLL3結合ポリペプチドは、DLL3に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、第2の抗原またはタンパク質に結合する少なくとも1つの追加の結合ドメインとを含む。いくつかの態様において、この第2の抗原は、腫瘍関連抗原 (TAA) または腫瘍微小環境関連抗原 (TMEAA) である。いくつかの態様において、この第2の抗原は免疫調節性抗原であり、該抗原は、免疫細胞においてシグナル伝達経路を

10

20

30

40

50

強めるまたは弱めるのに関与する。

【0296】

いくつかの場合において、多重特異性DLL3結合ポリペプチドは、Fcドメイン、例えば上記のいずれかなどをさらに含むことができる。いくつかの態様において、本明細書において提供される多重特異性DLL3結合ポリペプチドは、DLL3に結合する少なくとも1つのVHHドメイン、第2の抗原またはタンパク質に結合する少なくとも1つの追加の結合ドメイン、およびFcドメイン。いくつかの態様において、Fcドメインは、DLL3および追加の抗原またはタンパク質に対する結合部位の数を2倍にする二量体が形成されるような生理的条件下で多重特異性DLL3結合ポリペプチドの二量体化を媒介する。

【0297】

非限定的で例示的な多重特異性DLL3結合ポリペプチドを以下に説明する。

【0298】

1. 二重特異性T細胞エンゲージャー

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、本明細書において提供される少なくとも1つのDLL3 VHHドメインおよびT細胞上に発現している表面分子に結合できる少なくとも1つの追加の結合分子であるかまたはこれらを含む、二重特異性構築物である。いくつかの態様において、表面分子は、T細胞の活性化構成成分、例えば、T細胞受容体複合体の構成成分である。特定の局面において、表面分子は、T細胞上に発現している活性化T細胞抗原であり、抗原結合分子との相互作用時にT細胞活性化を誘導することができる。例えば、いくつかの局面において、抗原結合分子と活性化T細胞抗原との相互作用は、T細胞受容体複合体のシグナル伝達カスケードを誘発することによってT細胞活性化を誘導し得る。T細胞活性化を測定するのに適したアッセイは公知であり、増殖、分化、サイトカイン分泌、細胞傷害性活性、および/または1つもしくは複数の活性化マーカーの発現を測定または評価するための任意のアッセイを含む。いくつかの態様において、その標的の両方である、標的細胞上に発現しているDLL3およびT細胞上に発現しているT細胞分子（例えば、活性化T細胞抗原）に対するそのようなDLL3結合ポリペプチドの、同時またはほぼ同時の結合は、標的細胞とT細胞との間に一時的な相互作用をもたらすことができ、それにより、T細胞の活性化、例えば、細胞傷害性活性、続いての標的細胞の溶解をもたらす。

【0299】

いくつかの態様において、T表面分子、例えば活性化T細胞抗原は、CD3であるか、またはCD2である。特に、提供される二重特異性DLL3結合ポリペプチドは、ヒトT細胞上に発現している活性化T細胞抗原、例えばヒトCD3またはヒトCD3に、特異的に結合することができる。特定の局面において、活性化T細胞抗原（例えば、CD3またはCD2）に特異的である追加の結合ドメインは、抗体または抗原結合断片である。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、DLL3に特異的に結合する少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、およびT細胞の活性化構成成分（例えば、T細胞表面分子、例えば、CD3またはCD2）に特異的な抗体または抗原結合断片である追加の結合分子を含む、二重特異性抗体T細胞エンゲージャーであり得る。

【0300】

二重特異性抗体T細胞エンゲージャーは、可動性リンカーによって融合されたタンデムなscFv分子（例えば、Nagorsen and Bauerle, Exp Cell Res 317, 1255-1260 (2011)を参照；例えば可動性リンカーを介して、相互に融合され、かつ安定な会合が可能な第1のおよび第2のサブユニットで構成されたFcドメインをさらに含む、タンデムなscFv分子（WO2013026837）；タンデムなダイアボディを含む、ダイアボディおよびその誘導体（Holliger et al, Prot Eng 9, 299-305 (1996); Kipriyanov et al, J Mol Biol 293, 41-66 (1999)）；C末端ジスルフィド架橋を有するダイアボディ形式を含み得る二重親和性再標的指向（DART）分子；またはハイブリッドマウス/ラットIgG分子全体を含むトリオマブ（Seimetz et al, Cancer Treat Rev 36, 458-467 (2010)）を含む、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）分子である。上記分子のいずれかの同様の形式は

10

20

30

40

50

、本明細書において提供されるDLL3 VHHドメインのいずれかを用いて作製することができる。

【0301】

いくつかの態様において、活性化T細胞抗原に特異的な追加の結合ドメインは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、ジスルフィド安定化Fv断片(dsFv)、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体(VHH)、またはシングルドメイン軽鎖抗体から選択される抗原結合断片である。いくつかの態様において、追加の結合ドメインは、活性化T細胞抗原、例えばCD2またはCD3への結合について一価である。

【0302】

いくつかの態様において、追加の結合ドメインは、CD3またはCD3複合体に結合することができる。CD3複合体は、相互にかつT細胞受容体と非共有結合的に会合する、成熟Tリンパ球における少なくとも5つの膜結合型ポリペプチドの複合体である。CD3複合体には、 α 、 β 、 γ 、および δ 鎖(サブユニットとも呼ばれる)が含まれる。いくつかの態様において、追加の結合分子は、CD3またはCD3複合体に特異的に結合できる抗体または抗原結合断片であり、CD3結合ドメインとも呼ばれる。いくつかの態様において、CD3またはCD3複合体に結合できるCD3結合ドメインには、抗CD3 Fab断片、抗CD3 F(ab')₂断片、抗CD3 Fv断片、抗CD3 scFv、抗CD3 dsFv、抗CD3 scAb、抗CD3 dAb、抗CD3シングルドメイン重鎖抗体(VHH)、および抗CD3シングルドメイン軽鎖抗体の1つまたは複数のコピーが含まれる。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインは、CD3への結合について一価である。

【0303】

いくつかの場合において、CD3結合ドメインはCD3 δ 鎖を認識する。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインには、抗CD3 Fab断片、抗CD3 F(ab')₂断片、抗CD3 Fv断片、抗CD3 scFv、抗CD3 dsFv、抗CD3 scAb、抗CD3 dAb、抗CD3シングルドメイン重鎖抗体(VHH)、および抗CD3シングルドメイン軽鎖抗体の1つまたは複数のコピーが含まれる。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインはCD3 δ への結合について一価である。

【0304】

CD3またはCD3複合体に対する例示的なモノクローナル抗体としては、これらに限定されないが、OKT3、SP34、UCHT1もしくは64.1、またはその抗原結合断片が挙げられる(例えば、June, et al., J. Immunol. 136:3945-3952 (1986); Yang, et al., J. Immunol. 137:1097-1100 (1986);およびHayward, et al., Immunol. 64:87-92 (1988)を参照)。いくつかの局面において、例えば、固定化されたまたは細胞に局在したまたは繋がれた抗CD3抗体による、T細胞上でのCD3のクラスター形成は、T細胞受容体のエンゲージメントに類似するが、そのクローン典型的な特異性とは非依存的な、T細胞活性化をもたらす。1つの態様において、CD3結合ドメインは、CD3抗原に一価かつ特異的に結合し、かつOKT3(ORTHOCLONE-OKT3(商標)(ムロモナブ-CD3));ヒト化OKT3(米国特許第7,635,475号および公開国際出願第WO2005040220号);SP34((Pessano et al. The EMBO Journal. 4: 337-344, 1985);SP34のヒト化バリエーション(WO2015001085);Teplizumab(商標)(MGA031, Eli Lilly);US2011/0275787に記載の抗CD3結合分子;UCHT1(Pollard et al. 1987 J Histochem Cytochem. 35(11):1329-38;WO2000041474);NI0401(WO2007/033230);ビジリズマブ(米国特許第5,834,597号);BC-3(Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992));H2C(PCT公報第WO2008/119567号に記載);V9(Rodrigues et al., Int J Cancer Suppl 7, 45-50 (1992)および米国特許第6,054,297号に記載)に由来する。国際公開PCT出願第WO199404679号、同第WO2008119567号、同第WO2015095392号、同第WO2016204966号、同第WO2019133761号;公開特許出願第US20170369563号、同第US20180194842号、同第US20180355038号;米国特許第7,728,114号、同第7,381,803号、同第7,994,289号に記載のいずれかを含む、他の抗CD3抗体もまた、本明細書において提供される構築物において用いることができる。

10

20

30

40

50

【 0 3 0 5 】

いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO : 19に記載の可変重(VH)鎖および/もしくはSEQ ID NO : 20に記載の可変軽鎖、またはこれらの配列に対して少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を有するVHおよび/もしくはVL配列を含み、かつCD3に特異的に結合する。いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO : 19に記載の可変重(VH)鎖のCDRH1、CDRH2、およびCDRH3、ならびにSEQ ID NO : 20に記載の可変軽鎖のCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む。いくつかの場合において、CD3結合領域は、SEQ ID NO : 19に記載のVH配列のヒト化バージョンおよびSEQ ID NO : 20に記載のVL配列のヒト化バージョンを含む。いくつかの態様において、CD3結合領域は、SEQ ID NO : 21 ; 22 ; 23のいずれか1つに記載のヒト化OKT3由来のVHドメイン配列および/もしくはSEQ ID NO : 24、25、26のいずれか1つに記載のVLドメイン配列、またはこれらの配列に対して少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を有するVHおよび/もしくはVL配列を含むことができ、かつCD3に特異的に結合する。いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、上記VHおよびVL配列のいずれかの組み合わせ、特に、SEQ ID NO : 21、22、23のいずれかに記載のVH配列とSEQ ID NO : 24、25、26のいずれかに記載のVL配列とのいずれかの組み合わせがその中に含まれている、Fab、scFv、Fv、またはdsFvである。

10

【 0 3 0 6 】

いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、
少なくともアミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO : 29)を含むVH CDR1配列 ;
少なくともアミノ酸配列
RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30)

20

を含むVH CDR2配列 ;
少なくともアミノ酸配列
HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

を含むVH CDR3配列 ;
少なくともアミノ酸配列
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

30

を含むVL CDR1配列 ;
少なくともアミノ酸配列 GTNKRAP (SEQ ID NO : 33)を含むVL CDR2配列 ; および
少なくともアミノ酸配列 ALWYSNLWV (SEQ ID NO : 34)を含むVL CDR3配列
を含む。いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、
少なくともアミノ酸配列 TYAMN (SEQ ID NO : 29)を含むVH CDR1配列 ;
少なくともアミノ酸配列
RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30)

40

を含むVH CDR2配列 ;
少なくともアミノ酸配列
HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

を含むVH CDR3配列 ;
少なくともアミノ酸配列
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

を含むVL CDR1配列 ;
少なくともアミノ酸配列 GTNKRAP (SEQ ID NO : 33)を含むVL CDR2配列 ; および

50

少なくともアミノ酸配列 ALWYSNLWV (SEQ ID NO : 34) を含むVL CDR3配列がその中に含まれている、Fab、scFv、Fv、またはdsFvである。

【0307】

いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO : 27に記載の可変重 (VH) 鎖および/もしくはSEQ ID NO : 28に記載の可変軽鎖、またはこれらの配列に対して少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を有するVHおよび/もしくはVL配列を含み、かつCD3に特異的に結合する。いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO : 27に記載の可変重 (VH) 鎖のCDRH1、CDRH2、およびCDRH3、ならびにSEQ ID NO : 28に記載のCDRL1、CDRL2、およびCDRL3可変軽鎖を含む。いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO : 29、30、および31それぞれに記載のCDRH1、CDRH2、およびCDRH3、ならびにSEQ ID NO : 32、33、および34それぞれに記載のCDRL1、CDRL2、およびCDRL3可変軽鎖を含む。いくつかの場合において、CD3結合領域は、SEQ ID NO : 27に記載のVH配列のヒト化バージョンおよびSEQ ID NO : 28に記載のVL配列のヒト化バージョンを含む。いくつかの態様において、CD3結合領域は、SEQ ID NO : 35 ~ 65、453、454、もしくは460のいずれか1つに記載のヒト化VHドメイン配列、および/またはSEQ ID NO : 66 ~ 84、368、451、もしくは452のいずれか1つに記載のVLドメイン配列、またはこれらの配列に対して少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を有するVHおよび/もしくはVL配列を含むことができ、かつCD3に特異的に結合する。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO : 47のアミノ酸配列を含む可変重鎖 (VH) およびSEQ ID NO : 75のアミノ酸配列を含む可変軽鎖 (VL) を含む。

【0308】

いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、上記VHおよびVL配列の任意の組み合わせ、特に、SEQ ID NO : 35 ~ 65、453、454、または460のいずれかに記載のVH配列とSEQ ID NO : 66 ~ 84、368、451、または452のいずれかに記載のVL配列との任意の組み合わせがその中に含まれている、Fab、scFv、Fv、またはdsFvである。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインは、SEQ ID NO : 47のアミノ酸配列を含む可変重鎖 (VH) およびSEQ ID NO : 75のアミノ酸配列を含む可変軽鎖 (VL) がその中に含まれている、Fab、scFv、Fv、またはdsFvである。

【0309】

いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO : 519、520、523、または524に記載の可変重 (VH) 鎖を含む。いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO : 521、522、525、または526に記載の可変軽 (VL) 鎖を含む。

【0310】

提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、および活性化T細胞抗原に特異的な少なくとも1つの追加のドメイン、例えばCD3結合ドメインを含むいくつかの形式のいずれかの形式で作製することができる。

【0311】

1つの態様において、二重特異性構築物は、T細胞活性化抗原、例えば、CD3に特異的なFab抗原結合断片、例えば抗CD3 Fabに直接的または間接的に連結された、記載されるような少なくとも1つのDLL3 VHHドメインを含む、二重特異性シングルドメイン抗体連結Fab (S-Fab) である。T細胞活性化抗原に対するFab、例えば抗CD3 Fabは、記載されるようなVHおよびVL配列のいずれかを含み得る。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、抗CD3 FabのVHまたはVL鎖のC末端に連結される。いくつかの態様において、S-Fabは、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド (HPMA) コポリマー、タンパク質 (アルブミンなど)、ポリグルタミン酸とのコンジュゲーションまたはPAS化によって、さらに改変することができる (Pan et al . (2018) International Journal of Nanomedicine, 2018:3189-3201)。

【0312】

別の態様において、二重特異性構築物は、構築物が、T細胞活性化抗原、例えばCD3に

特異的な抗原結合ドメインのVHおよびVLを含むscFvに直接的または間接的に連結された、記載されるような少なくとも1つのDLL3 VHHをその中に含む、scFv-シングルドメイン抗体である。T細胞活性化抗原に対するscFv、例えば、抗CD3 scFvは、記載されるようなVHおよびVL配列のいずれかを含むことができる。いくつかの態様において、VHHドメインおよびscFvは、ペプチドリinkerなどのリンカーによって連結される。いくつかの態様において、ペプチドリinkerは、本明細書において記載されるようなペプチドリinkerであり得る。いくつかの態様において、VHHドメインおよびscFvは、任意でヒンジ領域またはリンカー（例えば、ペプチドリinker）を通じて、Fc領域、例えばFc領域のN末端にそれぞれ連結される。Fc領域は、本明細書において記載されるいずれか、例えば、ヒトFc領域またはそのバリエーション、例えば、ヒトIgG1 Fc領域またはそのバリエーションであり得る。特定の例において、Fc領域は、異なるポリペプチドを二量体化し、ヘテロ二量体を得ることができるヘテロ二量体化を促進するように変異または改変されているバリエーション Fcドメイン、例えば、バリエーションヒトIgG1ドメインによって形成される。

【0313】

さらなる態様において、CD3結合ドメインは、シングルドメイン抗体であり、例えば、CD3に特異的に結合するVHHドメインである。CD3に結合する、VHHドメインを含むシングルドメイン抗体は公知であり、例えば、公開米国特許出願第US20160280795号を参照されたい。いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO: 85に記載の抗CD3 VHH、またはSEQ ID NO: 85に対して少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を示し、かつCD3に特異的に結合する配列である。そのような局面において、本明細書において提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインおよび少なくとも1つの CD3 VHHドメインを含み得る。構築物のフォーマット化では、いくつかの場合において、各VHHドメインは、任意でヒンジ領域またはリンカー（例えば、ペプチドリinker）を通じて、Fc領域、例えばFc領域のN末端に連結される。Fc領域は、本明細書において記載されるいずれか、例えば、ヒトFc領域またはそのバリエーション、例えば、ヒトIgG1 Fc領域またはそのバリエーションであり得る。特定の例において、Fc領域は、異なるポリペプチドを二量体化し、ヘテロ二量体を得ることができるヘテロ二量体化を促進するように変異または改変されているバリエーション Fcドメイン、例えば、バリエーションヒトIgG1ドメインによって形成される。

【0314】

上記態様において、ヘテロ二量体化を促進するFc領域の例示的改変は公知であり、以下、例えば表3に記載されるいずれかを含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 103、107、115、117、440、または446のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcのもう一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 104、108、111、113、119、121、441、444、または448のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含み、いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 105、109、116、118、442、または447のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcのもう一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 106、110、112、114、120、122、443、445、または449のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含む。

【0315】

2. 制約付きCD3多重特異性構築物

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、制約付きT細胞エンゲージング融合タンパク質である多重特異性ポリペプチド構築物である。特定の局面において、本明細書において提供される制約付き多重特異性構築物は、CD3などの活性化T細胞抗原、およびDLL3に結合する。本明細書において提供される制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、免疫グロブリンFc領域を含む第1の構成成分、CD3に結合する少なくとも1つの結合ドメインの1つまたは複数のコピーを含む第2の構成成分（本明細書において抗CD3結合ドメインまたはCD3結合ドメインと呼ばれ、これらは本明細書において互換的に用いられる）、ならびに第1の構成成分と第2の構成成分とを連結するリンカー、例えばポリペプチド

リンカーを少なくとも含む。提供される多重特異性ポリペプチド構築物において、第1のおよび第2の構成成分の一方または両方は、抗原への結合によってエンゲージされると、制約付きCD3結合領域が実質的にCD3に結合できるようになる、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインを含む。図3A～3Eは、制約付き多重特異性構築物の例示的な形式を図示する。

【0316】

いくつかの態様において、本明細書において提供される制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3に結合しその後T細胞を活性化する能力の観点で2つの状態で存在する：(1) DLL3に対する抗原結合ドメインのいずれかまたは全ての結合が存在しないときに、「不活性」状態が生じ、CD3結合が制約されかつT細胞相互作用が抑えられるかまたは低下される；および、(2) 抗原結合ドメインのいずれかまたは全てによる抗原結合時に、「活性」状態が生じ、CD3結合領域がCD3に結合できかつT細胞相互作用が可能になる。

10

【0317】

いくつかの態様において、Fc領域は、1つまたは複数のリンカーを介してCD3結合ドメインに連結される。いくつかの態様において、Fc領域は、1つまたは複数の切断不可能なリンカーを介してCD3結合領域に連結される。いくつかの態様において、Fc領域は、切断可能なリンカーまたは1つもしくは複数の他の不安定なリンカーを介してCD3結合領域に連結される。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、プロテアーゼの存在下で特異的に切断することができるリンカーである。いくつかの局面において、切断可能なリンカーの切断後に、増強されたCD3結合が生じる。いくつかのそのような局面において、「活性」状態は、CD3結合領域とFc領域とを連結するリンカーの切断を含む、複数のメカニズムを介して、さらに増幅させることができる。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、プロテアーゼの基質認識部位を含むリンカーである。Fc領域およびCD3結合領域が切断可能なリンカーによって連結されているいくつかの態様において、リンカー内の切断後、増強されたCD3結合が生じ得る。

20

【0318】

さらに、Fc領域およびCD3結合領域が切断可能なリンカーによって機能的に連結されている局面において、Fc領域とCD3結合領域との間のリンカーの切断は、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物を、第1の構成成分および第2の構成成分に分離し得る。制約付き多重特異性ポリペプチド構築物の構成に応じて、第1の構成成分および第2の構成成分は、異なる機能性を有してもよい。いくつかの態様において、Fc領域は、1つまたは複数のエフェクター機能、例えば、ADCC、CDC、またはADCP機能を示す領域である。そのような例において、本開示の制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、自己増幅システムを生成するために用いることができる。例えば、いくつかの局面において、FcとCD3結合ドメインの構成成分との間へのプロテアーゼ切断可能なリンカーの組み込みは、CD3結合ドメインの完全な露出を可能にすることによって、T細胞活性化能の増幅を可能にする。含まれる特定のリンカーに応じて、増幅工程は、腫瘍関連プロテアーゼまたは抗原依存性T細胞活性化後に放出されるグランザイムによって媒介され得る。腫瘍プロテアーゼが切断可能なリンカーが含まれる場合、増幅は、腫瘍または腫瘍微小環境によって媒介される。それに対して、グランザイムBが切断可能なリンカーが含まれる場合、増幅は、抗原依存性活性化後にT細胞によって自己媒介され得る。さらに、エフェクター可能なFcが構築物中に含まれている場合において、増幅は、ADCCメカニズムを通じて生じるNK細胞から放出されたグランザイムによって媒介され得る。

30

40

【0319】

提供される制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域を含む第1の構成成分が、CD3結合領域を含む第2の構成成分のN末端にある立体配置を含む。そのような態様において、第1のおよび第2の構成成分は、Fc領域の末端に対してC末端にあるリンカーを介して連結される。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、多重特異性ポリペプチド構築物のアミノ末端(N末端)領域に位置づけられる。いくつかの態様において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、多重特異性ポリペプチド構築物の

50

カルボキシ末端（C末端）領域に位置づけられる。いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、多重特異性ポリペプチド構築物のNおよびC末端領域の両方に位置づけられた少なくとも2つのDLL3 VHHドメインを含む。

【0320】

いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、二量体化が、2本のポリペプチド鎖間の共有結合性または非共有結合性の相互作用によって形成されている、二量体である。いくつかの態様において、2本のポリペプチド鎖は、例えば、鎖間ジスルフィド結合によって、相互に共有結合的に結合される。いくつかの態様において、Fc領域は、鎖間ジスルフィド結合を介して二量体化を媒介する。特定の態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、いくつかの場合では、多重特異性ポリペプチド構築物のポリペプチド鎖が異なっている（ヘテロ二量体）、ヘテロ二量体Fc領域を含む。ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の特定の例において、CD3結合領域は、VHおよびVL鎖を含む2本鎖ポリペプチドであり、例えば、VHおよびVLを含むFv抗体断片である。いくつかの態様において、Fv抗体断片は、ジスルフィド安定化抗CD3結合 Fv断片（dsFv）を含む。

10

【0321】

いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー（例えば、切断可能なまたは切断不可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）のVHドメインを含む第1のポリペプチドと；ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー（例えば、切断可能なまたは切断不可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）のVLドメインを含む第2のポリペプチドとを含む、2つのポリペプチドから形成されるかまたはそれらを含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、DLL3に結合する1つまたは2つのVHHドメインを含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、DLL3に結合する1つまたは2つのVHHドメインを含む。いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも2つのDLL3 VHHドメインを含む。いくつかの場合において、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、FcポリペプチドのN末端に位置し、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、CD3結合領域の鎖のC末端に位置する。

20

【0322】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドもしくは第2のポリペプチドまたは第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの両方は、共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）を含む。いくつかの態様において、第1のおよび/または第2のポリペプチドのCRBRは、FcポリペプチドのN末端、および/またはCD3結合領域の鎖のC末端に位置し得る。

30

【0323】

いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、DLL3に結合する少なくとも2つのVHHドメインおよび共刺激受容体に結合する少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）をさらに含む。いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、（1）N末端からC末端の順に：第1のDLL3 VHHドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー（例えば、切断可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、FvまたはdsFv）の鎖（例えば、VHまたはVL）、および第2のDLL3 VHHドメインを含む、第1のポリペプチド；ならびに（2）N末端からC末端の順に：ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、同じリンカー（例えば、同じ切断可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片のもう一方の鎖（別のVHまたはVL）、および共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）を含む、第2のポリペプチドを含む。

40

【0324】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドもしくは第2のポリペプチドまたは第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの両方は、抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）をさらに含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドおよび/

50

または第2のポリペプチドのIRBRは、FcポリペプチドのN末端および/またはCD3結合領域の鎖のC末端に位置し得る。

【0325】

いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、DLL3に結合する少なくとも2つのVHHドメインおよび抑制性受容体に結合する少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）を含む。いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、（1）N末端からC末端の順に：第1のDLL3 VHHドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー（例えば、切断可能なまたは切断不可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、FvまたはdsFv）の鎖（例えば、VHまたはVL）、および第2のDLL3 VHHドメインを含む、第1のポリペプチド；ならびに（2）N末端からC末端の順に：ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、同じリンカー（例えば、同じ切断可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片のもう一方の鎖（別のVHまたはVL）、および抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）を含む、第2のポリペプチドを含む。

10

【0326】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドの少なくとも1つは、共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）をさらに含み、第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドの少なくとも1つは、抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）をさらに含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドおよび/または第2のポリペプチドのCRBRは、FcポリペプチドのN末端および/またはCD3結合領域の鎖のC末端に位置づけられ得る。いくつかの態様において、第1のおよび/または第2のポリペプチドのIRBRは、FcポリペプチドのN末端および/またはCD3結合領域の鎖のC末端に位置づけられ得る。

20

【0327】

いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、DLL3に結合する少なくとも2つのVHHドメイン、共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）、および抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）を含む。いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、（1）N末端からC末端の順に：第1のDLL3 VHHドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー（例えば、切断可能なまたは切断不可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、FvまたはdsFv）の鎖（例えば、VHまたはVL）、および第2のDLL3 VHHドメインを含む、第1のポリペプチド；ならびに（2）N末端からC末端の順に：IRBRまたはCRBRの一方、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、同じリンカー（例えば、同じ切断可能なまたは切断不可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片のもう一方の鎖（別のVHまたはVL）、およびIRBRまたはCRBRのもう一方を含む、第2のポリペプチドを含む。

30

【0328】

本開示の多重特異性ポリペプチド構築物の構成成分のそれぞれは、以下により詳細に記載される。

【0329】

a. DLL3 VHH抗原結合ドメイン

本開示の制約多重特異性ポリペプチド構築物は、本明細書中に提供された任意のもののうちの少なくとも1つのDLL3 VHHドメインを含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:244～318のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:244～318、401～409、416、または455のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、SEQ ID NO:102、244～318、401～409、416、455、および476～480～488、507～518のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

40

【0330】

50

具体的な態様において、制約多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも2つのDLL3ドメインを含有する。いくつかのケースにおいて、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、ヘテロ二量体FcのFcポリペプチドに対してアミノ末端に位置付けられており、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、CD3結合領域のVH鎖またはVL鎖に対してカルボキシ末端に位置付けられている。

【0331】

少なくとも2つのDLL3 VHHドメインを含有するか、または2つのDLL3 VHHドメインを含有する制約多重特異性ポリペプチド構築物の局面において、DLL3 VHHドメインの各々は、DLL3上の同一のまたは重複するエピトープと結合してもよい。

【0332】

少なくとも2つのDLL3 VHHドメインを含有するか、または2つのDLL3 VHHドメインを含有する制約多重特異性ポリペプチド構築物の局面において、DLL3 VHHドメインの各々は、DLL3上の別個のまたは重複しないエピトープと結合してもよい。

【0333】

いくつかの態様において、第1および第2のDLL3 VHHドメインは、DLL3の別個のもしくは重複しないエピトープと結合し、かつ/またはDLL3との結合について競合しない。

【0334】

いくつかのケースにおいて、第1のsdAb VHHドメインは、264、287、299、306、もしくは318のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、または264、287、299、306、もしくは318に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合し；第2のsdAb VHHドメインは、244、258、275、280、314、316、もしくは317のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、または244、258、275、280、314、316、もしくは317のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

【0335】

いくつかのケースにおいて、第1のVHHドメインは、SEQ ID NO:251、264、267、268、287、299、306、314、318、455、507、517のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO:251、264、267、268、287、299、306、314、318、455、507、517のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合し；第2のVHHドメインは、SEQ ID NO:244、251、258、267、275、280、314、315、316、317、318、455、515、516、517、518のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO:244、251、258、267、275、280、314、315、316、317、318、455、515、516、517、518のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する。

【0336】

いくつかのケースにおいて、第1のsdAb VHHドメインは、SEQ ID NO:264に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:265～455のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:287、もしくはSEQ ID NO:288～298のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:299、もしくはSEQ ID NO:300～305のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:306、もしくはSEQ ID NO:307～313のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO:318を含み；第2のsdAb VHHドメインは、SEQ ID NO:244に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:2

10

20

30

40

50

58、もしくはSEQ ID NO:259～263のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:275、もしくはSEQ ID NO:276～279のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:280、もしくはSEQ ID NO:281～286のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:314、SEQ ID NO:316、またはSEQ ID NO:317を含む。

【0337】

いくつかのケースにおいて、第1のVHHドメインは、SEQ ID NO:264に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:265～274、416、455、もしくは476～478のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:287、もしくはSEQ ID NO:102、288～298のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:299、もしくはSEQ ID NO:300～305もしくは480のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:306、もしくはSEQ ID NO:307～313のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:507、もしくはSEQ ID NO:508～514のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:318、またはSEQ ID NO:517を含み；第2のVHHドメインは、SEQ ID NO:244に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:258、もしくはSEQ ID NO:259～263のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:275、もしくはSEQ ID NO:276～279もしくは479のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:280、もしくはSEQ ID NO:281～286のうちのいずれかに示されるそのヒト化バリエーション、SEQ ID NO:314、SEQ ID NO:316、SEQ ID NO:515、SEQ ID NO:516、またはSEQ ID NO:317を含む。

【0338】

いくつかの態様において、第1のsdAb VHHドメインおよび第2のsdAb VHHドメインは、SEQ ID NO:244およびSEQ ID NO:264；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:318；SEQ ID NO:244およびSEQ ID NO:306；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:306；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:299；SEQ ID NO:251およびSEQ ID NO:268；SEQ ID NO:251およびSEQ ID NO:267；SEQ ID NO:275およびSEQ ID NO:318；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:287；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:264；SEQ ID NO:316およびSEQ ID NO:318；SEQ ID NO:317およびSEQ ID NO:318；またはSEQ ID NO:244およびSEQ ID NO:318より選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、第1のsdAb VHHドメインおよび第2のsdAb VHHドメインは、SEQ ID NO:315およびSEQ ID NO:318に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、第1のsdAb VHHドメインおよび第2のsdAb VHHドメインは、SEQ ID NO:251およびSEQ ID NO:455に示されるアミノ酸配列を含む。

【0339】

いくつかの態様において、第1のVHHドメインおよび第2のVHHドメインは、SEQ ID NO:244およびSEQ ID NO:264；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:318；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:517；SEQ ID NO:244およびSEQ ID NO:306；SEQ ID NO:244およびSEQ ID NO:507；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:306；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:507；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:299；SEQ ID NO:251およびSEQ ID NO:268；SEQ ID NO:251およびSEQ ID NO:267；SEQ ID NO:275およびSEQ ID NO:318；275およびSEQ ID NO:517；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:287；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:264；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:314；SEQ ID NO:315およびSEQ ID NO:264；SEQ ID NO:518およびSEQ ID NO:264；SEQ ID NO:316およびSEQ ID NO:318；SEQ ID NO:515およびSEQ ID NO:517；SEQ ID NO:318およびSEQ ID NO:318；SEQ ID NO:517およびSEQ ID NO:517；SEQ ID NO:317およびSEQ ID NO:318；SEQ ID NO:516およびSEQ ID NO:517；SEQ ID NO:251およびSEQ ID NO:455；SEQ ID NO:244およびSEQ ID NO:517；またはSEQ ID NO:244およびSEQ ID NO:318より選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、第1のVHHドメインおよび第2のVHHドメインは、SEQ ID NO:315およびSEQ ID N

O:318に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、第1のVHHドメインおよび第2のVHHドメインは、SEQ ID NO:518およびSEQ ID NO:517に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、第1のVHHドメインおよび第2のVHHドメインは、SEQ ID NO:251およびSEQ ID NO:455に示されるアミノ酸配列を含む。

【0340】

いくつかの態様において、制約多重特異性ポリペプチド構築物は、本明細書中に提供された任意のもののような少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、および他の腫瘍関連抗原(TAA)に特異的な少なくとも1つのさらなる抗原結合ドメインを含有する。いくつかの態様において、少なくとも1つのさらなる抗原結合ドメインは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片の1コピーまたは複数コピーを含む。具体的な態様において、さらなるTAA抗原結合ドメインは、単鎖抗体である。いくつかの例において、単鎖は、scFv、scAb、シングルドメイン重鎖抗体、またはシングルドメイン軽鎖抗体である。例えば、いくつかのケースにおいて、さらなるTAA抗原結合ドメインは、1つまたは複数のシングルドメイン抗体(sdAb)断片、例えば、V_HH、V_{NAR}、操作されたV_Hドメイン、または操作されたV_Kドメインを含む。V_HHは、天然のラクダ科動物の重鎖のみの抗体から、重鎖のみの抗体を産生する遺伝子改変されたげっ歯類から、またはナープ/合成のラクダ科動物もしくはヒト化ラクダ科動物シングルドメイン抗体ライブラリーから生成され得る。V_{NAR}は、軟骨魚類の重鎖のみの抗体から生成され得る。界面操作および特異的な生殖系列ファミリーの選択を含む様々な方法が、従来のヘテロ二量体V_HドメインおよびV_Kドメインから単量体sdAbを生成するために実施されている。

【0341】

いくつかの態様において、さらなるTAAは、1-92-LFA-3、5T3、4インテグリン、Vインテグリン、4 1インテグリン、4 7インテグリン、AGR2、抗ルイスY、アペリンJ受容体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5補体、C-242、CA9、CA19-9(ルイスa)、炭酸脱水酵素9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132(IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5(CEA)、CEACAM6(NCA-90)、クローディン3、クローディン4、cMet、コラーゲン、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、エンドセリンB受容体(ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSVのFタンパク質、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、葉酸受容体(FR)、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-CSF、GM-CSFR、GP IIb/IIIa受容体、Gp130、GPIIB/IIIA、GPNMB、GRP78、HER2/neu、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、ヒアルロニダーゼ、ICOS、IFN γ 、IFN α 、IFN β 、IgE、IgE受容体(Fc ϵ R1)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12R α 1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27/IL27R(wsx1)、IL29、IL-31R、IL31/IL31R、IL2R、IL4、IL4R、IL6、IL6R、インスリン受容体、ジャギド(Jagged)リガンド、ジャギド1、ジャギド2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、ルイスX、LIGHT、LRP4、LRRc26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、メソテリン、MRP4、MUC1、ムチン16(MUC16、CA-125)、Na/K ATPアーゼ、NGF、ニカストリン(Nicestrin)、ノッチ受容体、ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFR α 、PDGFR β 、PD-1、PD-L1、PD-L2、ホスファチジルセリン、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、スフィンゴシン1リン酸、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGF β 、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNF α 、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、トランスフェリン

、トランスフェリン受容体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2、およびWISP-3からなる群より選択される。

【0342】

いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインのような抗原結合ドメインは、直接、またはリンカーを介して間接的に、Fc領域および/またはCD3結合領域に連結されている。

いくつかの態様において、連結は、リンカーを介している。いくつかの態様において、リンカーは、記載される可動性または非可動性のリンカーを含み得る連結ペプチド(LP)である。いくつかの態様において、リンカーは、

GGSGGS, 即ち, (GGS)₂ (SEQ ID NO: 1); GGSGSGGS, 即ち, (GGS)₃ (SEQ ID

10

NO: 2); GGSGSGSGSGGS, 即ち, (GGS)₄ (SEQ ID NO: 3); および GGSGSGSGSGSGGS, 即ち, (GGS)₅ (SEQ ID NO: 4)

からなる群より選択される。いくつかの態様において、リンカーは、非限定的な例として、GG, GGG, GGGG (SEQ ID NO: 5), GGGGG (SEQ ID NO: 6), および

GGGGGG (SEQ ID NO: 7)

のようなグリシン残基を含む可動性リンカーである。いくつかの態様において、リンカーは、(GGGGS)_n (nは1~5である) (SEQ ID NO:123); (GGGGGS)_n (nは1~4である) (SEQ ID NO:124);

20

GGGGS (SEQ ID NO:125); GGGGGS

(SEQ ID NO:126); GGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:127); GGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ

ID NO:128); または GGS GG GGS GG GGS GG GGS (SEQ ID NO:129)

である。いくつかの態様において、リンカーは、GSリンカーとグリシンリンカーとの組み合わせを含む。

【0343】

b. Fc領域

30

制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、免疫グロブリンFc領域を含む。概して、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、それぞれがFcを含むポリペプチドによって形成される、二量体である。Fcポリペプチドは、上記に記載されたいずれかであり得る。特定の態様において、Fc領域は、異なるポリペプチドを二量体化してヘテロ二量体を得ることができるヘテロ二量体化を促進するように変異または改変されているFcドメインによって、形成される。したがって、いくつかの態様において、二量体は、多重特異性ポリペプチド構築物の2本のポリペプチド鎖が異なっているヘテロ二量体である。

【0344】

相補的Fcポリペプチドのヘテロ二量体化を促進するためのさまざまな方法が公知であり、例えば、Ridgway et al, Protein Eng. 9:617-621 (1996); Merchant et al, Nat. Biotechnol. 16(7): 677-81 (1998); Moore et al. (2011) MAbs, 3:546-57; Von Kreudenstein et al. MAbs, (2013) 5:646-54; Gunasekaran et al. (2010) J. Biol. Chem., 285:19637-46; Leaver-Fay et al. (2016) Structure, 24:641-51; Ha et al. (2016) Frontiers in Immunology, 7:1; Davis et al. (2010) Protein Eng Des Sel, 23:195-202; 公開国際PCT出願第WO 1998/050431号、同第WO 2009/089004号、同第WO2011143545号、同第WO 2014/067011号、同第WO 2012/058768号、同第WO2018027025号; 公開米国特許出願第US20140363426号、同第US20150307628号、同第US20180016354号、同第US20150239991号; ならびに米国特許第US5731168号、同第US7183076号、同第US9701759号、同第US9605084号、および同第US9650446号を参照されたい。Fc鎖のヘテロ二量体化を促進する方法は、例え

40

50

ば、「ノブイントゥホール」変異のセットを含むこと、または異なるポリペプチド鎖間の引力相互作用に有利なFcの静電的ステアリングをもたらす変異を含むことによる、Fc領域の変異誘発を含む。例えば、いくつかの態様において、ヘテロ二量体のFcポリペプチドは、Fc二量体界面間での帯電極性を変更する変異を含み、静電的に整合したFc鎖の同時発現は、好適な引力相互作用を支持し、それによって望ましいFcヘテロ二量体形成を促進するのに対して、好ましくない反発的電荷相互作用は、望ましくないFcホモ二量体形成を抑制する（(Guneskaran et al. (2010) JBC, 285: 19637-19646)。細胞中で同時発現されると、鎖間の会合が可能になるが、これらの鎖は、電荷反発のために実質的に自己会合しない。ヘテロ二量体Fcを作製するための他の戦略には、ヒトIgGおよびIgA CH3ドメインセグメントを混合して、SEED Fcと呼ばれる相補的CH3ヘテロ二量体を作製することが含まれる。

10

【0345】

ヘテロ二量体化のための方法およびバリエーションはまた、「ノブおよびホール」変異（「非対称（skew）」バリエーションとも呼ばれる）、「静電的ステアリング」または「電荷対」に関連する変異、およびpIバリエーションを含む、公開国際PCT出願第WO2014/145806号に記載されているものも含む。ヘテロ二量体バリエーションはまた、米国公開出願第US2012/0149876号または同第US2018/011883号に記載のいずれかも含む。

【0346】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体化を促進するために、Fcヘテロ二量体の両方のポリペプチドは、一对のまたは相補的なアミノ酸改変を含む。Fc融合物のポリペプチドの例示的な対を形成するアミノ酸改変を表3に記載する。

20

【0347】

（表3）ヘテロ二量体Fcの対を形成するアミノ酸

第1のFcポリペプチド	第2のFcポリペプチド
T366W	T366S/L368W/Y407V
T366W/S354C	T366S/L368A/Y407V/Y349C
S364H/F405A	Y349T/Y349F
T350V/L351Y/F405A/Y407V	T350V/T366L/K392L/T394W
K360D/D399M/Y407A	E345R/Q347R/T366V/K409V
K409D/K392D	D399K/E356K
K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
L360E/K409W/Y349C	Q347R/399V/F405T/S354C
K370E/K409W	E357N/D399V/F405T

30

【0348】

いくつかの態様において、改変は、突起が、第1のおよび第2のFc含有ポリペプチドの複合体形成を促進するように空洞内に配置可能であるように、突起（protuberance）（ノブ）を第1のFcポリペプチド内に、および空洞（ホール）を第2のFcポリペプチド内に、導入することを含む。ポリペプチドに突起および空洞を作製する置換および/または改変の標的とされるアミノ酸は典型的には、第2のポリペプチドの界面中の1つまたは複数のアミノ酸と相互作用または接触する界面アミノ酸である。

40

【0349】

いくつかの態様において、突起（ホール）アミノ酸を含むように改変される第1のFcポリペプチドは、第1のFcポリペプチドの界面から突出し、そのために第2のポリペプチドの隣接する界面における補償的（compensatory）空洞（ホール）中に位置することができる、ネイティブなまたは元のアミノ酸と少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸との置換を含む。ほとんどの場合、置換アミノ酸は、元のアミノ酸残基より大きな側鎖体積を有するものである。当業者は、突起を作製するのに理想的な置換アミノ酸であるアミノ酸残基を特定するためにアミノ酸残基の特性を決定および/または評価する方法を理解している。いくつかの態様において、突起の形成のための置換残基は、天然に生じるアミノ酸残基であり、例えば、アルギニン（R）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、またはトリ

50

プトファン(W)を含む。いくつかの例において、置換のために特定される元の残基は、小さな側鎖を有するアミノ酸残基、例えば、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、スレオニン、またはバリンなどである。

【0350】

いくつかの態様において、空洞(ホール)を含むように改変される第2のFcポリペプチドは、第2のポリペプチドの界面から陥凹させ、よって第1のポリペプチドの界面からの対応する突起を収容することができる、ネイティブなまたは元のアミノ酸と、少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸との置換を含むものである。ほとんどの場合、置換アミノ酸は、元のアミノ酸残基より小さな側鎖体積を有するものである。当業者は、空洞の形成に理想的な置換残基であるアミノ酸残基を特定するためにアミノ酸残基の特性を決定および/または評価する方法を理解している。概して、空洞の形成のための置換残基は、天然に生じるアミノ酸であり、例えば、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)、およびバリン(V)を含む。いくつかの例において、置換のために特定される元のアミノ酸は、大きな側鎖を有するアミノ酸、例えば、チロシン、アルギニン、フェニルアラニン、またはトリプトファンなどである。

【0351】

ヒトIgG1のCH3界面は、例えば、各表面から1090 Å²を埋める4つの逆平行 鎖に位置している各ドメイン上の16残基を含む(例えば、Deisenhofer et al. (1981) *Biochemistry*, 20:2361-2370; Miller et al., (1990) *J Mol. Biol.*, 216, 965-973; Ridgway et al., (1996) *Prot. Engin.*, 9: 617-621; 米国特許第5,731,168号を参照)。突起または空洞を作製するCH3ドメインの改変は、例えば、米国特許第5,731,168号; 国際特許出願第WO98/50431号および同第WO 2005/063816号; ならびにRidgway et al., (1996) *Prot. Engin.*, 9: 617-621に記載される。いくつかの例において、突起および空洞を作製するCH3ドメインの改変は典型的には、2つの中心にある逆平行 鎖に位置している残基を標的とする。目的は、作製される突起が、パートナーのCH3ドメイン中の補償的空洞によって収容されるよりもむしろ周囲の溶媒内に突出することによって収容され得るリスクを最小化することである。

【0352】

例えば、いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcは、Thr366でCH3ドメイン内にアミノ酸改変を有するポリペプチドを含み、このポリペプチドは、より嵩高いアミノ酸、例えばTry(T366W)に置換されると、それぞれThr366、Leu368、およびTyr407の位置でのより嵩の少ないアミノ酸、例えば、Ser、Ala、およびValへのアミノ酸改変(T366S/L368A/Y407V)を有する第2のCH3ドメインと優先的に対形成することができる。CH3改変によるヘテロ二量体化は、例えば、Ser354をCysへ(S354C)および相対するCH3ドメイン上のTyr349をCysへ(Y349C)変更することによる、ジスルフィド結合の導入によりさらに安定化することができる(Reviewed in Carter, 2001 *Journal of Immunological Methods*, 248: 7-15)。

【0353】

特定の態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fcヘテロ二量体化を媒介できる第1のFcおよび第2のFcを含み、変異T366WおよびS354Cを含む第1のFcポリペプチドならびに変異T366S、L368A、Y407V、およびY349Cを含む第2のFcポリペプチドを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 440または446に記載の配列を含むFcポリペプチドから選択され、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 441、444、または448に記載の配列を含むFcポリペプチドから選択される。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 103、107、115、または117のいずれかに記載のアミノ酸の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 104、108、111、113、119、または121のいずれかに記載のアミノ酸の配列であるかまたはそれを含む。

【0354】

いくつかの態様において、Fcポリペプチドは、Fc媒介エフェクター機能をもたらす特徴

10

20

30

40

50

を示す。特定の例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 440に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 441または444であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 103に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 104または111に記載の配列であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 107に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 108または113に記載の配列であるかまたはそれを含む。第1のおよび第2のFcポリペプチドは、構築物のいずれかのポリペプチド鎖にフォーマットされ得る。

【0355】

いくつかの態様において、第1のおよび第2のFcポリペプチドの一方または両方は、1つまたは複数のFcエフェクター機能をさらに低下させる（例えば低下したFc 受容体結合のための、1つまたは複数のアミノ酸変異をさらに含むことができる。Fcエフェクター機能を低下させるための例示的な変異は、記載されるいずれかを含む。いくつかの態様において、改変は、1つまたは複数の位置Glu233（E233）、Leu234（L234）、またはLeu235（L235）の欠失、例えば、アミノ酸Glu233（E233）、Leu234（L234）、およびLeu235（L235）の欠失であり得る。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 442または447に記載の配列を含むFcポリペプチドから選択され、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 443、445、または449に記載の配列を含むFcポリペプチドから選択される。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 105、109、116、または118のいずれかに記載のアミノ酸の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 106、110、112、114、120、または122のいずれかに記載のアミノ酸の配列であるかまたはそれを含む。

【0356】

特定の例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 442に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 443または445であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 105に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 106または112に記載の配列であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 109に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 110または114に記載の配列であるかまたはそれを含む。第1のおよび第2のFcポリペプチドは、構築物のいずれかのポリペプチド鎖にフォーマットされ得る。

【0357】

いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドまたは第2のFcポリペプチドは変異M252Yおよび/またはM428Vをさらに含む。特定の例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 446に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 448に記載の配列であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 115に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 119に記載の配列であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 117に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 121に記載の配列であるかまたはそれを含む。他の例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 447に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 449に記載の配列であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 116に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 120に記載の配列であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 118に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO : 122に記載の配列であるかまたはそれを含む。第1のおよび第2のFcポリペプチドは、構築物のいずれかのポリペプチド鎖にフォーマットされ得る。

【0358】

ヘテロ二量体の促進を促すことができるバリエーションのさらなる例は、以下：S364K/E357QおよびL368D/K370S；L368D/K370SおよびS364K；L368E/K370SおよびS364K；T411T/E360E/Q362EおよびD401K；L368D/K370SおよびS364K/E357L、K370SおよびS364K/E357Q、ならびにT366S/L368A/Y407VおよびT366W、または366S/L368A/Y407V/Y349CおよびT366W/S354C)の中からの第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドの立体バリエーション(例えば、非対称バリエーション)の任意の組み合わせまたは対であり、ここで、各対は、第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドにおける変異を表す。特定の態様において、提供される構築物は、変異L368D/K370SおよびS364KおよびE357Qの対を含む、第1のおよび第2のFcポリペプチドを含む。

10

【0359】

ヘテロ二量体の作製に用いることができるさらなるメカニズムは、Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285(25):19637 (2010)に記載されるように、「静電的ステアリング」と呼ばれることもある。これは本明細書において、「電荷対」と呼ばれることもある。この態様において、静電気は、ヘテロ二量体化に向けての形成を歪めるために用いられる。当業者が理解しているように、これらはpIに対して、よって精製に対しても作用を有している場合があり、よって、いくつかの場合において、pIバリエーションともみなされ得る。しかしながら、これらは、強制的にヘテロ二量体化するために作製され、精製ツールとしては用いられなかったことから、それらは「立体バリエーション」に分類される。1つの態様において、第1のFcポリペプチドは、変異D221E/P228E/L368Eを含み得る、第2のFcポリペプチドは、変異D221R/P228R/K409Rを含み得る。別の態様において、第1のFcポリペプチドは、変異C220E/P228E/368Eを含み得、第2のFcポリペプチドは、変異C220R/E224R/P228R/K409Rを含み得る。

20

【0360】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体化は、pIバリエーションによって促進することができる。いくつかの局面において、pIバリエーションは、タンパク質のpIを増加させる(塩基性変化)ものを含み得る。他の局面において、pIバリエーションは、タンパク質のpIを減少させる(酸性変化)ものを含み得る。いくつかの場合において、これらのバリエーションの全ての組み合わせを行うことができ、これらには、一方のFcポリペプチドが、野生型、または野生型と有意に異なるpIを示さないバリエーションであってもよく、もう一方のFcポリペプチドがより塩基性またはより酸性のいずれかであり得る、組み合わせが含まれる。あるいは、各Fcポリペプチドは、一方がより塩基性および一方がより酸性に変化され得る。いくつかの態様において、少なくとも1つのFcポリペプチドは、変異Q295E/N384D/Q418E/N421Dを含む、負のpIバリエーションFcである。

30

【0361】

いくつかの態様において、立体ヘテロ二量体化バリエーション(例えば、ノブおよびホール)とpIまたは電荷対バリエーションとの組み合わせを用いることができる。

【0362】

特定の態様において、提供される構築物は、(a)非対称バリエーションS364K/E357Qを含む第1のFcポリペプチド；ならびにb)非対称バリエーションL368D/K370SおよびpIバリエーションN208D/Q295E/N384D/Q418E/N421Dを含む第2のFcポリペプチドを含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの一方または両方は、Fcエフェクター活性を低下させる変異、例えば、例示的な変異E233P/L234V/L235A/G236del/S267Kをさらに含むことができる。Fcヘテロ二量体化を媒介できるそのような第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドの例は、SEQ ID NO: 472および473に記載の配列を含む。第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドは、構築物のいずれかのポリペプチド鎖にフォーマットされ得る。

40

【0363】

結果として生じる制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、任意の適切な方法によって、例えば、プロテインAまたはプロテインGカラム上でのアフィニティクロマトグラフィ

50

ーなどによって精製することができる。異なるポリペプチドをコードする2種類の核酸分子が細胞内で形質転換されている場合、ホモおよびヘテロ二量体の形成が生じる。発現のための条件は、ヘテロ二量体形成がホモ二量体形成より有利になるように調整することができる。

【0364】

親和性試薬に対するヘテロ二量体の異なる親和性に基づきホモ二量体からヘテロ二量体を回収するための技術は公知である。いくつかの局面において、そのような技術は、Fcポリペプチド鎖の一方が親和性試薬プロテインAに結合しないように、ヘテロ二量体を設計することを含む。いくつかの場合において、ポリペプチド鎖の一方は、Fcヘテロ二量体のポリペプチドの一方においてプロテインA試薬に対する親和性を抑制または低下させる1つまたは複数のアミノ酸の置換を含み得る、例えば、WO2017134440、WO2010151792、Jendeberg et al. (Jendeberg et al., (1997) J. Immunol. Methods, 201(1): 25-34を参照。これらの態様のいくつかにおいて、Fc領域は、プロテインA結合を妨げ、それによってヘテロ二量体融合タンパク質のより効率的な精製が可能になるように、ヘテロ二量体の一方のメンバー上のプロテインA結合部位で改変され得る。この結合部位内の例示的な改変は、Ile253、例えばIle253Arg (I253R) である。いくつかの態様において、改変はH435RまたはH435R/Y436Fであり得る。いくつかの態様において、Fcヘテロ二量体のFcポリペプチドは、プロテインAに結合可能であるが、プロテインGには結合しないように (pA+/pG-)、改変を含むことができる。例示的なpA+/pG-アミノ酸改変は、ヒトIgG1を基準にして428位にセリン、434位にセリン、および任意で436位にヒスチジンを含むか、またはヒトIgG 2、3、または4における対応する位置にこれらの残基を含む、Fcを含む。いくつかの局面において、一方のIgG Fcポリペプチドにおける428位、434位、および任意で436位でのそのようなアミノ酸改変は、プロテインGの結合を低下または抑制し、タンパク質の精製を増強する。

【0365】

いくつかの態様において、親和性試薬に対して異なる親和性を付与するそのような改変のいずれかは、上記に記載される1つまたは複数の他のアミノ酸改変のいずれかと組み合わせることができる。例えば、I253R改変は、T366S/L368A/Y407V改変またはT366W改変のいずれかと組み合わせられ得る。T366S/L368A/Y407V改変Fcは、T366W改変のFc場合と同様に、二量体化界面の立体的閉鎖状態が存在しないことから、ホモ二量体を形成することが可能である。したがって、いくつかの態様において、I253R改変は、形成されている可能性がある任意のホモ二量体Fcの精製を不可能にする、T366S/L368A/Y407V改変Fcと組み合わせられる。同様の改変は、T366S/L368A/Y407VおよびH453Rを組み合わせることによって利用され得る。

【0366】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体分子のFc領域は、例えば上記に記載されているいずれかなど、1つまたは複数の他のFc変異を追加的に含み得る。いくつかの態様において、ヘテロ二量体分子は、エフェクター機能を低下させる変異を有するFc領域を含む。いくつかの態様において、Fc領域は、例えば、低下されたFc受容体結合を介して、例えば、Fc R結合に結合するが一般にFcRn結合しない結合を介して、低下されたFc媒介エフェクター機能をもたらすように変更される。

【0367】

いくつかの態様において、Fc領域は、Fc受容体結合を低下させるために以下の位置：Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、またはLeu235 (L235) の1つまたは複数において変異される。1つまたは複数の変異は、E233P、L234V、および/またはL235Aを含み得る。

【0368】

特定の態様において、例えば、Fc RへのFc受容体結合の低下を介する、Fcエフェクター機能を低下させるためのFc領域の変異は、G236R/L328R、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、E233P/L234V/L235

10

20

30

40

50

A/G236del/S239K/A327G、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327GもしくはE233P/L234V/L235A/G236del、D265A/P329A、D265A/P329G、D265A/N297A、L234V/L235A/D265A、L234V/L235A/N297A、L234V/L235A/P329A、またはL234V/L235A/P329Gのいずれかの中からの変異を含む。

【0369】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:440（例えば、SEQ ID NO:103または107）、446（例えば、SEQ ID NO:115または117）のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcのもう一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:441（例えば、SEQ ID NO:104または108）、444（例えば、SEQ ID NO:111または113）、448（例えば、SEQ ID NO:119または121）のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含有する。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:442（SEQ ID NO:105または109）、447（例えば、SEQ ID NO:116または118）のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcのもう一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:443（例えば、SEQ ID NO:106または110）、445（例えば、SEQ ID NO:112または114）、449（例えば、SEQ ID NO:120または122）のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

【0370】

いくつかの態様において、提供される多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域は、1つまたは複数のエフェクター機能を示す。いくつかの場合において、Fc領域は、Fc媒介エフェクター機能、例えば、ADCC（例えば、NK細胞によるグランザイムBの放出）、ADCP、および/またはCDCなどをもたらすことができる。一般に、Fc領域は、免疫グロブリンの主な機能である、抗原結合能に加えて、補体依存性細胞傷害（CDC）および抗体依存性細胞傷害（ADCC）などのエフェクター機能を担う。加えて、Fc領域中に存在するFcRn配列は、インビボFcRn受容体へのコンジュゲーションによりインビボ半減期を増加させることによって、血清中のIgGレベルを調節する役割を果たす。多重特異性ポリペプチド構築物が切断可能なリンカーを含んでいるいくつかの態様において、リンカーの切断は、それぞれが生物学的活性を有する2つの構成成分：T細胞上のCD3に結合およびエンゲージできるCD3結合領域であって、いくつかの局面において、T細胞上に共刺激シグナルを誘導するためのCRBRおよび/またはT細胞上に阻害性シグナルを誘導するためのIRBRも含み得る、CD3結合領域；ならびに標的特異的エフェクター機能を示し得るDLL3 VHHドメインに連結されたFc領域を生成し得る。本明細書において提供される特定の態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、切断不可能なリンカーを含み、いくつかの局面において、非依存性Fc媒介エフェクター機能を示さない場合がある。

【0371】

いくつかの態様において、Fc領域は、1つまたは複数のエフェクター機能を変更するように変異または改変されるFcポリペプチドを含む。したがって、いくつかの場合において、エフェクター機能、例えば、ADCC、ADCP、および/またはCDCの1つまたは複数は、提供される制約付き多重特異性ポリペプチド構築物による使用のためのFcにおいて、変更され得る、例えば、低下または増強され得る。エフェクター機能を低下させる例示的な変異には、上記に記載されるいずれかが含まれる。

【0372】

いくつかの態様において、IgG1 Fcポリペプチドまたはそのバリエーション、例えば下記に記載されるいずれかは、G1 m1またはG1 m3アロタイプで作製することができる。いくつかの態様において、Fc領域は、ヒトG1 m1アロタイプのアミノ酸、例えば、SEQ ID NO:8などに記載の356位および358位にAsp（D）およびLeu（L）を含む残基を含むことができる。いくつかの場合において、Fcポリペプチドは、アロタイプG1 m1の残基を再構成するために、アミノ酸置換E356DおよびM358Lを含むことができる。他の態様において、Fc領域は、ヒトG1 m3アロタイプのアミノ酸、例えば、SEQ ID NO:472および473などに記載される、EUナンバリングによる356位および358位に残基 Glu（E）およびMet（M）などを含むことができる。いくつかの場合において、Fcポリペプチドは、アロ

タイプG1 m3の残基を再構成するために、アミノ酸置換D356EおよびL358Mを含むことができる。

【0373】

c. CD3結合ドメイン

制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、抗CD3結合ドメインの1つまたは複数のコピーを含む。本開示の抗CD3結合ドメインは、T細胞上のCD3またはCD3複合体のメンバーのエンゲージメントを介してT細胞を活性化する。好ましい態様において、本開示の抗CD3結合ドメインは、CD3としても公知のCD3の鎖に特異的に結合する。本開示の抗CD3結合ドメインは、T細胞上のCD3のエンゲージメントを介してT細胞を活性化する。本開示の抗CD3結合ドメインは、CD3媒介T細胞活性化をアゴナイズ、刺激、活性化、および/または他の方法で増強する。CD3の生物学的活性は、例えば、CD3とT細胞受容体(TCR)の抗原結合サブユニットとの間の相互作用によるT細胞活性化および他のシグナル伝達を含む。例えば、本開示の抗CD3結合ドメインは、CD3媒介T細胞活性化を部分的にまたは完全に調節する、例えば、アゴナイズ、刺激、活性化、または他の方法で増強することによって、T細胞上のCD3のエンゲージメントを介してT細胞を完全にまたは部分的に活性化する。

10

【0374】

CD3結合ドメインは、上記に記載されるいずれかであり得る。特定の態様において、CD3結合ドメインは、CD3に結合するFv抗体断片(本明細書において抗CD3 Fv断片と呼ばれる)である。いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、ジスルフィド安定化抗CD3結合Fv断片(dsFv)である。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインは、CD3への結合について一価である。

20

【0375】

いくつかの態様において、CD3結合領域は、可変重鎖(Hv、VHとも呼ばれる)および可変軽鎖(Lv、VLとも呼ばれる)を含むFv抗体断片、例えば記載されるいずれかである。そのような態様の局面において、免疫グロブリンFc領域は、Fcヘテロ二量体の両ポリペプチド間でのヘテロ二量体会合を可能にする2つの異なるFcポリペプチドを含むヘテロ二量体Fc領域、例えば記載されるいずれかである。そのような態様において、CD3結合領域の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)は、ヘテロ二量体Fcの相対する鎖に連結される。

【0376】

いくつかの態様において、CD3結合領域は、SP34のFvもしくはdsFv(Pessano et al. The EMBO Journal. 4: 337-344, 1985)またはSP34のヒト化バリエーション(WO2015 001085)である。

30

【0377】

いくつかの態様において、その抗CD3結合ドメインは、重鎖可変アミノ酸配列と軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む、Fv、例えばdsFv断片である。いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、その中に、少なくともアミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO: 29)を含むVH CDR1配列；
少なくともアミノ酸配列
RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30)

40

を含むVH CDR2配列；
少なくともアミノ酸配列
HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

を含むVH CDR3配列；
少なくともアミノ酸配列
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

を含むVL CDR1配列；

50

少なくともアミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO : 33) を含むVL CDR2配列 ; および
少なくともアミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO : 34) を含むVL CDR3配列
が含まれる、FvまたはdsFv断片である。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメ
インは、SEQ ID NO : 35 ~ 65の群から選択される重鎖可変アミノ酸配列およびSEQ ID
NO : 66 ~ 84または368からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列を含むFv、例え
ばdsFv断片である。

【 0 3 7 8 】

いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、
アミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO : 29) に対して少なくとも90%、91%、92%、93
%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを上回る同一性を有するVH CD
R1配列 ;

10

アミノ酸配列
RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99
%またはそれを上回る同一性を有するVH CDR2配列 ;

アミノ酸配列
HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99
%またはそれを上回る同一性を有するVH CDR3配列 ;

20

アミノ酸配列
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99
%またはそれを上回る同一性を有するVL CDR1配列 ;

アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO : 33) に対して少なくとも90%、91%、92%、9
3%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを上回る同一性を有するVL C
DR2配列 ; および

アミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO : 34) に対して少なくとも90%、91%、92%
、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを上回る同一性を有するVL
CDR3配列
を含む。

30

【 0 3 7 9 】

いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、
少なくともアミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO : 461) を含むVH CDR1配列 ;
少なくともアミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO : 462) を含むVH CDR2配列 ;
少なくともアミノ酸配列
HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

40

を含むVH CDR3配列 ;
少なくともアミノ酸配列
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

を含むVL CDR1配列 ;
少なくともアミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO : 33) を含むVL CDR2配列 ; および
少なくともアミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO : 34) を含むVL CDR3配列
を含む。

【 0 3 8 0 】

いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、アミノ酸配列GFTFNTYAMN (SE

50

Q ID NO:461) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR1配列；アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO:462) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR2配列；アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR3配列、アミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

10

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR1配列；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:33) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR2配列；およびアミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO:34) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR3配列を含む。

【0381】

いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、アミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO:461) を少なくとも含むVH CDR1配列；アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO:462) を少なくとも含むVH CDR2配列；アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

20

を少なくとも含むVH CDR3配列、アミノ酸配列GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 468)

を少なくとも含むVL CDR1配列；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:469) を少なくとも含むVL CDR2配列；およびアミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO:464) を少なくとも含むVL CDR3配列を含む。

30

【0382】

いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、アミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO:461) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR1配列；アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO:462) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR2配列；アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR3配列、アミノ酸配列GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 468)

40

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR1配列；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:469) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR2配列；およびアミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO:464) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR3配列を含む。

50

【 0 3 8 3 】

いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、アミノ酸配列GFTFSTYAMN (SEQ ID NO:466) を少なくとも含むVH CDR1配列；アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO:467) を少なくとも含むVH CDR2配列；アミノ酸配列HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 463)

を少なくとも含むVH CDR3配列、アミノ酸配列GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 468)

を少なくとも含むVL CDR1配列；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:469) を少なくとも含むVL CDR2配列；およびアミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO:464) を少なくとも含むVL CDR3配列を含む。

10

【 0 3 8 4 】

いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、アミノ酸配列GFTFSTYAMN (SEQ ID NO:466) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR1配列；アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO:467) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR2配列；アミノ酸配列HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 463)

20

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR3配列、アミノ酸配列GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 468)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR1配列；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:469) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR2配列；およびアミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO:464) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR3配列を含む。

30

【 0 3 8 5 】

いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、少なくともアミノ酸VLWYSNRWV (SEQ ID NO: 465) を含むCDR3を含む。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、アミノ酸VLWYSNRWV (SEQ ID NO: 465) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを上回る同一性を有するCDR3を含む。

【 0 3 8 6 】

いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数のコピーを含む。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインは、CD3 に結合するFv抗体断片（本明細書において抗CD3 Fv断片と呼ばれる）を含む。いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、ジスルフィド安定化抗CD3結合 Fv断片（dsFv）である。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインは、CD3への結合について一価である。

40

【 0 3 8 7 】

いくつかの態様において、CD3結合領域は一本鎖抗体ではない。例えば、いくつかの局面において、CD3結合領域は一本鎖可変断片（scFv）ではない。

【 0 3 8 8 】

50

いくつかの態様において、CD3結合領域は、可変重鎖（Hv、VHとも呼ばれる）および可変軽鎖（Lv、VLとも呼ばれる）を含むFv抗体断片、例えば記載されているいずれかである。そのような態様の局面において、免疫グロブリンFc領域は、Fcヘテロ二量体の両ポリペプチド間でのヘテロ二量体会合を可能にする2つの異なるFcポリペプチドを含むヘテロ二量体Fc領域、例えば、セクションIII.C.2.bに記載されるいずれかである。そのような態様において、CD3結合領域の可変重鎖（VH）および可変軽鎖（VL）は、ヘテロ二量体Fcの相対する鎖に連結される。

【0389】

いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:27、28、35～84、368、451～454、および460の群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域アミノ酸配列と軽鎖可変領域アミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:27、35～65、453、454、および460の群より選択される重鎖可変領域アミノ酸配列とSEQ ID NO:28、66～84、368、451、および452の群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域アミノ酸配列との組み合わせを含む。

10

【0390】

いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、重鎖可変アミノ酸配列と軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:35～84、368、451～454、および460からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む、重鎖可変アミノ酸配列と軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:35～84、368、451～454、および460からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変アミノ酸配列と軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:35～65、453、454、および460の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO:66～84、368、451、および452からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:35～65、453、454、および460からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO:66～84、368、451、および452からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。

20

30

【0391】

いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:35～65、453、454、および460からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する重鎖可変アミノ酸配列、ならびにSEQ ID NO:66～84または368、451、および452からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含むFv断片またはdsFv断片である。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインは、SEQ ID NO:47のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO:75のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）が含有されるFvまたはdsFvである。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインは、SEQ ID NO:47のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO:368のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）が含有されるFvまたはdsFvである。

40

【0392】

いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、重鎖可変アミノ酸配列と軽鎖

50

可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:27、28、35～84、368、451～454、460からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む、重鎖可変アミノ酸配列と軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:27、28、35～84、368、451～454、460からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖可変アミノ酸配列と軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO:27、35～65、453、454、および460からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO:28、66～84、368、451、および452からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO:27、35～65、453、454、および460の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO:28、66～84、368、451、および452からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む。

10

【0393】

いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO:27、35～46、48～50、453、454、および460からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO:28、66、68～74、76、78、80、368、451、および452からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO:27、35～46、48～50、454、454、および460の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO:28、66、68～74、76、78、80、451、および452からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む。

20

30

【0394】

いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO:27、35～46、48～50、453、454、および460からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO:28、66、68～74、76、78、80、368、451、および452からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO:27、35～46、48～50、454、454、および460の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO:28、66、68～74、76、78、80、368、451、および452からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む。

40

【0395】

いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:27のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖(VH)を含む。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:28のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖(VL)を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:27のアミノ酸配列に対して

50

少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO:28のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:27のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:28のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:27のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO:28のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

【0396】

いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:453のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:451のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:453に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO:451のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:453のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:451のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:453のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO:451のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

【0397】

具体的な態様において、Fvは、V_H-V_Lヘテロ二量体が鎖間ジスルフィド結合によって安定化されているジスルフィド安定化Fv断片（dsFv）である。いくつかの態様において、鎖間ジスルフィド結合は、VH鎖および/またはVL鎖のフレームワーク位置における位置の変異によって操作されている。いくつかの態様において、ジスルフィド安定化抗CD3 Fvは、Kabatナンバリングによって、44位におけるCysへの変異を含む抗CD3 VH、および100位におけるCysへの変異を含む抗CD3 VLを含む。例えば、いくつかの態様において、各々Kabatナンバリングによって、VH鎖は変異G44Cを含有し、VL鎖は変異G100Cを含有する。いくつかの態様において、ジスルフィド安定化抗CD3 Fvは、Kabatナンバリングによって、105位におけるCysへの変異を含む抗CD3 VHおよび43位におけるCysへの変異を含む抗CD3 VLを含む。

【0398】

いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO:47、52~65、454、または460からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO:67、75、77、79、81~84、368、または452からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む。そのような態様のうちのいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、各々Kabatナンバリングによって、変異G44Cを含有するVH鎖および変異G100Cを含有するVL鎖を有するdsFvである。いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO:47、52~65、454、または460の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO:67、75、77、79、81~84、368、または452からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む。

【 0 3 9 9 】

いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:47のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:75のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:47のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO:75のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。そのような態様のうちのいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、各々Kabatナンバリングによって、変異G44Cを含有するVH鎖および変異G100Cを含有するVL鎖を有するdsFvである。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:47のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:75のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:47のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO:75のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

10

【 0 4 0 0 】

いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:454のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:452のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:454のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO:452のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。そのような態様のうちのいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、各々Kabatナンバリングによって、変異G44Cを含有するVH鎖および変異G100Cを含有するVL鎖を有するdsFvである。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:454のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:452のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:454のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO:452のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

20

30

【 0 4 0 1 】

いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:460のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:452のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:460のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO:452のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%

40

50

、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。そのような態様のうちのいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、各々Kabatナンバリングによって、変異G44Cを含有するVH鎖および変異G100Cを含有するVL鎖を有するdsFvである。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:460のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:452のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO:460のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO:452のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

【0402】

d. リンカー

制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、免疫グロブリンFc領域を含む第1の構成成分と、CD3結合領域を含む第2の構成成分とを、連結または共役させるリンカーを含む。いくつかの態様において、リンカーは、Fc領域がCD3結合領域のN末端にあるように、Fc領域のC末端領域の末端に位置づけられる。提供される制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、第1のおよび第2の構成成分を共に形成する第1のおよび第2のポリペプチドを含む多量体、例えば二量体であることから、提供される構築物は、第1のポリペプチドのFc部分とCD3結合領域とを連結するリンカー、ならびに第2のポリペプチドのFc部分とCD3結合領域とを連結するリンカーを含むことが理解される。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、およびCD3結合領域の第1のドメイン（例えば、VH）を含み、第2のポリペプチドは、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、およびCD3結合領域の第2のドメイン（例えば、VL）を含む。典型的には、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび第2のポリペプチド中に存在するリンカーは同じである。したがって、いくつかの態様において、CD3結合ドメインの各ドメインは、リンカー、例えば同じリンカーを介して、Fc、例えばヘテロ二量体Fcの相対するポリペプチドに連結される。

【0403】

融合タンパク質で用いるためのさまざまなポリペプチドリンカーが公知である（例えば、Chen et al. (2013) Adv. Drug. Deliv. 65:1357-1369；および国際PCT公報第WO 2014/099997号、同第WO2000/24884号；米国特許第5,258,498号；米国特許第5,525,491号；米国特許第5,525,491号、米国特許第6,132,992号を参照）。

【0404】

いくつかの態様において、リンカーは、CD3結合領域が多重特異性ポリペプチドコンジュゲートのFc領域に連結されると、CD3結合領域が制約付けられ、多重特異性ポリペプチド構築物と細胞との接触時に、細胞、例えばT細胞の表面上でCD3に結合またはエンゲージできないか、または実質的にできないように、選択される。さまざまなアッセイが、多重特異性ポリペプチド構築物によるCD3の結合またはエンゲージメントを評価するために用いることができ、これらには、T細胞結合、レポーター系を用いるNFAT活性化、細胞溶解性T細胞活性、サイトカイン産生および/またはT細胞活性化マーカーの発現を評価するアッセイが含まれる。例示的なアッセイを、提供される実施例に示す。典型的には、リンカーは、ポリペプチド構築物の正しいフォールディングを確実にし、連結されたポリペプチドの活性または機能と相反し得る電荷を示さず、または連結されたポリペプチドの活性を妨害または変更し得るドメインの1つまたは複数におけるアミノ酸残基との結合または他の相互作用を形成しない、リンカーでもある。いくつかの態様において、リンカーはポリペプチドリンカーである。ポリペプチドリンカーは、可動性リンカーもしくは剛性リンカーまたは両方の組み合わせであり得る。いくつかの局面において、リンカーは、短い、中程度の、または長いリンカーである。いくつかの態様において、リンカーは、最大で40アミノ酸の長さまでである。いくつかの態様において、リンカーは、最大で25アミノ酸の長さまでである。いくつかの態様において、リンカーは、少なくとも2アミノ酸の長さであるか、または少なくとも約2アミノ酸の長さである。いくつかの局面において、適切な

10

20

30

40

50

長さは、例えば、少なくとも1および典型的には約40より少ないアミノ酸残基、例えば、2~25アミノ酸残基、5~20アミノ酸残基、5~15アミノ酸残基、8~12アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーは、2~24アミノ酸、2~20アミノ酸、2~18アミノ酸、2~14アミノ酸、2~12アミノ酸、2~10アミノ酸、2~8アミノ酸、2~6アミノ酸、6~24アミノ酸、6~20アミノ酸、6~18アミノ酸、6~14アミノ酸、6~12アミノ酸、6~10アミノ酸、6~8アミノ酸、8~24アミノ酸、8~20アミノ酸、8~18アミノ酸、8~14アミノ酸、8~12アミノ酸、8~10アミノ酸、10~24アミノ酸、10~20アミノ酸、10~18アミノ酸、10~14アミノ酸、10~12アミノ酸、12~24アミノ酸、12~20アミノ酸、12~18アミノ酸、12~14アミノ酸、14~24アミノ酸、14~20アミノ酸、14~18アミノ酸、18~24アミノ酸、18~20アミノ酸、もしくは20~24アミノ酸、または約2~24アミノ酸、2~20アミノ酸、2~18アミノ酸、2~14アミノ酸、2~12アミノ酸、2~10アミノ酸、2~8アミノ酸、2~6アミノ酸、6~24アミノ酸、6~20アミノ酸、6~18アミノ酸、6~14アミノ酸、6~12アミノ酸、6~10アミノ酸、6~8アミノ酸、8~24アミノ酸、8~20アミノ酸、8~18アミノ酸、8~14アミノ酸、8~12アミノ酸、8~10アミノ酸、10~24アミノ酸、10~20アミノ酸、10~18アミノ酸、10~14アミノ酸、10~12アミノ酸、12~24アミノ酸、12~20アミノ酸、12~18アミノ酸、12~14アミノ酸、14~24アミノ酸、14~20アミノ酸、14~18アミノ酸、18~24アミノ酸、18~20アミノ酸、もしくは20~24アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20アミノ酸の長さである。

【0405】

ある特定の局面において、多重特異性ポリペプチドコンジュゲートがその抗原、例えば、TAAに結合されるとき、リンカーの長さが長いほど、CD3結合がより大きい。したがって、いくつかの局面において、リンカーは、12アミノ酸を上回る長さ、例えば、13、14、15、16、17、または18アミノ酸を上回る長さである。いくつかの態様において、リンカーは、12~40アミノ酸の長さ、12~30アミノ酸、12~24アミノ酸、12~18アミノ酸、12~15アミノ酸、15~40アミノ酸、15~30アミノ酸、15~24アミノ酸、15~18アミノ酸、18~40アミノ酸、18~30アミノ酸、18~24アミノ酸、24~40アミノ酸、24~30アミノ酸、または30~40アミノ酸である。

【0406】

リンカーは、天然に生じる、合成、または両方の組み合わせであり得る。特に適したリンカーポリペプチドは、グリシン (Gly)、セリン (Ser)、アラニン (Ala)、およびスレオニン (Thr) から選択されるアミノ酸残基を主に含む。例えば、リンカーは、少なくとも75% (ペプチドリinker中に存在する残基の総数に基づき計算される)、例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%の、Gly、Ser、Ala、およびThrから選択されるアミノ酸残基を含み得る。リンカーはまた、Gly、Ser、Ala、および/またはThr残基のみからなってもよい。いくつかの態様において、リンカーは、1~25個のグリシン残基、5~20個のグリシン残基、5~15個のグリシン残基、または8~12個のグリシン残基を含む。いくつかの局面において、適切なペプチドリinkerは典型的には、少なくとも50%グリシン残基、例えば少なくとも75%グリシン残基を含む。いくつかの態様において、ペプチドリinkerはグリシン残基のみを含む。いくつかの態様において、ペプチドリinkerはグリシンおよびセリン残基のみを含む。

【0407】

いくつかの態様において、これらのリンカーは、アミノ酸グリシンおよびセリンで主に構成され、本明細書においてGSリンカーとして示される。いくつかの態様において、リンカーは (GGS) n を含み、 n は1~10、例えば1~5、例えば1~3であり、例えば、 n が0~10であるGGS (GGS) n (SEQ ID NO: 474) である。特定の態様において、リンカーは配列 (GGGGS) n (SEQ ID NO: 123) を含み、 n は1~10であるか、または n は1~5、例えば1~3である。さらなる態様において、リンカーは (GGGGGS) n (SEQ ID NO: 124) を含み、 n は1~4、例えば1~3である。リンカーは、上記のいずれかの組み合わせ

を含む可能性があり、例えば、2、3、4、または5つのGS、GGS、GGGGS、および/またはGGGGGSリンカーの繰り返しを組み合わされてもよい。いくつかの態様において、そのようなリンカーは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または19アミノ酸の長さである。

【0408】

いくつかの態様において、リンカーは(1文字アミノ酸コードで)：GGS、GGGGS (SEQ ID NO：125)、またはGGGGGS (SEQ ID NO：126)である。いくつかの態様において、GSリンカーは、GGSのGGSのアミノ酸配列、すなわち、GGS、GGGGS (SEQ ID

NO: 125), または GGGGGS (SEQ ID NO: 126)

10

を含む。いくつかの態様において、リンカーはGGGG (SEQ ID NO：5)である。上記例のいずれかのいくつかにおいて、セリンは、アラニンと置換することができる(例えば、(Gly4Ala)または(Gly3Ala))。

【0409】

いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列Gly_xXaa-Gly_y-Xaa-Gly_z (SEQ ID NO：130)を有するペプチドリinkerを含み、各Xaaは、アラニン(Ala)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、トリプトファン(Trp)、プロリン(Pro)、グリシン(Gly)、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)、システイン(Cys)、チロシン(Tyr)、アスパラギン(Asn)、グルタミン(Gln)、リジン(Lys)、アルギニン(Arg)、ヒスチジン(His)、アスパラギン酸(Asp)、およびグルタミン酸(Glu)から独立して選択され、かつ、x、y、およびzはそれぞれ、1~5の範囲での整数である。いくつかの態様において、各Xaaは、Ser、Ala、およびThrからなる群より独立して選択される。特定の変化形において、x、y、およびzのそれぞれは、3に相当する(それによって、アミノ酸配列GGSGGS, 即ち, (GGS)₂ (SEQ ID NO: 1); GGSGGSGGS, 即ち, (GGS)₃ (SEQ ID NO: 2);

20

GGSGGSGGSGGS, 即ち, (GGS)₄ (SEQ ID NO: 3); GGSGGSGGSGGSGGS, 即ち, (GGS)₅ (SEQ ID NO: 4); GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS, 即ち, (G5S)₃ (SEQ ID NO: 127), GGSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 129) および GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 128)

30

を有するペプチドリinkerがもたらされ、各Xaaは上記のように選択される)。

【0410】

いくつかの態様において、リンカーは、(SSSSG)_y (SEQ ID NO：132)モチーフの反復に基づくセリンリッチなリンカーであり、ここで、yは少なくとも1であるが、yは2、3、4、5、6、7、8、および9であり得る。

【0411】

いくつかの場合において、ペプチドリinker内に一定の剛性をもたらすことが望ましい場合がある。これは、ペプチドリinkerのアミノ酸配列においてプロリン残基を含むことによって達成され得る。したがって、いくつかの態様において、リンカーは、ペプチドリinkerのアミノ酸配列において少なくとも1つのプロリン残基を含む。例えば、ペプチドリinkerは、アミノ酸残基の少なくとも25% (例えば、少なくとも50%または少なくとも75%)がプロリン残基であるアミノ酸配列を有し得る。1つの特定の態様において、ペプチドリinkerはプロリン残基のみを含む。

40

【0412】

いくつかの局面において、ペプチドリinkerは、少なくとも1つのシステイン残基、例えば1つのシステイン残基を含む。例えば、いくつかの態様において、リンカーは、少なくとも1つのシステイン残基、ならびにGly、Ser、Ala、およびThrからなる群より選択されるアミノ酸残基を含む。いくつかのそのような態様において、リンカーは、グリシン残基およびシステイン残基、例えばグリシン残基およびシステイン残基のみを含む。典型的

50

には、ペプチドリinker当たり1個のシステイン残基のみが含まれる。システイン残基を含む特定のリンカーの一例としては、アミノ酸配列Gly_m-Cys-Gly_nを有するペプチドリinkerが挙げられ、nおよびmはそれぞれ、1～12、例えば、3～9、4～8、または4～7の整数である。特定の変化形において、そのようなペプチドリinkerは、アミノ酸配列GGGGG-C-GGGGG (SEQ ID NO: 133) を有する。

【0413】

いくつかの態様において、融合タンパク質のリンカーは、構造化されたまたは制約付きリンカーである。特定の態様において、構造化リンカーは、配列 (AP)_nまたは (EAAAK)_n (SEQ ID NO: 134) を含み、nは2～20、好ましくは4～10であり、これらに限定されないが、nが2～20、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15である、AS- (AP)_n-GT (SEQ ID NO: 135) またはAS- (EAAAK)_n-GT (SEQ ID NO: 136) を含む。他の態様において、リンカーは、配列 (GGGGA)_n (SEQ ID

NO:137), (PGGGS)_n (SEQ ID NO:138), (AGGGS)_n (SEQ ID NO:139) または GGS- (EGKSSGSGSESKST)_n-GGS (SEQ ID NO:140,

ここでnは2～20である)、(ADAAP)_n (SEQ ID NO: 527、ここでnは2～20である)、(ADAAP)_n-G (SEQ ID NO: 528、ここでnは2～20である)、(GEPQG)_n (SEQ ID NO: 529、ここでnは2～20である)、(GEPQG)_n-G (SEQ ID NO: 530、ここでnは2～20である)、(AGGEP)_n (SEQ ID NO: 531、ここでnは2～20である)、(AGGEP)_n-G (SEQ ID NO: 532、ここでnは2～20である)、(AGSEP)_n (SEQ ID NO: 533、ここでnは2～20である)、(AGSEP)_n-G (SEQ ID NO: 534、ここでnは2～20である)、(GGGEQ)_n (SEQ ID NO: 535、ここでnは2～20である)、(GGGEQ)_n-G (SEQ ID NO: 536、ここでnは2～20である)を含む。いくつかの態様において、リンカーは、

SSSASASSA (SEQ ID NO:141), GSPGSPG (SEQ ID NO:142),

ATTTGSSPGPT (SEQ ID NO:143), ADAAPADAAPG (SEQ ID NO:537), GEPQGGEPQGG (SEQ ID NO:538), AGGEPAGGEPG (SEQ ID NO:539), AGSEPAGSEPG (SEQ ID NO:540), または GGGEQGGGEQG (SEQ ID NO:541)

である。いくつかの態様において、そのようなリンカーは、それらの構造のために、タンパク質分解に対する耐性が増しており、それによって、インビボでの注入のときに利点をもたらす得る。いくつかの態様において、そのようなリンカーは、負に荷電しており、CD3に対するCD3結合ドメインの結合を弱めるのにより適している可能性がある。いくつかの態様において、リンカーは、切断可能なリンカーではなく、切断不可能なリンカーとも呼ばれる。いくつかの態様において、リンカーは、プロテアーゼによって切断可能ではない。いくつかの態様において、切断可能なリンカーではないまたはプロテアーゼによって切断可能ではないリンカーは、インビボ送達または組換え産生に対して概して安定であるリンカーである。いくつかの局面において、プロテアーゼによって切断可能ではないリンカーとしては、切断可能なペプチド配列またはプロテアーゼの認識部位内に好ましくは位置する少なくとも1つのペプチド結合を含まないものが挙げられる。特定の態様において、切断不可能なリンカーは、プロテアーゼの標的基質ではなく、同じプロテアーゼの基質認識部位を含むリンカーと比較して、プロテアーゼによって優先的にまたは特異的に切断されない。

【0414】

いくつかの態様において、リンカーは、プロテアーゼによって切断される、プロテアーゼの活性部位によって認識される配列である、特定のプロテアーゼの基質認識部位または切断部位を含まない。典型的には、例えば、セリンプロテアーゼでは、切断配列は、基質

中のP1-P4およびP1 -P4 アミノ酸で構成されており、ここで、切断はP1位置の後で生じる。典型的には、セリンプロテアーゼの切断配列は、6残基長であり、多数のプロテアーゼの拡張された基質特異性と適合するが、プロテアーゼに応じてより長くまたはより短くすることができる。典型的には、リンカーは、プロテアーゼによって認識されるP1-P1 切断可能結合配列を含まない。いくつかの局面において、切断不可能なリンカー、またはプロテアーゼによって切断のために特異的に認識される基質認識部位を含まないリンカーは、プロテアーゼによる切断がプロテアーゼの標的基質の切断を実質的に下回るものである。

【0415】

いくつかの態様において、リンカーは切断可能なリンカーである。いくつかの局面において、切断可能なリンカーは、生理的条件下で破壊され得る少なくとも1つの結合の存在によりプロテアーゼの基質となる配列をさらに含むリンカー、例えば、上記に記載されるいずれかである。いくつかの場合において、切断可能なリンカーは、インビボでの細胞環境中に存在するものを含む、インビボで存在する特定の条件下で、例えば、細胞外プロテアーゼへの曝露後に、切断に対して感受性または感応性である。いくつかの場合において、プロテアーゼは、特定の生理的微小環境、例えば腫瘍微小環境中に存在してもよく、それによって、切断が生じ得る部位を制限する。

【0416】

プロテアーゼは典型的には、別の非標的基質と比較して、特定の標的基質の切断に対して特異性または優先度を示す。そのような特異性の程度は、その基質に対するプロテアーゼの優先度および酵素の効率の尺度である、配列（例えばリンカー）の切断の速度定数に基づき決定することができる。さまざまな濃度の基質の存在下での経時的な切断の増加の速度を決定する任意の方法が、特異性定数を計算するために用いることができる。例えば、基質は、蛍光発生部分に連結され、プロテアーゼによる切断時に遊離される。異なるプロテアーゼ濃度での切断の速度を決定することによって、切断に対する特異性定数（ k_{cat}/K_m ）を、特定のリンカーに対する特定のプロテアーゼについて決定することができる。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、およそ少なくとも $1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、または少なくとも $5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ またはそれを上回る速度でプロテアーゼによって特異的に切断され得るリンカーである。

【0417】

いくつかの態様において、本開示の制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、第1のおよび第2の構成成分を連結する切断可能なリンカーを含む。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、プロテアーゼ、通常は細胞外プロテアーゼに対する基質として機能することができるアミノ酸配列を含む。例えば、切断可能なリンカーは、好ましくはプロテアーゼの切断可能なペプチド配列内に位置する少なくとも1つのペプチド結合を含む切断配列を含み得る。適切なプロテアーゼとしては、例えば、関節リウマチまたはがんなどの疾患において増強された形で形成または活性化され、過剰な組織の分解、炎症、および転移をもたらす、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、システインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、およびプラスミン活性化因子が挙げられる。特定の態様において、プロテアーゼは、腫瘍、活性化免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）、または腫瘍微小環境中の細胞によって産生されるプロテアーゼである。いくつかの態様において、プロテアーゼは、グランザイムB、マトリプターゼ、またはMMP-2などのMMPである。

【0418】

切断可能なリンカーは、標的を発現する細胞に近接している腫瘍によって産生されるプロテアーゼ、および/または多重特異性ポリペプチド構築物の目的とする標的と組織中で共存している腫瘍によって産生されるプロテアーゼに基づいて選択され得る。文献において、複数のがん、例えば、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の増加の報告が存在する。例えば、La Rocca et al, (2004) British J. of Cancer 90(7): 1414-1421を参照。

10

20

30

40

50

【 0 4 1 9 】

いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび第2の構成成分を連結する切断可能なリンカーは、構成成分の1つによって活性化される免疫エフェクター細胞によって産生されるプロテアーゼによって切断される。例えば、エフェクターを可能にするまたはエフェクターが増強されたIgG Fc領域を包含する多重特異性ポリペプチド構築物は、標的抗原とエンゲージするとADCCを誘発することができる。ADCCの中心は、エフェクター細胞、すなわちNK細胞および細胞傷害性T細胞からのグランザイムBおよびパーフォリンの放出である。放出されると、グランザイムBは、パーフォリン依存的に標的細胞に侵入し、そこでアポトーシスを媒介する。重要なことには、グランザイムBは、エフェクター細胞と標的細胞との間の細胞外シナプス内で活性である。いくつかの態様において、第1のおよび第2の構成成分多重特異性ポリペプチド構築物を連結する切断可能なリンカーは、グランザイムBによって切断される。グランザイムBは、多重特異性ポリペプチド構築物の構成成分の1つによって媒介されるエフェクター細胞活性化時に放出される。いくつかの態様において、グランザイムBおよび他のプロテアーゼは、活性化T細胞またはNK細胞を含む、免疫エフェクター細胞によって産生され得る。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物によるTAAの結合時のCD3エンゲージメントによるT細胞の活性化は、そのようなプロテアーゼを放出する可能性があり、次いで、特異的な切断可能なリンカーを切断し、それによって、CD3結合分子の活性を増強または増加し、CD3をエンゲージできる。いくつかの態様において、切断は、未切断状態でTAAに結合したときに多重特異性構築物によって達成される活性を増幅または増加することができる。

10

20

【 0 4 2 0 】

例示的な基質としては、これらに限定されないが、以下の酵素またはプロテアーゼ：ADAMS、ADAMTS、例えば、ADAM8；ADAM9；ADAM10；ADAM12；ADAM15；ADAM17/TACE；ADAMDEC1；ADAMTS1；ADAMTS4；ADAMTS5；アスパラギン酸プロテアーゼ、例えば、BACEまたはレニン；アスパラギン酸カテプシン、例えば、カテプシンDまたはカテプシンE；カスパーゼ、例えば、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、またはカスパーゼ14；システインカテプシン、例えば、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンK、カテプシンL、カテプシンS、カテプシンV/L2、カテプシンX/Z/P；システインプロテイナーゼ、例えば、クルジパイン（Cruzipain）；レグマイン；オツバイン（Otubain）-2；KLK、例えば、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、またはKLK14；メタロプロテイナーゼ、例えば、メブリン；ネブリライシン；PSMA；BMP-1；MMP、例えば、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、またはMMP27、セリンプロテアーゼ、例えば、活性化プロテインC、カテプシンA、カテプシンG、キマーゼ、凝固因子プロテアーゼ（例えば、FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa）、エラスターゼ、グランザイムB、グアニジノベンゾアターゼ、HtrA1、ヒト好中球エラスターゼ、ラクトフェリン、マラプシン（Marapsin）、NS3/4A、PACE4、プラスミン、PSA、tPA、トリピン、トリプターゼ、uPA；II型膜貫通セリンプロテアーゼ（TTSP）、例えば、DESC1、DPP-4、FAP、ヘプシン、マトリプターゼ-2、マトリプターゼ、TMPRSS2、TMPRSS3、またはTMPRSS4；およびそれらの任意の組み合わせの1つまたは複数によって切断可能な基質が挙げられる。

30

40

【 0 4 2 1 】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、複数のプロテアーゼ、例えば、2以上のプロテアーゼ、3以上のプロテアーゼ、および4以上のプロテアーゼ等によって切断される。

【 0 4 2 2 】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、特定のプロテアーゼ、例えば、標的を発現する細胞に近接している腫瘍によって産生される、および/または多重特異性ポリペ

50

プチド構築物の標的と共存している腫瘍によって産生されることが公知であるプロテアーゼによる使用のために選択される。

【0423】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、プロテアーゼによって切断される、プロテアーゼの活性部位によって認識される配列である、特定のプロテアーゼの基質認識部位または切断部位を含む。典型的には、例えば、セリンプロテアーゼでは、切断配列は、基質中のP1-P4およびP1'-P4' アミノ酸で構成されており、ここで、切断はP1位置の後で生じる。典型的には、セリンプロテアーゼの切断配列は、6残基長であり、多数のプロテアーゼの拡張された基質特異性と適合するが、プロテアーゼに応じてより長くまたはより短くすることができる。典型的には、切断可能なリンカーは、プロテアーゼによって認識されるP1-P1' 切断可能結合配列を含む。いくつかの局面において、切断可能なリンカーは、例えば、プロテアーゼの基質認識部位配列または切断配列を導入することによって、特定のプロテアーゼによって切断することができるペプチド結合を導入するように操作される。

10

【0424】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、2以上の基質配列の組み合わせを含む。いくつかの態様において、各基質配列は同じプロテアーゼによって切断される。いくつかの態様において、基質配列の少なくとも2つは、異なるプロテアーゼによって切断される。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、グランザイムBの基質であるアミノ酸を含む。いくつかの態様において、グランザイムBが切断可能なリンカーは、一般式P4-P3-P2-P1-P1' (SEQ ID NO: 144) を有するアミノ酸配列を含み、P4はアミノ酸I、L、Y、M、F、V、またはAであり；P3はアミノ酸A、G、S、V、E、D、Q、N、またはYであり；P2はアミノ酸H、P、A、V、G、S、またはTであり；P1はアミノ酸DまたはEであり；かつP1' はアミノ酸I、L、Y、M、F、V、T、S、GまたはAである。いくつかの態様において、グランザイムBが切断可能なリンカーは、一般式P4-P3-P2-P1-P1' (SEQ ID NO: 145) を有するアミノ酸配列を含み、P4はアミノ酸IまたはLであり；P3はアミノ酸Eであり；P2はアミノ酸PまたはAであり；P1はアミノ酸Dであり；かつP1' はアミノ酸I、V、T、S、またはGである。

20

【0425】

いくつかの態様において、グランザイムBの基質は、アミノ酸配列LEAD (SEQ ID NO: 146)、LEPD (SEQ ID NO: 147)、またはLEAE (SEQ ID NO: 148)を含む。いくつかの態様において、切断可能なリンカーはアミノ酸配列を含み、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列IEPDI (SEQ ID NO: 149)、LEPDG (SEQ ID NO: 150)、LEADT (SEQ ID NO: 151)、IEPDG (SEQ ID NO: 152)、IEPDV (SEQ ID NO: 153)、IEPDS (SEQ ID NO: 154)、IEPDT (SEQ ID NO: 155)、IEPDP (SEQ ID NO: 471、またはLEADG (SEQ ID NO: 144)

30

を含む。

【0426】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、マトリプターゼの基質であるアミノ酸を含む。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、配列P1QAR (A/V) (SEQ ID NO: 156) を含み、P1は任意のアミノ酸である。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、配列RQAR (A/V) (SEQ ID NO: 157) を含む。いくつかの態様において、マトリプターゼの基質は、アミノ酸配列RQAR (SEQ ID NO: 158) を含む。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列RQARV (SEQ ID NO: 159) を含む。

40

【0427】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、1つまたは複数のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の基質であるアミノ酸を含む。いくつかの態様において、MMP

50

はMMP-2である。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、一般式P3 P2 P1 P1' (SEQ ID NO: 160)を含み、P3はP、VまたはAであり；P2はQまたはDであり；P1はAまたはNであり；かつP1'はL、IまたはMである。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、一般式P3 P2 P1 P1' (SEQ ID NO: 161)を含み、P3はPであり；P2はQまたはDであり；P1はAまたはNであり；かつP1'はLまたはIである。いくつかの態様において、MMPの基質はアミノ酸配列PAGL (SEQ ID NO: 162)を含む。

【0428】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、グランザイムBの基質であるアミノ酸配列と、マトリプターゼの基質であるアミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列LEAD (SEQ ID NO: 146)とアミノ酸配列RQAR (SEQ ID NO: 158)との組み合わせを含む。

10

【0429】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、グランザイムBの基質であるアミノ酸配列と、MMPの基質であるアミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列LEAD (SEQ ID NO: 146)とアミノ酸配列PAGL (SEQ ID NO: 162)との組み合わせを含む。

【0430】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、マトリプターゼの基質であるアミノ酸配列と、MMPの基質であるアミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列RQAR (SEQ ID NO: 158)とアミノ酸配列PAGL (SEQ ID NO: 162)との組み合わせを含む。

20

【0431】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、グランザイムBの基質であるアミノ酸配列と、マトリプターゼの基質であるアミノ酸配列と、MMPの基質であるアミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、グランザイムBの基質であるアミノ酸配列とMMPの基質であるアミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列LEAD (SEQ ID NO: 146)と、アミノ酸配列RQAR (SEQ ID NO: 158)と、アミノ酸配列PAGL (SEQ ID NO: 162)との組み合わせを含む。

【0432】

切断可能なリンカーには、任意の公知のリンカーが含まれ得る。切断可能なリンカーの例は、Be'liveau et al. (2009) FEBS Journal, 276；米国公開出願第US2016019439号；同第US20150079088号；同第US20170204139号；同第US20160289324号；同第US20160122425号；同第US20150087810号；同第US20170081397号；米国特許第US9644016号に記載される。

30

【0433】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、

40

TGLEADGSPAGLGRQARVG (SEQ ID NO: 163);
 TGLEADGSRQARVGPA GLG (SEQ ID NO: 164); TGSPAGLEADGSRQARVGS (SEQ ID NO: 165);
 TGPAGLGLEADGSRQARVG (SEQ ID NO: 166); TGRQARVGLEADGSPAGLG (SEQ ID NO: 167);
 TGSRQARVGPA GLEADGS (SEQ ID NO: 168); および TGPAGLGSRQARVGLEADGS (SEQ ID
 NO:169); GPAGLGLEPDGSRQARVG (SEQ ID NO: 170); GGS GGGGIEPDIGSGSGS (SEQ ID NO:
 171); GGS GGGGLEADTGGSGGS (SEQ ID NO: 172); GSIEPDIGS (SEQ ID NO: 173); GSLEADTGS
 (SEQ ID NO: 174); GGS GGGGIEPDGGSGSGS (SEQ ID NO: 175); GGS GGGGIEPDVGGSGSGS
 (SEQ ID NO: 176); GGS GGGGIEPDSGGSGSGS (SEQ ID NO: 177); GGS GGGGIEPDTGGSGSGS (SEQ
 ID NO: 178); GGSLEPDGSGS (SEQ ID NO: 179); および GPAGLGLEADGSRQARVG (SEQ ID NO:
 180), GGE GGGSGSGSGSGS (SEQ ID NO: 181); GSSAGSEAGSGQAGVGS (SEQ ID NO: 182);
 GGS GGGGLEAE GSGSGSGS (SEQ ID NO: 183); GGS GGGGIEPDPGSGSGS (SEQ ID NO: 184);
 TGGSGGGGIEPDIGSGSGS (SEQ ID NO: 185)

10

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 4 3 4 】

e. 共刺激結合ドメイン

本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、共刺激受容体に結合する1つまたは複数の
 共刺激受容体結合領域 (CRBR) を含む。いくつかの態様において、提供される多重特異
 性ポリペプチド構築物の1つまたは複数のCRBRは、T細胞上に発現している共刺激受容体
 に結合する。いくつかの態様において、共刺激受容体は、活性化T細胞の表面上で上方制
 御、誘導、または発現される。いくつかの局面において、CRBRは、共刺激受容体に結合
 し、共刺激受容体を刺激する。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチドのCRB
 Rに対する共刺激受容体のアゴニスト結合は、T細胞において下流シグナル伝達を誘導し、
 CD3のエンゲージメント後にT細胞活性化または機能性を増強または亢進する。いくつか
 の態様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々は、抗体もしくは抗原結合断片、共
 刺激受容体の天然同族結合パートナー、アンチカリン (Anticalin) (操作されたりボカ
 リン)、ダルピン (Darpin)、フィノマー (Fynomer)、センチリン (Centyrin) (操
 作されたフィブロンネクチン (fibronectin) IIIドメイン)、シスチンノットドメイン、ア
 フィリン (Affilin)、アフィボディ (Affibody)、または操作されたCH3ドメインであ
 る。

20

【 0 4 3 5 】

いくつかの態様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々、例えば、第1のCRBR
 および第2のCRBRは、抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数のコピーを含む。い
 くつかの態様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々、例えば、第1の抗原結合ド
 メインおよび第2のCRBRは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、
 シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される
 抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数のコピーを含む。

30

40

【 0 4 3 6 】

いくつかの態様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々、例えば、第1のCRBR
 および第2のCRBRは、一本鎖抗体である。いくつかの例において、一本鎖は、scFv、scA
 b、シングルドメイン重鎖抗体、またはシングルドメイン軽鎖抗体である。いくつかの態
 様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々、例えば、第1のCRBRおよび第2のCRB
 Rは、一本鎖抗体である。いくつかの例において、一本鎖は、scFv、scAb、シングルドメ
 イン重鎖抗体、またはシングルドメイン軽鎖抗体である。

【 0 4 3 7 】

いくつかの態様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々、例えば、第1のCRBR
 および第2のCRBRは、1つまたは複数のシングルドメイン抗体 (sdAb) 断片、例えば V_H

50

H、 V_{NAR} 、操作された V_H または V_K ドメインを含む。 V_{HH} は、天然のラクダ科の動物の重鎖のみの抗体、重鎖のみの抗体を生成する遺伝子改変げっ歯類、またはナイーブな/合成のラクダ科もしくはヒト化されたラクダ科の動物のシングルドメイン抗体ライブラリーから作製することができる。 V_{NAR} は、軟骨魚類の重鎖のみの抗体から作製することができる。界面の操作および特定の生殖系列ファミリーの選択を含む、さまざまな方法が、従来のヘテロ二量体 V_H および V_K ドメインから単量体sdAbを作製するために実行されている。

【0438】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のCRBR、またはCRBRの独立した各々、例えば、第1のCRBRおよび/または第2のCRBRは、共刺激受容体に結合する少なくとも1つのsdAbまたはscFvを含む。いくつかの態様において、共刺激受容体に結合する少なくとも1つのscFvまたはsdAbは、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端のいずれかに位置づけることができる、共刺激受容体に結合するscFvまたはsdAbを1つだけ含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、共刺激受容体に結合する2つのscFvまたはsdAbを含む。

【0439】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）の V_H ドメイン、および共刺激受容体に結合するscFvまたはsdAbを含む第1のポリペプチドと；ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）の V_L ドメイン、および任意で、共刺激受容体に結合する別の、同じまたは異なるscFvまたはsdAbを含む第2のポリペプチドとを含む、2つのポリペプチドから形成されるかまたはそれらを含む。共刺激受容体に結合するscFvまたはsdAbは、ヘテロ二量体FcのFcポリペプチドに対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域の V_H もしくは V_L 鎖に対してカルボキシ末端に位置づけることができる。多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび/または第2のポリペプチドの少なくとも1つは、セクションII.4に記載されているようなTAAに結合する抗原結合ドメインまたはその鎖も含む。いくつかの態様において、TAAに結合する抗原結合ドメインは、scFvまたはsdAbであり、多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび/または第2のポリペプチドの一部として含まれる。いくつかの態様において、TAAに結合する抗原結合ドメインはFabであり、多重特異性ポリペプチド構築物は第3のポリペプチドから追加的に形成され、ここで、少なくとも第1のおよび第2のポリペプチドは、TAAに結合するFabの1つの鎖を含み（例えば、Fabの V_H -CH1または V_L -CL）、第3のポリペプチドは、TAAに結合するFabのもう一方の鎖を含む（例えば、Fabの V_H -CH1または V_L -CLのもう一方）。

【0440】

いくつかの態様において、CRBRまたはCRBRの独立した各々、例えば、第1のCRBRおよび/または第2のCRBRは、2つ以上の鎖を含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のCRBRまたはCRBRの独立した各々、例えば、第1のCRBRおよび/または第2のCRBRは、FABとして構築される V_H および V_L 配列を含む。

【0441】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインの独立した各々、例えば、第1の抗原結合ドメインおよび/または第2の抗原結合ドメインは、共刺激受容体に結合するFab抗体の V_H -CH1（Fd）および V_L -CLを含む。いくつかの態様において、 V_H -CH1（Fd）および V_L -CLを含むFab抗体は、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、共刺激受容体に結合する、 V_H -CH1（Fd）または V_L -CLを含むFab抗体を1つ

だけ含み、Fc領域に対してアミノ末端および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端のいずれかに位置づけることができる。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、一方がFc領域に対してアミノ末端に位置づけられかつもう一方がCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられている、共刺激受容体に結合する、それぞれがVH-CH1 (Fd) およびVL-CLを含む2つのFab抗体断片を含む。

【0442】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、および共刺激受容体に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLを含む第1のポリペプチドと；ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、および任意で、共刺激受容体に結合するFab抗体断片の同じVH-CH1 (Fd) またはVL-CLを含む第2のポリペプチドと；共刺激受容体に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのもう一方を含む第3のポリペプチドとを含む、3以上のポリペプチドから形成されるかまたはそれらを含む。多重特異性ポリペプチド構築物の第1の、第2の、および/または第3のポリペプチドは、DLL3 VHHドメイン、例えば記載されているいずれかも含み得る。

10

【0443】

いくつかの態様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体の天然（ネイティブな）同族結合パートナー（例えば、天然リガンド）、または共刺激受容体に対する結合活性を示すそのバリエーションであるかまたはそれを含む。

【0444】

いくつかの態様において、提供される多重特異性ポリペプチド構築物の1つまたは複数のCRBRは、T細胞上に発現している共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、共刺激受容体に結合する2以上のCRBRが存在し、CRBRの各々、例えば、第1のCRBRおよび第2のCRBRは、同じ共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、CRBRの各々、例えば、第1のCRBRおよびCRBRは、異なる共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、CRBRの各々、例えば、第1のCRBRおよび第2のCRBRは、同じ共刺激受容体上の異なるエピトープに結合する。いくつかの態様において、CRBRの各々、例えば、第1の抗原-CRBRおよびCRBRは、同じ共刺激受容体上の同じエピトープに結合する。

20

【0445】

いくつかの態様において、共刺激受容体に結合するCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体に対して一価、二価、三価、または四価の結合をもたらす。

30

【0446】

いくつかの態様において、共刺激受容体は、T細胞、例えば対象から得られた初代T細胞上に発現している。いくつかの態様において、共刺激受容体は、ヒトT細胞、例えばヒト対象から得られた初代ヒトT細胞上に発現している。

【0447】

いくつかの態様において、共刺激受容体は、腫瘍壊死因子（TNF）受容体ファミリーのメンバーである。いくつかの態様において、共刺激受容体は、免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）のメンバーである。いくつかの態様において、共刺激受容体は、受容体のB7ファミリーのメンバーである。

40

【0448】

いくつかの態様において、共刺激受容体は、41BB（CD137）、OX40（CD134）、CD27、グルコシルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質（GITR）、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体（BAFF-R）、B細胞成熟抗原（BCMA）、膜貫通アクチベーターおよびCAMLインタラクタ（TACI）、およびNKG2Dからなる群より選択される。いくつかの態様において、共刺激受容体は、41BB、OX40、GITR、ICOS、またはCD28から選択される。いくつかの態様において、共刺激受容体は、41BB、OX40、またはGITRから選択される。

【0449】

いくつかの態様において、共刺激受容体は41BBである。いくつかの態様において、共

50

刺激受容体はOX40である。いくつかの態様において、共刺激受容体はGITRである。いくつかの態様において、共刺激受容体はICOSである。いくつかの態様において、共刺激受容体はCD28である。

【0450】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチドのCRBRは、共刺激受容体に対するアゴニスト結合分子であるかまたはそれを含む。CRBRは、共刺激受容体に結合して、受容体の天然リガンドによって惹起、誘導、または刺激されるものと同様のまたはそれと同じ反応または活性を惹起、誘導、または刺激することができる。いくつかの局面において、共刺激受容体に対するCRBRの結合は、受容体の天然リガンドによって惹起、誘導、または刺激されるシグナルの5%を上回って、10%を上回って、20%を上回って、30%を上回って、40%を上回って、50%を上回って、60%を上回って、70%を上回って、80%を上回って、90%を上回って、または100%を上回って下流シグナルを誘導または刺激する。

10

【0451】

いくつかの態様において、1つまたは複数のCRBRは、共刺激受容体41BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD27、グルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質 (GITR)、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体 (BAFF-R)、B細胞成熟抗原 (BCMA) に結合する抗体またはその断片である。いくつかの態様において、1つまたは複数のCRBRは、共刺激受容体41BB、OX40、GITR、ICOS、またはCD28に結合する抗体またはその断片である。いくつかの態様において、1つまたは複数のCRBRは、共刺激受容体41BB、OX40、またはGITRに結合する抗体またはその断片である。41BB、OX40、およびGITRに結合するための例示的なポリペプチドはそれぞれ、PCT公報第WO2017123650号、同第WO2017123673号、および同第WO2017015623号に記載される。いくつかの態様において、1つまたは複数のCRBRは、共刺激受容体に結合するシングルドメイン抗体 (sdAb)、例えば、PCT公報第WO2017123650号、同第WO2017123673号、および同第WO2017015623号に記載されているものである。

20

【0452】

いくつかの例において、共刺激受容体結合領域 (CRBR) は、41BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD27、グルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質 (GITR)、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体 (BAFF-R)、B細胞成熟抗原 (BCMA)、膜貫通アクチベーターおよびCAMLインタラクタ (TACI)、NKG2Dの天然同族結合パートナーに結合するかまたはそれを含む。いくつかの態様において、天然同族結合パートナーは、41BBリガンド (41BBL)、OX40L (CD252)、CD70、GITRリガンド/TNFSF18、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、ICOSリガンド (ICOSL)、CD154 (CD40L)、B細胞活性化因子 (BAFF)、増殖誘導リガンド (APRIL)、NKG2Dリガンド、またはその機能性断片から選択される。

30

【0453】

いくつかの態様において、共刺激受容体結合領域 (CRBR) は、41BBに結合する抗体または抗原結合断片である。特定の例において、41BBに結合するCRBRはシングルドメイン抗体である。いくつかの態様において、sdAbは、CDR1 GFSFSINAMG (SEQ ID NO : 457に記載される)、CDR2 AIESGRNTV (SEQ ID NO : 458に記載される)、およびCDR3 LKGNRVVSPSVAY (SEQ ID NO : 459に記載される) を含む。41BBを標的とするsdAbの例は、PCT公報第WO2017123650号に記載される。

40

【0454】

CRBRの例示的な配列は表4に記載される。

【0455】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体41BBに結合する。いくつかの例において、CRBRは、41BBに特異的であるかまたはそれに結合する抗体または抗原結合断片、例えば、sdAbまたはVHおよびVLを含む断片 (例えば、scFv) であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも

50

1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、41BBの天然リガンドであるか、またはその機能性結合断片である。例示的な41BBに結合するCRBRは、SEQ ID NO : 186 ~ 210 および470のいずれかに記載される。いくつかの態様において、41BBに結合するCRBRは、細胞外ドメインもしくはその切断型部分、例えば、UniProt No. P41273のアミノ酸 50 ~ 254に対応する、例えば、SEQ ID NO : 186に記載の部分、またはSEQ ID NO : 202 ~ 209のいずれかに記載の切断型部分もしくはその断片を含む、41BBリガンド(41BBL)の機能性断片である。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、SEQ ID NO : 193 ~ 201のいずれか1つに記載のAnticalinである。いくつかの態様において、sdAb、例えばVHHは、SEQ ID NO : 457、458、および459に記載の配列をそれぞれ有するCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。41BBに結合するCRBR、例えばsdAbは、SEQ ID NO : 210に記載の配列を含むことができる。41BBに結合するCRBR、例えばsdAbは、SEQ ID NO : 470に記載の配列を含むことができる。いくつかの態様において、4-1BBに結合するドメインは、VHおよびVLを含む抗原結合抗体断片、例えば、VHおよびVL がリンカーによって分離されている一本鎖断片、例えばscFvを含む。いくつかの態様において、41BBに結合するCRBRは、SEQ ID NO : 187、189、および191のいずれかに記載のVH、ならびにSEQ ID NO : 188、190、または192のいずれかに記載のVLを含む。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中のCRBR、またはCRBRの独立した各々は、前述のSEQ ID NOのいずれかに対して少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、かつ41BBに結合することができる。

10

20

【0456】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体OX40に結合する。いくつかの例において、CRBRは、OX40に特異的であるかまたはそれに結合する抗体または抗原結合断片、例えば、sdAbまたはVHおよびVLを含む断片(例えば、scFv)であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、OX40の天然リガンドであるか、またはその機能性結合断片である。そのようなOX40に結合するCRBRの例は、SEQ ID NO : 211 ~ 220のいずれかに記載される。いくつかの態様において、OX40に結合するCRBRは、SEQ ID NO : 216および218のいずれかに記載のVH、ならびにSEQ ID NO : 217および219のいずれかに記載のVLを含む。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中のCRBR、またはCRBRの独立した各々は、前述のSEQ ID NOのいずれかに対して少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、かつOX40に結合することができる。

30

【0457】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体GITRに結合する。いくつかの例において、CRBRは、GITRに特異的であるかまたはそれに結合する抗体または抗原結合断片、例えば、sdAbまたはVHおよびVLを含む断片(例えば、scFv)であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、GITRの天然リガンドであるか、またはその機能性結合断片である。そのようなGITRに結合するCRBRの例は、SEQ ID NO : 221 ~ 230のいずれかに記載される。いくつかの態様において、GITRに結合するCRBRは、SEQ ID NO : 222、224、226、および228のいずれかに記載のVH、ならびにSEQ ID NO : 223、225、227、および229のいずれかに記載のVLを含む。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中のCRBR、またはCRBRの独立した各々は、前述のSEQ ID NOのいずれかに対して少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、かつGITRに結合することができる。

40

【0458】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体CD27に結合する。いくつかの例において、CRBRは、CD27に特異的であるか

50

またはそれに結合する抗体または抗原結合断片、例えば、sdAbまたはVHおよびVLを含む断片（例えば、scFv）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、CD27の天然リガンドであるか、またはその機能性結合断片である。そのようなCD27に結合するCRBRの例は、SEQ ID NO：231のいずれかに記載される。いくつかの態様において、CD27に結合するCRBRは、SEQ ID NO：232に記載のVHおよびSEQ ID NO：233に記載のVLを含む。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中のCRBR、またはCRBRの独立した各々は、前述のSEQ ID NOのいずれかに対して少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、かつCD27に結合することができる。

10

【0459】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体ICOSに結合する。いくつかの例において、CRBRは、ICOSに特異的であるかまたはそれに結合する抗体または抗原結合断片、例えば、sdAbまたはVHおよびVLを含む断片（例えば、scFv）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、ICOSの天然リガンドであるか、またはその機能性結合断片である。例示的なICOSに結合するCRBR配列は、SEQ ID NO：234に記載される。

【0460】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体CD28に結合する。いくつかの例において、CRBRは、CD28に特異的であるかまたはそれに結合する抗体または抗原結合断片、例えば、sdAbまたはVHおよびVLを含む断片（例えば、scFv）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、CD28の天然リガンドであるか、またはその機能性結合断片である。例示的なCD28に結合するCRBR配列は、SEQ ID NO：235に記載される。

20

【0461】

（表4）例示的なCRBR配列

CRBR	形式	参照	SEQ ID NO
41BB 結合 CRBR 配列			
41BBL	天然リガンド	UniProtアクセッション番号 P41273	186
PF-05082566	VH	US 2012/0237498 (SEQ ID NO: 43)	187
	VL	US 2012/0237498 (SEQ ID NO: 45)	188
BMS663513	VH	WO 2005/035584 (SEQ ID NO: 9)	189
	VL	WO 2005/035584 (SEQ ID NO: 6)	190
MSB7	VH	US 2017/0226215 (SEQ ID NO: 138)	191
	VL	US 2017/0226215 (SEQ ID NO: 28)	192
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 12)	193
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 13)	194
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 14)	195
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 15)	196
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 16)	197
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 17)	198
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 18)	199
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 19)	200
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 20)	201
ヒト41BBL の 71~254	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 3)	202

30

40

50

ヒト41BBL の 85~254	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 4)	203
ヒト41BBL の 80~254	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 5)	204
ヒト41BBL の 52~254	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 6)	205
ヒト41BBL の 71~248	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 7)	206
ヒト41BBL の 85~248	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 8)	207
ヒト41BBL の 80~248	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 9)	208
ヒト41BBL の 52~248	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 10)	209
41BB sdAb	sdAb	US 2017/0198050	210
41BB sdAb	sdAb		470
OX40 結合 CRBR配列			
OX40リガンド	天然リガンド	UniProtアクセッション番号 P23510	211
OX40リガンド	天然リガンド	US 7,959,925 (SEQ ID NO: 2)	212
ヒトOX40L: 51~183	天然リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 11)	213
ヒトOx40L: 51~183 N90D	天然リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 12)	214
ヒトOx40L: 52~183	天然リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 13)	215
1A07	VH	US 2015/0307617 (SEQ ID NO: 56)	216
	VL	US 2015/0307617 (SEQ ID NO: 59)	217
1949	VH	WO 2016/179517 (SEQ ID NO: 16)	218
	VL	WO 2016/179517	219
1D10v1	sdAb	US 9,006,399	220
GITR 結合 CRBR配列			
GITRリガンド	天然リガンド	UniProt 番号 Q9UNG2	221
36E5	VH	US 2014/0348841 (SEQ ID NO: 104)	222
	VL	US 2014/0348841 (SEQ ID NO: 105)	223
TRX-518	VH	US 2013/0183321 (SEQ ID NO: 54)	224
	VL	US 2013/0183321 (SEQ ID NO: 44)	225
5H7v2	VH	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 282)	226
	VL	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 134)	227
41G5v2	VH	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 312)	228
	VL	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 124)	229
C06v3	sdAb	US 2017/0022284 (SEQ ID NO: 59)	230
CD27 結合 CRBR配列			
CD70-ECD	天然リガンド	UniProt番号P32970	231
1F5	VH	US 2011/0274685	232
	VL	US 2011/0274685	233
CD28 結合 CRBR配列			
CD28 sdAb	sdAb		235
ICOS 結合 CRBR配列			
ICOS sdAb	sdAb		234

10

20

30

40

【 0 4 6 2 】

いくつかの態様において、1つまたは複数のCRBRは、リンカーを介して直接的にまたは間接的に、Fc領域および/またはCD3結合領域に連結される。いくつかの態様において、連結はリンカーを介する。いくつかの態様において、リンカーは、本明細書に記載されるような任意の可動性または剛性リンカーを含み得る、連結ペプチド(LP)であるが、概して、CRBRまたは領域を連結するペプチドは切断可能なリンカーではない。

【 0 4 6 3 】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、CRBRとFc領域との間に連結ペプチド(LP)を含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は

50

、CD3結合領域とCRBRとの間に連結ペプチド(LP)を含む。

【0464】

f. 抑制性受容体結合領域(IRBR)

本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、抑制性受容体に結合する1つまたは複数の抑制性受容体結合領域(IRBR)を含む。いくつかの態様において、提供される多重特異性ポリペプチド構築物の1つまたは複数のIRBRは、T細胞上に発現している抑制性受容体に結合する。いくつかの態様において、抑制性受容体は、活性化T細胞の表面上で上方制御、誘導、または発現される。いくつかの局面において、IRBRは、抑制性受容体とそのリガンドとの間の相互作用を遮断し、それによって、IRBRが結合する細胞、例えばT細胞における抑制性シグナルを低下、抑制、または低減させる。いくつかの態様において、IRBR、またはIRBRの独立した各々は、抗体または抗原結合断片、抑制性受容体の天然同族結合パートナー、Anticalin(操作されたりボカリン)、ダルピン、フィノマー、センチリン(操作されたフィブロネクチンIIIドメイン)、シスチンノットドメイン、アフィリン、アフィボディ、または操作されたCH3ドメインである。

10

【0465】

いくつかの態様において、IRBR、またはIRBRの独立した各々、例えば第1のIRBRおよび第2のIRBRは、抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数のコピーを含む。いくつかの態様において、IRBRまたはIRBRの独立した各々、例えば、第1のIRBRおよび第2のIRBRは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数のコピーを含む。

20

【0466】

いくつかの態様において、IRBR、またはIRBRの独立した各々、例えば、第1のIRBRおよび第2のIRBRは、一本鎖抗体である。いくつかの例において、一本鎖は、scFv、scAb、シングルドメイン重鎖抗体、またはシングルドメイン軽鎖抗体である。

【0467】

いくつかの態様において、IRBR、またはIRBRの独立した各々、例えば、第1のIRBRおよび第2のIRBRは、1つまたは複数のシングルドメイン抗体(sdAb)断片、例えば、V_HH、V_{NAR}、操作されたV_HまたはV_Kドメインを含む。V_HHは、天然のラクダ科の動物の重鎖のみの抗体、重鎖のみの抗体を生成する遺伝子改変げっ歯類、またはナイーブな/合成のラクダ科もしくはヒト化されたラクダ科の動物のシングルドメイン抗体ライブラリーから作製することができる。V_{NAR}は、軟骨魚類の重鎖のみの抗体から作製することができる。界面の操作および特定の生殖系列ファミリーの選択を含む、さまざまな方法が、従来のヘテロ二量体V_HおよびV_Kドメインから単量体sdAbを作製するために実行されている。

30

【0468】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のIRBR、またはIRBRの独立した各々、例えば、第1のIRBRおよび/または第2のIRBRは、抑制性受容体に結合する少なくとも1つのsdAbまたはscFvを含む。いくつかの態様において、抑制性受容体に結合する少なくとも1つのscFvまたはsdAbは、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置づけられる。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端のいずれかに位置づけることができる、抑制性受容体に結合するscFvまたはsdAbを1つだけ含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、抑制性受容体に結合する2つのscFvまたはsdAbを含む。

40

【0469】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片(例えば、Fv)のVHドメイン、および抑制性受容体に結合するscFvまたはsdAbを含む第1のポリペプチドと; ヘテ

50

ロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）のVLドメイン、および任意で、抑制性受容体に結合する別の、同じまたは異なるscFvまたはsdAbを含む第2のポリペプチドとを含む、2つのポリペプチドから形成されるかまたはそれらを含む。抑制性受容体に結合するscFvまたはsdAbは、ヘテロ二量体FcのFcポリペプチドに対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域のVHまたはVL鎖に対してカルボキシ末端に位置づけることができる。多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび/または第2のポリペプチドの少なくとも1つは、セクションII.4に記載されているようなTAAに結合する抗原結合ドメインまたはその鎖も含む。いくつかの態様において、TAAに結合する抗原結合ドメインは、scFvまたはsdAbであり、多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび/または第2のポリペプチドの一部として含まれる。いくつかの態様において、TAAに結合する抗原結合ドメインはFabであり、多重特異性ポリペプチド構築物は第3のポリペプチドから追加的に形成され、ここで、少なくとも第1のおよび第2のポリペプチドは、TAAに結合するFabの1つの鎖を含み（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CL）、第3のポリペプチドは、TAAに結合するFabのもう一方の鎖を含む（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CLのもう一方）。

【0470】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、以下の順に：TAAに特異的な第1の抗原結合ドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）のVHドメイン、およびTAAに特異的な第2の抗原結合ドメインを含む第1のポリペプチドと；IRBRを含みかつ以下の順でヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）のVLドメインを含む第2のポリペプチドとを含む、2つのポリペプチドから形成されるかまたはそれらを含み、ここで、IRBRは、Fc領域のアミノ末端に位置づけられる、かつ/またはCD3結合領域のC末端に位置づけられる。いくつかの態様において、IRBRは、第2のポリペプチド上でCD3結合領域のカルボキシ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、IRBRは、第2のポリペプチド上でFc領域のアミノ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、IRBRは、Fc領域のアミノ末端にかつCD3結合領域のC末端に位置づけられる。いくつかの態様において、第1のおよび第2の抗原結合ドメインは、TAAに特異的であり、同じである。いくつかの態様において、第1のおよび第2の抗原結合ドメインは、TAAに特異的であり、異なっている。いくつかの態様において、第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインは、異なるTAAに結合する。いくつかの態様において、第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインは、同じTAAの別個のまたは重複しないエピトープに結合するか、および/または同じTAAへの結合について競合する。

【0471】

いくつかの態様において、IRBRまたはIRBRの独立した各々、例えば、第1のIRBRおよび/または第2のIRBRは、2つ以上の鎖を含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のIRBRまたはIRBRの独立した各々、例えば、第1のIRBRおよび/または第2のIRBRは、FABとして構築されるVHおよびVL配列を含む。

【0472】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメインまたは抗原結合ドメインの独立した各々、例えば、第1の抗原結合ドメインおよび/または第2の抗原結合ドメインは、抑制性受容体に結合するFab抗体のVH-CH1（Fd）およびVL-CLを含む。いくつかの態様において、VH-CH1（Fd）およびVL-CLを含むFab抗体は、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端のいずれかに位置づけることができる、抑制性受容体に結合する、VH-CH1（Fd）またはVL-CLを含むFab抗体を1つだけ含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、一方がFc領域に対してアミノ末端に位置づけられかつもう一方がCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられている、抑制性受容体に結合する、それぞれが

10

20

30

40

50

VH-CH1 (Fd) および VL-CL を含む 2 つの Fab 抗体断片を含む。

【 0 4 7 3 】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、ヘテロ二量体 Fc 領域の第 1 の Fc ポリペプチド、リンカー、および抑制性受容体に結合する Fab 抗体断片の VH-CH1 (Fd) または VL-CL を含む第 1 のポリペプチドと；ヘテロ二量体 Fc 領域の第 2 の Fc ポリペプチド、リンカー、および任意で、抑制性受容体に結合する Fab 抗体断片の同じ VH-CH1 (Fd) または VL-CL を含む第 2 のポリペプチドと；抑制性受容体に結合する Fab 抗体断片の VH-CH1 (Fd) または VL-CL のもう一方を含む第 3 のポリペプチドとを含む、3 以上のポリペプチドから形成されるかまたはそれらを含む。多重特異性ポリペプチド構築物の第 1 の、第 2 の、および/または第 3 のポリペプチドは、セクション II.4 記載されているような TAA に結合する抗原結合ドメインまたはその鎖も含むことができる。いくつかの態様において、TAA に結合する抗原結合ドメインは、scFv または sdAb であり、多重特異性ポリペプチド構築物の第 1 のおよび/または第 2 のポリペプチドの一部として含まれる。いくつかの態様において、TAA に結合する抗原結合ドメインは Fab であり、多重特異性ポリペプチド構築物は、第 4 のポリペプチドから追加的に形成され、ここで、少なくとも第 1 のおよび第 2 のポリペプチドは、TAA に結合する Fab の鎖を含み（例えば、Fab の VH-CH1 または VL-CL）、第 4 のポリペプチドは、TAA に結合する Fab のもう一方の鎖を含む（例えば、Fab の VH-CH1 または VL-CL のもう一方）。

10

【 0 4 7 4 】

いくつかの態様において、IRBR、または IRBR の独立した各々は、抑制性受容体の天然（ネイティブな）同族結合パートナー（例えば、天然リガンド）、または抑制性受容体に対する結合活性を示すそのバリエーションであるかまたはそれを含む。

20

【 0 4 7 5 】

いくつかの態様において、提供される多重特異性ポリペプチド構築物の 1 つまたは複数の IRBR は、T 細胞上に発現している抑制性受容体に結合する。いくつかの態様において、抑制性受容体に結合する 2 以上の IRBR が存在し、IRBR のそれぞれ、例えば、第 1 の IRBR および第 2 の IRBR は、同じ共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、IRBR のそれぞれ、例えば、第 1 の IRBR および第 2 の IRBR は、異なる抑制性受容体に結合する。いくつかの態様において、IRBR のそれぞれ、例えば、第 1 の IRBR および第 2 の IRBR は、同じ抑制性受容体上の異なるエピトープに結合する。いくつかの態様において、IRBR のそれぞれ、例えば、第 1 の IRBR および第 2 の IRBR は、同じ抑制性受容体上の同じエピトープに結合する。

30

【 0 4 7 6 】

いくつかの態様において、抑制性受容体に結合する IRBR、または IRBR の独立した各々は、抑制性受容体に対して一価、二価、三価、または四価の結合をもたらす。

【 0 4 7 7 】

いくつかの態様において、抑制性受容体は、T 細胞、例えば対象の初代 T 細胞上に発現している。いくつかの態様において、抑制性受容体は、ヒト T 細胞、例えばヒト対象の初代ヒト T 細胞上に発現している。

【 0 4 7 8 】

いくつかの態様において、抑制性受容体は、腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体ファミリーのメンバーである。いくつかの態様において、抑制性受容体は、免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) のメンバーである。

40

【 0 4 7 9 】

いくつかの態様において、抑制性受容体は、プログラム細胞死タンパク質 1 (PD-1)、細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (CTLA-4)、Ig と ITIM ドメインとをもつ T 細胞免疫受容体 (TIGIT)、T 細胞活性化の V ドメイン免疫グロブリン抑制因子 (V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation) (VISTA)、T 細胞免疫グロブリンと ムチンドメイン含有 3 (TIM3)、またはリンパ球活性化遺伝子 3 (LAG3) である。いくつかの態様において、1 つまたは複数の IRBR は、抑制性受容体 PD-1、CTLA-4、TIGIT、

50

VISTA、TIM3、またはLAG3に結合する抗体またはその断片である。特定の態様において、抗体または抗原結合断片はヒト化されているか、またはヒトである。

【0480】

いくつかの例において、抑制性受容体結合領域（IRBR）は、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、またはTIM3の天然同族結合パートナーに結合するかまたはそれを含む。いくつかの態様において、天然同族結合パートナーは、PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、CD155、CD112、もしくはVSIG-3/IGSF11、またはその機能性断片から選択される。

【0481】

いくつかの例において、IRBRは、抑制性受容体、例えば、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、またはTIM3に結合する抗体の可変軽（VL）鎖および可変重（VH）鎖を含む抗体断片、例えばscFvを含む。いくつかの例において、IRBRは、例えば、PCT公報第WO2018068695号または同第WO2018068201号に記載される、抑制性受容体、例えば、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、またはTIM3に特異的に結合するシングルドメイン抗体またはVHHドメインを含む。

10

【0482】

いくつかの態様において、抑制性受容体はPD-1である。いくつかの態様において、1つまたは複数のIRBRは、PD-1に結合する抗体断片である。

【0483】

いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：417～433、439、もしくは489～506のいずれかから選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO：417～433、439、もしくは489～506のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列に含まれる、CDR1、CDR2、およびCDR3を含むPD-1に結合するVHHドメインであるかまたはそれを含む。

20

【0484】

いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：439に記載のVHHドメイン、またはSEQ ID NO：439に記載の選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列に含まれる、CDR1、CDR2、CDR3を含むVHHドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：439に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO：439に記載の選択されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列を有する、VHHドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：439に記載のアミノ酸配列のヒト化バリエーションであるVHHドメインであるかまたはそれを含む。

30

【0485】

いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO：434、435、または436のいずれか1つに記載のCDR1、SEQ ID NO：437に記載のCDR2、およびSEQ ID NO：438に記載のCDR3を含むVHHドメインを有する。

【0486】

いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO：435、437、および438にそれぞれ記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO：434、437、および438にそれぞれ記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO：436、437、および438にそれぞれ記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。

40

【0487】

いくつかの局面において、IRBRは、SEQ ID NO：417～433のいずれかから選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO：417～433のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97

50

%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列に含まれる、CDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインであるかまたはそれを含む。

【0488】

いくつかの場合において、IRBRは、SEQ ID NO：417～433のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO：417～433のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列を有する、ヒト化バリエーションであるVHHドメインを含む。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：417～433のいずれか1つに記載のアミノ酸の配列を有するヒト化VHHドメインであるVHHドメイン配列であるかまたはそれを含む。

10

【0489】

いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：489に記載のVHHドメイン、またはSEQ ID NO：489に記載の選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列に含まれる、CDR1、CDR2、CDR3を含むVHHドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：489に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO：489に記載の選択されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列を有する、VHHドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：489に記載のアミノ酸配列のヒト化バリエーションであるVHHドメインであるか、またはそれを含む。

20

【0490】

いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO：434、435、または436のいずれか1つに記載のCDR1、SEQ ID NO：437に記載のCDR2、およびSEQ ID NO：438に記載のCDR3を含むVHHドメインを有する。

【0491】

いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、それぞれ、SEQ ID NO：435、437、および438に記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、それぞれ、SEQ ID NO：434、437、および438に記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、それぞれ、SEQ ID NO：436、437、および438に記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。

30

【0492】

いくつかの局面において、IRBRは、SEQ ID NO：490～506のいずれかから選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO：490～506のいずれかから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列に含まれる、CDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインであるかまたはそれを含む。

【0493】

いくつかの場合において、IRBRは、SEQ ID NO：490～506のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO：490～506のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列を有する、ヒト化バリエーションであるVHHドメインを含む。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：490～506のいずれか1つに記載のアミノ酸の配列を有するヒト化VHHドメインであるVHHドメイン配列であるか、またはそれを含む。

40

【0494】

いくつかの態様において、1つまたは複数のIRBRは、Fc領域および/またはCD3結合領域に、リンカーを介して直接的にまたは間接的に連結される。いくつかの態様において、連結はリンカーを介する。いくつかの態様において、リンカーは、セクションII.3などに

50

記載されるような任意の可動性または剛性リンカーを含むことができる、連結ペプチド (LP) であるが、概してIRBRまたは領域を連結するペプチドは切断可能なリンカーではない。

【0495】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、IRBRとFc領域との間に連結ペプチド (LP) を含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3結合領域とIRBRとの間に連結ペプチド (LP) を含む。

【0496】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、2以上のIRBRを含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、第1のIRBRとFc領域との間に第1の連結ペプチド (LP1) を含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3結合領域と第2のIRBRとの間に第2の連結ペプチド (LP2) を含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、第1のIRBRとFc領域との間に第1の連結ペプチド (LP1) およびCD3結合領域と第2のIRBRとの間に第2の連結ペプチド (LP2) を含む。いくつかの局面において、多重特異性ポリペプチド構築物は、N末端からC末端へ以下の構造配置を有する：IRBRおよび/または抗原結合ドメイン-LP1-Fc領域-リンカー-CD3結合領域-LP2-IRBRおよび/または抗原結合ドメイン。いくつかの態様において、2つの連結ペプチドは互いに同一ではない。

【0497】

いくつかの態様において、LP (例えば、LP1またはLP2) は独立して、約1~20アミノ酸の長さのペプチドである。いくつかの態様において、LP1またはLP2は独立して、SEQ ID NO: 1~4、125~127、129に記載のような任意のGly-Serリンカー、またはGGGであるかまたはそれを含む、ペプチドである。

【0498】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、CRBRおよびIRBRの両方を含む。いくつかの態様において、CRBRまたはIRBRの一方は、Fc領域に対してアミノ末端に位置づけられ、CRBRまたはIRBRのもう一方は、多重特異性ポリペプチド構築物のCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、CRBRおよびIRBRは、ポリペプチドの少なくとも1つがTAAに特異的な少なくとも1つの抗原結合ドメインも含んでいる、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の異なるポリペプチドに存在する。いくつかの態様において、CRBRおよびIRBRは、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の同じポリペプチド (第1のポリペプチド) に存在し、TAAに特異的な少なくとも1つの抗原結合ドメインは、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物のもう一方の (または第2の) ポリペプチド上である。

【0499】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、2つのポリペプチドから形成されるか、またはそれらを含む。いくつかの局面において、第1のポリペプチドは、以下の順で：TAAに特異的な第1の抗原結合ドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片 (例えば、Fv) のVHドメイン、およびTAAに特異的な第2の抗原結合ドメインを含み；かつ第2のポリペプチドは、以下の順で：IRBRまたはCRBRの一方、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片 (例えば、Fv) のVLドメイン、およびIRBRまたはCRBRのもう一方を含む。いくつかの態様において、IRBRは、第2のポリペプチド上でCD3結合領域のカルボキシ末端に位置づけられ、CRBRは、第2のポリペプチド上でFc領域のアミノ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、IRBRは、第2のポリペプチド上でFc領域のアミノ末端に位置づけられ、CRBRは、第2のポリペプチド上でCD3結合領域のカルボキシ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、第1のおよび第2の抗原結合ドメインは、TAAに特異的であり、同じである。いくつかの態様において、第1のおよび第2の抗原結合ドメインは、TAAに特異的であり、異なっている。いくつかの態様において、第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインは、異なるTAAに結合する。いくつか

10

20

30

40

50

の態様において、第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインは、同じTAAの別個のまたは重複しないエピトープに結合するか、および/または同じTAAへの結合について競合する。

【0500】

3. NK動員

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、本明細書において提供される少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、およびナチュラルキラー（NK）細胞上に発現している表面分子に結合するかつ/またはNK細胞を動員することができる少なくとも1つの追加の結合分子であるかまたはこれらを含む二重特異性構築物である。特定の局面において、多重特異性構築物は、DLL3およびNK細胞表面分子に対して二重特異性である。いくつかの態様において、表面分子はCD16（Fc RIII）である。特に、提供される二重特異性DLL3結合ポリペプチドは、ヒトNK細胞上に発現しているNK活性化受容体、例えばヒトCD16aに特異的に結合することができる。

10

【0501】

抗体依存性細胞傷害（ADCC）に関与することが公知の、一部のIgGのFc部分に対する低親和性受容体である、CD16は、NK細胞による標的細胞溶解の誘発を担う、最もよく特徴がわかっている膜受容体である（Mandelboim et al., 1999, PNAS 96:5640-5644）。一般に、ヒトNK細胞の大部分（およそ90%）は、CD56を低密度で（CD56dim）およびFc RIII（CD16）を高レベルで発現する（Cooper et al., 2001, Trends Immunol. 22:633-640）。ヒトFc RIIIは、それらの細胞外免疫グロブリン結合領域において96%の配列同一性を共有する、2種類のアイソフォーム、CD16a（Fc RIIIA）およびCD16b（Fc RIIIB）として存在する（van de Winkel and Capel, 1993, Immunol. Today 14(5):215-221）。特定の態様において、追加の結合分子は、CD16aに特異的に結合することができる。

20

【0502】

CD16aは、マクロファージ、マスト細胞、およびNK細胞上に膜貫通受容体として発現される。NK細胞上で、CD16aの鎖は、Fc RI鎖および/またはT細胞受容体（TCR）/CD3鎖を含有する免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ITAM）と会合して、シグナル伝達を媒介する（Wirthmueller et al., 1992, J. Exp. Med. 175:1381-1390）。CD16aと、および鎖のホモ二量体およびヘテロ二量体のさまざまな組み合わせとの相互作用は、NK細胞で観察されており、NK細胞においてCD16a複合体のバリエーションを介するさまざまなシグナル伝達経路を介してシグナル伝達を媒介することができることを示唆する（Anderson et al., 1990, PNAS 87(6):2274-2278; Ackerly et al., 1992, Int. J. Cancer Suppl. 7:11-14）。Fc R発現エフェクター細胞は、ADCCを介する腫瘍細胞の破壊に関与することが示されている。例えば、CD16aと、例えばCD16aに特異的に結合できるアゴニスト結合分子等とのエンゲージメントは、CD16aを発現するNK細胞の活性化をもたらすことができ、それによって、生物学的反応、特にシグナル伝達反応を誘発する。いくつかの場合において、結合分子は、そのような細胞へのその結合のために、抗体依存性細胞傷害（ADCC）と類似した方法で、細胞殺傷を誘発することができる。

30

【0503】

特定の例において、DLL3結合ポリペプチドは、抗原を持つ細胞がNK細胞媒介性細胞殺傷を介して根絶され得るように、DLL3およびCD16aに特異的に結合できる二重特異性分子を含み、NK細胞をそのような抗原を持つ細胞に標的指向させてもよい。例えば、腫瘍細胞上に発現しているDLL3に特異的に結合する結合分子は、NK細胞を腫瘍細胞に標的指向させ得る。いくつかの場合において、CD16aに結合する結合分子によって引き起こされるNK細胞の活性化は、腫瘍細胞の殺傷をもたらすことができる。

40

【0504】

いくつかの態様において、CD16aなどの活性化NK細胞受容体に特異的な追加の結合ドメインは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、ジスルフィド安定化Fv断片（dsFv）、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体（VHH）、またはシングルドメイン軽鎖抗

50

体から選択される抗原結合断片である。いくつかの態様において、追加の結合ドメインは、CD16aなどの活性化T NK細胞受容体への結合について一価である。

【0505】

いくつかの場合において、追加の結合ドメインはCD16aを認識する。いくつかの態様において、抗CD16a結合ドメインは、抗CD16a Fab断片、抗CD16a F(ab')₂断片、抗CD16a Fv断片、抗CD16a scFv、抗CD16a dsFv、抗CD16a scAb、抗CD16a dAb、抗CD16aシングルドメイン重鎖抗体(VHH)、および抗CD16aシングルドメイン軽鎖抗体の1つまたは複数のコピーを含む。いくつかの態様において、抗CD16a結合ドメインは、CD16aへの結合について一価である。いくつかの態様において、BH73結合ポリペプチドは、BH73に結合しかつCD16aの活性をアゴナイズする二重特異性構築物である。

10

【0506】

CD16aに特異的な抗体およびその抗原結合断片は公知であり、例えば、NM3E2を含む(McCall et al. (1999) Mol. Immunol., 36:433-045)。他の抗CD16a抗体もまた、本明細書において提供される構築物において用いることができ、それらには、公開米国特許出願第US10160280795号；米国特許第9,701,750号；Behar et al. (2008) Protein Eng Des Sel. 21:1-10；Arndt et al., (1999) Blood 94:2562-2568に記載のいずれかが含まれる。特定の例において、抗CD16aは抗CD16a scFvである。いくつかの態様において、抗CD16aは、TandAb分子中に含まれる抗CD16a抗体である(例えば、Reush et al. (2014) Mabs, 6:727-738を参照)。いくつかの局面において、抗CD16aは、米国特許第9,035,026号に記載の抗CD16aまたは抗原結合断片、例えばscFvである。

20

【0507】

提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、および活性化NK細胞受容体に特異的な少なくとも1つの追加のドメイン、例えばCD16a結合ドメインを含む複数の形式のいずれかの形式で作製することができる。

【0508】

1つの態様において、二重特異性構築物は、NK細胞活性化受容体、例えば、CD16aに特異的なFab抗原結合断片、例えば抗CD16a Fabに直接的にまたは間接的に連結される、記載されるような少なくとも1つのDLL3 VHHドメインを含む、二重特異性シングルドメイン抗体連結Fab(S-Fab)である。いくつかの態様において、DLL3 VHHドメインは、抗CD16a FabのVHまたはVL鎖のC末端に連結される。いくつかの態様において、S-Fabは、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド(HPMA)コポリマー、タンパク質(例えばアルブミン)、ポリグルタミン酸、またはPAS化によるコンジュゲーションによって、さらに改変することができる(Pan et al. (2018) International Journal of Nanomedicine, 2018:3189-3201)。

30

【0509】

別の態様において、二重特異性構築物は、構築物が、NK細胞活性化受容体、例えばCD16aに特異的な抗原結合ドメインのVHおよびVLを含むscFvに直接的にまたは間接的に連結される、記載されるような少なくとも1つのDLL3 VHHを含んでいる、scFv-シングルドメイン抗体である。NK細胞活性化受容体に対するscFv、例えば抗CD16a scFvは、記載されるようなVHおよびVL配列のいずれかを含むことができる。いくつかの態様において、VHHドメインおよびscFvは、ペプチドリンカーなどのリンカーによって連結される。いくつかの態様において、ペプチドリンカーは、本明細書において記載されるようなペプチドリンカーであり得る。いくつかの態様において、VHHドメインおよびscFvはそれぞれ、Fc領域、例えばFc領域のN末端に、任意でヒンジ領域またはリンカー(例えば、ペプチドリンカー)を通じて、連結される。Fc領域は、本明細書において記載されるいずれか、例えば、ヒトFc領域またはそのバリエーション、例えば、ヒトIgG1 Fc領域またはそのバリエーションであり得る。特定の例において、Fc領域は、異なるポリペプチドを二量体化してヘテロ二量体を得ることができるヘテロ二量体化を促進するように変異または改変されている、バリエーションFcドメイン、例えば、バリエーションヒトIgG1ドメインにより形成される。

40

【0510】

50

さらなる態様において、NK細胞活性化受容体、例えばCD16aに特異的な抗原結合ドメインは、シングルドメイン抗体、例えば、CD16aに特異的に結合するVHHドメインである。CD16aに結合するVHHドメインを含む、シングルドメイン抗体は公知である、例えば、公開米国特許出願第US20160280795号を参照。そのような局面において、本明細書において提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つのDLL3 VHHドメインおよび少なくとも1つのCD16a VHHドメインを含むことができる。構築物の形式設定では、いくつかの場合において、各VHHドメインは、任意でヒンジ領域またはリンカー（例えば、ペプチドリッカー）を通じて、Fc領域、例えばFc領域のN末端に連結される。Fc領域は、本明細書において記載されるいずれか、例えばヒトFc領域またはそのバリエーション、例えばヒトIgG1 Fc領域またはそのバリエーションであり得る。特定の例において、Fc領域は、異なるポリペプチドを二量体化してヘテロ二量体を得ることができるヘテロ二量体化を促進するように変異または改変されている、バリエーションFcドメイン、例えばバリエーションヒトIgG1ドメインにより形成される。

【0511】

上記態様において、ヘテロ二量体化を促進するFc領域の例示的な改変は公知であり、以下、例えば表3に記載のいずれかを含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 103、107、115、117、440、または446のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcのもう一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 104、108、111、113、119、121、441、444、または448のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 105、109、116、118、442、または447のいずれかに記載のアミノ酸の配列を踏み、ヘテロ二量体Fcのもう一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 106、110、112、114、120、122、443、445、または449のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含む。

【0512】

4. サイトカイン融合および/またはサイトカイン受容体ターゲティング

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、サイトカイン-抗体融合タンパク質（DLL3 VHH-サイトカイン融合とも呼ばれる）である多重特異性ポリペプチド構築物である。いくつかの局面において、本明細書において提供される少なくとも1つのDLL3 VHHドメインは、少なくとも1つのサイトカイン、例えばインターフェロンに、直接的にまたは間接的に連結される。特定の態様において、サイトカインは、抗増殖活性、アポトーシス活性、および/または抗ウイルス活性を示すことができる、インターフェロンである。いくつかの態様において、本明細書において提供されるDLL3 VHH-サイトカイン融合のインターフェロンは、IFNAR1および/またはIFNAR2で構成される受容体に結合することができる。さまざまなアッセイのいずれかが、IFNAR1および/もしくはIFNAR2への結合、がん細胞の成長速度および/もしくは増殖速度の低下もしくは減少、腫瘍サイズの低下、腫瘍の除去、またはがん細胞の死の誘導（例えば、アポトーシスを介して）に対するそのような融合タンパク質の作用を評価するために用いることができる。そのようなアッセイには、DLL3を発現することが公知の種々のがん細胞株を用いたインビトロアッセイまたは動物腫瘍モデルを利用するインビボアッセイが含まれる。

【0513】

いくつかの態様において、インターフェロンは、I型インターフェロン、例えばヒトI型インターフェロンまたはそのバリエーションである。いくつかの局面において、ヒトI型インターフェロンは、切断型ヒトI型インターフェロンまたはヒト変異I型インターフェロンであるバリエーションである。いくつかの態様において、I型インターフェロンまたはそのバリエーションは、野生型ヒトIFN- α （IFN- α ； 2および天然高親和性バリエーション、例えば 14）、インターフェロン（IFN- β ）、ならびにその変異体および/または切断型である。いくつかの態様において、インターフェロンは、II型インターフェロン、例えばヒトII型インターフェロンまたはそのバリエーションである。いくつかの局面において、ヒトII型インターフェロンは、切断型ヒトII型インターフェロンまたはヒト変異II型インターフェロンであ

るバリエーションである。いくつかの態様において、II型インターフェロンまたはそのバリエーションは、野生型ヒトインターフェロン（IFN- γ ）ならびにその変異体および/または切断型である。いくつかの態様において、提供されるサイトカイン-抗体融合タンパク質は、DLL3を発現または過剰発現する標的細胞（例えば、がん細胞）の成長および/または増殖を抑制するために用いることができる。

【0514】

いくつかの態様において、DLL3 VHH-サイトカイン融合タンパク質は、国際PCT公開出願第WO2014194100号；米国特許出願第9,803,021号；Valedkarimi et al. (2017) Biomed Pharmacother., 95:731-742；またはYoung et al. (2014) Semin Oncol., 41:623-636に記載されるいずれかと形式において類似する。

10

【0515】

特定の態様において、インターフェロン、例えば、I型インターフェロン、例えばヒトI型インターフェロン（例えば、IFN- α 、IFN- β 、またはIFN- γ ）は、好ましくは、ネイティブな野生型インターフェロン（その単離された形態で）の少なくとも60%のレベル、または少なくとも80%もしくは少なくとも約80%、例えば、少なくとも90%、95%、98%、99%、100%のレベルで、またはそれを上回るレベルで、ネイティブなまたは野生型インターフェロンの内因性結合親和性および/または活性を持つものである。

【0516】

インターフェロンおよびインターフェロン変異体は、周知でありかつよく特徴付けられているサイトカインのグループである（例えば、WO 2002/095067；WO 2002/079249；WO 2002/101048；WO 2002/095067；WO 2002/083733；WO 2002/086156；WO 2002/083733；WO 2003/000896；WO 2002/101048；WO 2002/079249；WO 2003/000896；WO 2004/022593；WO2004/022747；WO 2003/023032；WO 2004/022593、さらにKim et al. (2003) Cancer Lett. 189(2): 183-188；Hussain et al. (2000) J. Interferon Cytokine Res. 20(9): 763-768；Hussain et al. (1998) J. Interferon Cytokine Res. 18(7): 469-477；Nyman et al. (1988) Biochem. J. 329 (Pt 2): 295-302；Golovleva et al. (1997) J. Interferon Cytokine Res. 17(10): 637-645；Hussain et al. (1997) J. Interferon Cytokine Res. 17(9): 559-566；Golovleva et al. (1997) Hum. Hered. 47(4): 185-188；Kita et al. (1991) J. Interferon Cytokine Res. 17(3): 135-140；Golovleva et al. (1996) Am. J. Hum. Genet. 59(3): 570-578；Hussain et al. (1996) J. Interferon Cytokine Res. 16(7): 523-529；Linge et al. (1995) Biochim Biophys Actaを参照）。そのようなもののいずれかは、提供されるサイトカイン-抗体融合タンパク質において用いることができる。

20

30

【0517】

いくつかの態様において、インターフェロンはヒトI型インターフェロンである。ヒトインターフェロンファミリーの遺伝子/タンパク質のアレルは公知であり、例えば、Pestka (1983) Arch Biochem Biophys., 221:1-37；Diaz et al. (1994) Genomics, 22:540-52；Pestka (1986) Meth. Enzymol, 199: 3-4；およびKrause et al. (2000) J. Biol. Chem., 275:22995-3004を参照のこと。

40

【0518】

いくつかの態様において、インターフェロンは、全長IFN- α （例えば、ヒトIFN- α ）、全長IFN- β （例えば、ヒトIFN- β ）、または全長IFN- γ （例えば、ヒトIFN- γ ）である。いくつかの態様において、インターフェロンは、生物学的に活性な切断型 IFN- α （例えば、ヒトIFN- α ）、生物学的に活性な切断型 IFN- β （例えば、ヒトIFN- β ）、または生物学的に活性な切断型 IFN- γ （例えば、ヒトIFN- γ ）である。いくつかの態様において、生物学的に活性な切断型インターフェロンは、N末端および/またはC末端で切断されており、かつネイティブなまたは野生型インターフェロンの少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、もしくはそれを上回る長さ、または少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、もしくはそれを

50

上回る長さを含む、野生型のまたはネイティブなインターフェロンのアミノ酸の連続した配列を含む。インターフェロンの生物学的活性を評価するためのさまざまな標準的なアッセイのいずれかを用いることができる。例えば、IFN- 活性は、特定の検査ウイルスに対する抗ウイルス活性を測定することによってアッセイできる。IFN- 活性についてアッセイするためのキットは市販されている（例えば、Neutekbio, IrelandによるILITE(商標) alphabetaキットを参照）。いくつかの局面において、IFN- は、IFN-a2a（例えば、Acc. No. CAA23805）、IFN-a-c（Acc. No. P01566）、IFN-a-d（Acc. No. AAB59403）；IFNa-5（Acc. No. CAA26702）；IFNa-6（Acc. No. AA26704）；IFNa-4（Acc. No. NP_066546）；IFNa-4b（Acc. No. CAA26701）；IFNa-I（Acc. No. AAA52725）；IFNa-J（Acc. No. CAA23792）；IFNa-H（Acc. No. CAA23794）；IFNa-F（Acc. No. AAA52718）；IFNa-7（Acc. No. CAA26903）であるか、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの局面において、IFN- は、Acc. No. AAC41702に記載のIFN- であるか、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの局面において、IFN- は、Acc. No. P01579に記載のIFN- であるか、またはその生物学的に活性な断片である。

【0519】

いくつかの態様において、提供されるDLL3 VHH-サイトカイン融合物は、バリエーションまたは変異体インターフェロン 2（IFNa2）を含むことが企図される。ある特定の変異体には、57位にあるHis、および/または58位にあるE、および/または61位にあるQの変異が含まれる。ある特定の態様において、変異体は、変異H57Y、および/またはE58N、および/またはQ61Sを含む。ある特定の態様において、変異体は、変異H57Y、E58N、およびQ61S（YNS）を有する変異IFNa2を含む（例えば、Kalie et al. (2007) J. Biol. Chem., 282: 11602-11611を参照）。他の態様において、変異体は、57位にあるHis、および/または58位にあるE、および/または61位にあるQのA（アラニン）への変異を含む。ある特定の態様において、変異体は、変異H57A、E58A、およびQ61A（HEQ）を有する変異IFNa2を含む（例えば、Jaitin et al. (2006) Mol. Cellular Biol, 26(5): 1888-1897を参照）。ある特定の態様において、変異体インターフェロンは、57位にあるHisのA、Y、もしくはMへの変異、および/または58位にあるEのA、もしくはN、もしくはD、もしくはLへの変異、および/または61位にあるQのA、もしくはS、もしくはL、もしくはDへの変異を含む。[0244] ある特定の態様において、変異体は、インターフェロン 8（IFN-a8）の変異体、例えば、R145のV、I、もしくはLへの、および/またはA146のN、もしくはSへの、および/またはM149のYへのアミノ酸置換に対応するアミノ酸置換、例えば、R145V/A146N/M149Y）、R145I/A146S/M149Y、またはR145L/A146S/M149Yを有するバリエーションを含む（例えば、Yamamoto et.al. (2009) J. Interferon & cytokine Res, 29: 161-170を参照）。

【0520】

いくつかの態様において、提供されるDLL3 VHH-サイトカイン融合物は、アミノ酸 17にある天然に生じるシステインに対して置換されたセリンを含む変異体またはバリエーションIFN- を含む（例えば、Hawkins et al. (1985) Cancer Res., 45, 5914-5920を参照）。

【0521】

いくつかの態様において、提供されるDLL3 VHH-サイトカイン融合物は切断型インターフェロンを含む。1つの態様において、切断型インターフェロンは、ネイティブなまたは野生型のヒトIFN- の活性を保持することが示されている、最大で、最初の15個のアミノ末端アミノ酸残基、および/または、最大で、最後の10～13個のカルボキシル末端アミノ酸残基の欠失を有するヒトIFN- を含む（例えば、Ackerman (1984) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 81: 1045-1047を参照）。いくつかの態様において、切断型ヒトIFN- は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13個のカルボキシル末端アミノ酸残基が欠失されている、および/または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のアミノ末端アミノ酸残基が欠失されている。

【0522】

いくつかの態様において、提供されるDLL3 VHH-サイトカイン融合物は、切断型インターフェロン、例えば、公開米国特許出願第US2009/0025106号に記載されるものを含む。いくつかの態様において、提供されるDLL3 VHH-サイトカイン融合物は、N末端および/またはC末端の欠失を含む切断型IFN- γ 、例えば、Lundell et al. (1991) Protein N eg., 4:335-341; Pan et al. (1987) Eur. J. Biochem., 166:145-149; WOに記載されるものを含む。

【0523】

いくつかの態様において、インターフェロン、例えばヒトインターフェロンは、改変されていない、典型的には野生型のタンパク質と比較して、タンパク質分解に対して抵抗性を有する変異体インターフェロンである、例えば、米国特許第7,998,469号；米国特許第8,052,964号；米国特許第4,832,959号；米国特許第6,120,762号；WO1992/008737；およびEP219781を参照。

10

【0524】

提供されるDLL3 VHH-サイトカイン融合タンパク質の局面において、抗体およびサイトカイン、例えば、インターフェロンは、直接的に結合されるか、またはペプチドリナーなどのリンカーを介して間接的に結合される。結合が抗体のDLL3への結合を妨げない限り、結合は、VHHドメインのN末端またはC末端に対するものであり得る。本明細書において記載される任意のリンカー、例えばペプチドリナーを用いることができる。いくつかの態様において、リンカーは、GGSGGS、即ち、(GGG)₂ (SEQ ID NO: 1); GGSGSGGS、即ち、(GGG)₃ (SEQ ID NO: 2); GGSGSGSGSGGS、即ち、(GGG)₄ (SEQ ID NO: 3); および GGSGSGSGSGSGGS、即ち、(GGG)₅ (SEQ ID NO: 4)

20

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むGSリンカーである。いくつかの態様において、リンカーは、グリシン残基を含む可動性リンカー、例えば、非限定的な例として、GG, GGG, GGGG (SEQ ID NO: 5), GGGGG (SEQ ID NO: 6), および GGGGGG (SEQ ID NO: 7)

である。いくつかの態様において、融合タンパク質は、GSリンカーとグリシンリンカーとの組み合わせを含み得る。

30

【0525】

D. キメラ受容体および操作された細胞

本明細書において、本明細書において提供されるDLL3 VHHドメイン、例えば本明細書において提供されるDLL3 VHHドメインの配列のいずれか、の1つまたは複数を含む、細胞外ドメインを有するキメラ抗原受容体 (CAR) が、提供される。本明細書において提供されるCAR構築物は、1つまたは複数のDLL3 VHHを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達領域を含む。CARの抗原結合ユニットを形成する1つまたは複数のDLL3 VHHドメインは、十分な親和性でDLL3、すなわち、標的に「結合する」かまたは「結合することができ」、そのようなCARは、DLL3を発現する細胞または組織を標的とする療法において有用である。

40

【0526】

CARは、単一の融合分子において1つまたは複数のシグナル伝達ドメインと会合し、かつT細胞などの細胞の表面上に発現している細胞外ターゲティング/結合部分を典型的に含む合成受容体である。したがって、CARは、単一の融合分子において、抗原特異性特性とT細胞活性化特性を組み合わせている。第1世代CARは典型的には、それらのシグナル伝達ドメインとしてCD3 またはFc γ 1受容体 鎖の細胞質領域を含んだ。第1世代CARは、卵巣がん、腎がん、リンパ腫、および神経芽腫を有する患者における第I相臨床試験で試験されており、中程度の奏効をもたらしている (Sadelain et al., Curr Opin Immunol, 21 (2): 215-223, 2009において概説される)。第2世代CARは、共刺激分子のシグナル伝

50

達ドメイン、例えばCD28、およびCD3 を含み、活性化シグナルおよび共刺激シグナルの直接の組み合わせに対する二重シグナル伝達を提供する。第3世代CARは、3以上のシグナル伝達ドメインを有し、より複雑である (Sadelain et al., Cancer Discovery (3), 388-398, 2013 and Dotti et al, Immuno. Rev, 257 (1), 1-36, 2014において概説される)。

【0527】

いくつかの態様において、提供されるCARは、DLL3を標的とするかまたはDLL3に特異的に結合することができるDLL3 VHHドメインを含む少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。いくつかの態様において、CARは、1つまたは複数の抗原を標的とする少なくとも2つの抗原結合ドメイン (少なくとも1つはDLL3 VHHドメインを含む) を含む。1つの態様において、CARの抗原結合ドメインは、DLL3に特異的な2つのまたは少なくとも2つのDLL3 VHHドメインを含み、よって、二価結合分子を提供する。1つの態様において、抗原結合ドメインは、DLL3に特異的であるが、該抗原上の異なるエピトープに結合する、2つのまたは少なくとも2つのDLL3 VHHドメインを含む。そのような場合において、抗原結合ドメインは、DLL3の第1のエピトープに結合する第1のDLL3 VHHドメインおよびDLL3の第2のエピトープに結合する第2の VHHドメインを含む。エピトープは重複していてもよい。よって、いくつかの態様において、抗原結合ドメインはバイパラトピック (biparatopic) であり、CARはバイパラトピックCARである。さらに別の態様において、抗原結合ドメインは、DLL3に特異的でありかつDLL3上の同じエピトープに結合する、2つのDLL3 VHHドメインを含む。

【0528】

本明細書において提供されるCARの膜貫通ドメインは、典型的には細胞膜を横断するかまたは細胞膜を横断もしくは貫通することができ、かつ細胞外抗原結合ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインを含む小胞体部分とに直接的にまたは間接的に (例えば、免疫グロブリンヒンジ配列などのスペーサーを介して) 連結される、ドメインである。1つの態様において、CARの膜貫通ドメインは、膜貫通タンパク質 (例えば、I型膜貫通タンパク質) の膜貫通領域、人工疎水性配列、またはそれらの組み合わせである。1つの態様において、膜貫通ドメインは、CD3 ドメインまたはCD28膜貫通ドメインを含む。他の膜貫通ドメインは、当業者に明らかであり、本明細書で提供されるCARの態様に関連して用いられ得る。

【0529】

本明細書において提供されるCARの細胞内シグナル伝達領域は、CARの抗原結合ドメインのエンゲージメント時に、例えば、抗原への結合時に、シグナルをT細胞に伝達する1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、細胞内領域は、ITAMシグナル伝達ドメインであるかまたはそれを含む、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。例示的な細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、T細胞受容体複合体の鎖に由来するシグナル伝達ドメインまたはそのホモログのいずれか (例えば、鎖、FcγR1y および 鎖、MB 1 (Iga) 鎖、B29 (Ig) 鎖等)、ヒトCD3 鎖、CD3ポリペプチド (、 および)、sykファミリーチロシンキナーゼ (Syk、ZAP 70等)、srcファミリーチロシンキナーゼ (Lck、Fyn、Lyn等)、ならびにT細胞伝達に関与する他の分子、例えば、CD2、CD5、OX40、およびCD28が挙げられる。特定の態様において、細胞内シグナル伝達領域は、ヒトCD3 鎖に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0530】

いくつかの態様において、エンドドメインはCD3- シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、CD3- シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 236に記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 236に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%またはそれを上回る配列同一性示しかつT細胞シグナル伝達の活性を保持するアミノ酸の配列を含む。

【0531】

いくつかの態様において、CARの細胞内シグナル伝達領域は、共刺激分子に由来する細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含むことができる。そのような例において、そのようなシグナル伝達ドメインは、例えば、シグナル伝達ドメイン、例えばCD3を含むITAMのみを含むCARと比較して、抗原特異的エンゲージメント後に、増殖の増強、メモリー細胞の生存および/または発生などを介して、CAR-T細胞活性を増強し得る。いくつかの態様において、共刺激ドメインは、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、またはそれらの組み合わせから選択されるタンパク質から得られる機能性シグナル伝達ドメインである。特定の態様において、共刺激シグナル伝達ドメインは、ヒトタンパク質に由来するか、またはそれから得られる。いくつかの局面において、共刺激シグナル伝達ドメインは、ヒトCD28またはヒトCD137(4-1BB)に由来するか、またはそれから得られる。

10

【0532】

いくつかの態様において、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28または4-1BBに由来し、かつSEQ ID NO: 237~240のいずれかに記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 237~240に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%またはそれを上回る配列同一性を示しかつT細胞共刺激シグナル伝達の活性を保持する、アミノ酸の配列を含む。

【0533】

特定の態様において、CARは、細胞外抗原結合ドメインおよび膜貫通ドメインを連結するヒンジまたはスペーサー領域をさらに含む。このヒンジまたはスペーサー領域は、その結果生じるCARのさまざまな長さおよび可動性を達成するために用いることができる。用いることができるヒンジまたはスペーサー領域の例としては、これらに限定されないが、抗体のFc断片またはその断片もしくは誘導体、抗体のヒンジ領域またはその断片もしくは誘導体、抗体のCH2領域、抗体のCH3領域、人工スペーサー配列、例えばペプチド配列、またはそれらの組み合わせが挙げられる。他のヒンジまたはスペーサー領域は、当業者に明らかであり、用いられ得る。1つの態様において、ヒンジはIgG4ヒンジまたはCD8Aヒンジである。

20

【0534】

いくつかの態様において、スペーサーおよび膜貫通ドメインは、ヒンジ、およびCD8に由来する膜貫通ドメイン、例えば、SEQ ID NO: 241~243に記載の例示的な配列またはSEQ ID NO: 241~243に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を有する膜貫通ドメインである。

30

【0535】

本明細書において、本明細書において提供されるようなCARをコードする少なくとも1つの核酸を含む単離された核酸構築物もまた提供される。いくつかの局面において、構築物は、細胞におけるCARの発現用の発現ベクターである。発現ベクターはウイルスベクターであってもよい。ウイルスベクター技術は本技術分野において周知であり、例えば、Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2013)に記載される。いくつかのウイルスに基づくシステムが、哺乳動物細胞内への遺伝子導入のために開発されている。例えば、レトロウイルス、例えばアデノウイルスベクターが用いられる。1つの態様において、レンチウイルスベクターが用いられる。

40

【0536】

さらなる局面において、上記に記載のような1つまたは複数の核酸構築物を含む単離された細胞または細胞集団もまた提供される。本明細書において提供されるCARを発現するように遺伝子改変されている単離された細胞または細胞集団もまた提供される。よって、本明細書において提供されるCARを含む、例えば安定的に発現する、遺伝子操作された細胞が本明細書において提供される。1つの態様において、細胞は、T細胞、ナチュラルキラ

50

ー（NK）細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、制御性T細胞、造血性幹細胞、および/または多能性胚性/人工幹細胞からなる群より選択される。いくつかの場合において、細胞は、T細胞、例えばCD4および/またはCD8 T細胞である。いくつかの態様において、細胞は、対象に対して自家性である。例えば、いくつかの態様において、T細胞は、CAR核酸構築物による操作、例えば、トランスフェクションまたは形質導入のために患者から単離されてもよい（初代T細胞とも呼ばれる）。

【0537】

例示的な例において、初代T細胞は、エクスピボで精製され（CD4細胞もしくはCD8細胞または両方）、TCR/CD28アゴニスト、例えば抗CD3/抗CD28コーティングビーズで刺激され得る。2日または3日の活性化プロセス後、CARをコードする組換え発現ベクターを、標準的なレンチウイルスまたはレトロウイルス形質導入プロトコルまたはプラスミドエレクトロポレーション戦略を通じて初代T細胞内に安定に導入することができる。細胞は、例えば、抗エピトープタグまたはネイティブな親分子と交差反応する抗体を用いるフローサイトメトリーによって、CAR発現についてモニターすることができる。CARを発現するT細胞は、抗エピトープタグ抗体によるソーティングを通じて濃縮されるか、または適用に応じて高発現または低発現について濃縮され得る。

【0538】

CAR操作されたT細胞は、さまざまな手段によって適切な機能についてアッセイすることができる。いくつかの場合において、インピトロでの細胞傷害性、増殖、またはサイトカインアッセイ（例えば、IFN- 発現）を、操作されたT細胞の機能を評価するために用いることができる。例示的な標準的なエンドポイントは、腫瘍株のパーセント溶解、操作されたT細胞の増殖、または培養上清中のIFN- タンパク質の発現である。いくつかの場合において、例えば抗原を介する、CARの刺激時のT細胞の活性化を刺激する能力は、例えば、活性化マーカー、例えば、CD69、CD44、もしくはCD62Lの発現、増殖および/またはサイトカイン産生をモニターすることによって、評価することができる。

【0539】

本明細書において、本明細書において提供されるCARを含む操作された細胞を対象に投与する工程を含む、対象における疾患または状態、例えばがんの予防および/または処置のための方法も提供される。一般に、対象は、疾患または状態について処置の必要がある対象である。本発明の細胞および/または薬学的組成物の薬学的に活性な量。

【0540】

IV. ポリペプチド発現および生成

提供されるsdAbおよびDLL3結合ポリペプチドのいずれかをコードするポリペプチドを含む核酸分子が提供される。いくつかの態様において、提供される核酸配列および特にDNA配列は、本明細書において提供される融合タンパク質をコードする。前述の態様のいずれかにおいて、核酸分子は、DLL3結合ポリペプチドの分泌に導くリーダー配列もコードしてもよく、該リーダー配列は典型的には、分泌されたポリペプチド中に存在しないように切断される。リーダー配列は、ネイティブな重鎖（またはVHH）のリーダー配列であってもよく、または別の異種リーダー配列であってもよい。

【0541】

核酸分子は、当技術分野において通常の組換えDNA技術を用いて構築することができる。いくつかの態様において、核酸分子は、選択された宿主細胞での発現に適している発現ベクターである。

【0542】

本明細書に記載されるDLL3結合ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターが提供される。そのようなベクターとしては、これらに限定されないが、DNAベクター、ファージベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター等が挙げられる。いくつかの態様において、ベクターは、選択され、所望の細胞型、例えば、CHOもしくはCHO由来細胞、またはNSO細胞におけるポリペプチドの発現について最適化される。例示的なそのようなベクターは、例えば、Running Deer et al., Biotechnol. Prog. 20:880-889 (200

10

20

30

40

50

4)において記載される。

【0543】

特に、所望のDLL3結合ポリペプチド、例えば融合タンパク質をコードするDNAベクターは、本明細書に記載されるDLL3結合ポリペプチドを調製する方法を促進するため、および有意量を得るために用いることができる。DNA配列は、適切な発現ベクター、すなわち、挿入されるタンパク質コード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含むベクター内に挿入することができる。多種多様な宿主-ベクター系が、タンパク質コード配列を発現させるために利用され得る。これらには、ウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等）に感染させた哺乳動物細胞系；ウイルス（例えば、バキュロウイルス）に感染させた昆虫細胞系；微生物、例えば、酵母ベクターを含有する酵母、またはバクテ

10

【0544】

本開示はまた、細胞が、本明細書に記載されるDLL3結合ポリペプチドをコードする単離された核酸分子、および/またはこれらの単離された核酸配列を含むベクターを含んでいて、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ってDLL3結合ポリペプチドを生成する方法も提供する。

【0545】

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、原核細胞、例えば、細菌細胞；または真核細胞、例えば、真菌細胞（酵母など）、植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞において発現され得る。そのような発現は、例えば、当技術分野において公知の手法により、行われ得る。ポリペプチドを発現させるために用いられ得る例示的な真核細胞には、これらに限定されないが、COS 7細胞を含むCOS細胞；293-6E細胞を含む293細胞；CHO-S、DG44、Lec13 CHO細胞、およびFUT8 CHO細胞を含むCHO細胞；PER.C6（登録商標）細胞（CruCell）；ならびにNSO細胞が挙げられる。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは酵母において発現させてもよい。例えば、米国公報第US 2006/0270045 A1号を参照。いくつかの態様において、具体的な真核生物宿主細胞は、ポリペプチドに対して望ましい翻訳後修飾を行うその能力に基づいて選択される。例えば、いくつかの態様において、CHO細胞は、293細胞で産生された同じポリペプチドより高いシリアル化レベルを有するポリペプチドを産生する。

20

30

【0546】

所望の宿主細胞内への1つまたは複数の核酸（例えばベクター）の導入は、これらに限定されないが、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染等を含む、任意の方法によって達成され得る。非限定的な例示的な方法は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載される。核酸は、任意の適した方法により、望ましい宿主細胞において一過性にまたは安定的にトランスフェクトされ得る。

【0547】

本明細書に記載される核酸またはベクターのいずれかを含む宿主細胞もまた提供される。いくつかの態様において、本明細書に記載されるDLL3結合ポリペプチドを発現する宿主細胞が提供される。宿主細胞において発現されるDLL3結合ポリペプチドは、任意の適した方法によって精製することができる。そのような方法には、これらに限定されないが、親和性マトリクスまたは疎水性相互作用クロマトグラフィーの使用が挙げられる。適切な親和性リガンドには、ROR1 ECD、およびFc領域に結合する作用物質が含まれる。例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、または抗体親和性カラムが、Fc領域に結合するためおよびFc領域を含むDLL3結合ポリペプチドを精製するために用いられ得る。疎水性相互作用クロマトグラフィー、例えば、ブチルまたはフェニルカラムもまた、抗体などの一部のポリペプチドを精製するのに適している場合がある。イオン交換クロマト

40

50

グラフィー（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーおよび/または陽イオン交換クロマトグラフィー）もまた、抗体などの一部のポリペプチドを精製するのに適している場合がある。ミックスモードクロマトグラフィー（例えば、逆相/陰イオン交換、逆相/陽イオン交換、親水性相互作用/陰イオン交換、親水性相互作用/陽イオン交換等）もまた、抗体などの一部のポリペプチドを精製するのに適している場合がある。ポリペプチドを精製する多数の方法が当技術分野において公知である。

【0548】

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、無細胞系で産生される。非限定的な例示的な無細胞系は、例えば、Sitaraman et al., *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo et al., *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003)に記載される。

10

【0549】

いくつかの態様において、上記に記載される方法によって作製されるDLL3結合ポリペプチドが提供される。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは宿主細胞において作製される。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは無細胞系で作製される。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドは精製される。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドを含む細胞培養培地が提供される。

【0550】

いくつかの態様において、上記に記載される方法によって作製される抗体を含む組成物が提供される。いくつかの態様において、組成物は、宿主細胞において作製されたDLL3結合ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、組成物は、無細胞系で作製されたDLL3結合ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、組成物は、精製されたDLL3結合ポリペプチドを含む。

20

【0551】

V. 薬学的組成物および製剤

本明細書において提供されるDLL3結合ポリペプチドのいずれかまたはそれと同じものを発現する操作された細胞を含む薬学的組成物が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチド、例えば、本開示の融合タンパク質（本明細書においてとも「活性化化合物」呼ばれる）、ならびにその誘導体、断片、類似体、およびホモログが、投与に適した薬学的組成物内に取り込まれ得る。いくつかの態様において、本明細書において提供されるDLL3結合ポリペプチドを含むキメラ受容体、例えばキメラ抗原受容体を発現する操作された細胞が、投与に適した薬学的組成物内に取り込まれ得る。

30

【0552】

そのような組成物は典型的には、薬学的に許容される担体を含む。本明細書において用いられる場合、用語「薬学的に許容される担体」は、薬学的投与に適合性のある、任意かつ全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などを含むことが意図される。適切な担体は、参照により本明細書に組み入れられる、この分野における標準的な参考書であるRemington's *Pharmaceutical Sciences*の最新版に記載される。そのような担体または希釈剤の適した例には、これらに限定されないが、水、生理食塩水、リンガー液、デキストロース液、および5%ヒト血清アルブミンが含まれる。リポソームおよび非水性ビヒクル、例えば固定油もまた用いられ得る。薬学的に活性な物質に対するそのような媒体および作用物質の使用は当技術分野において周知である。従来の媒体または作用物質が活性化化合物に不適合である場合を除いて、組成物におけるその使用が企図される。補足の活性化化合物もまた、組成物内に組み入れることができる。

40

【0553】

本開示の薬学的組成物は、その目的とする投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、腫瘍内、経口（例えば、吸入）、経皮（すなわち、局所）、経粘膜、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下適用で用いられる溶液または懸濁液としては、以下の構成成分：無菌希釈剤、例えば、注射用の水、食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロ

50

ピレングリコール、または他の合成溶媒；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）；緩衝剤、例えば、アセタート、シトレート、またはホスフェート、および張度調節用の作用物質、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロースを挙げることができる。pHは、酸または塩基、例えば、塩酸または水酸化ナトリウムによって調整することができる。非経口製剤は、ガラスまたはプラスチックから作られたアンプル、使い捨て可能な注射器、または複数用量バイアルに封入することができる。

【0554】

注射での使用に適した薬学的組成物は、無菌水性溶液剤（水溶性である場合）または分散剤、および無菌の注射液もしくは分散剤の即時調製用の無菌粉剤を含む。静脈内投与では、適した担体は、生理学的食塩水、静菌水（bacteriostatic water）、CREMOPHOREL（商標）（BASF, Parsippany, N.J.）、またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）を含む。全ての場合において、組成物は、無菌でなければならず、容易に注射可能な程度に流動性であるべきである。それは、製造および保存の条件下に安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）およびそれらの適した混合物を含有する溶媒または分散媒であることができる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用により、分散剤の場合には必要とされる粒径の維持により、および界面活性剤の使用により、維持することができる。微生物の作用の阻止は、種々の抗バクテリア剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等により達成することができる。多くの場合において、組成物中に等張剤、例えば糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能な組成物の吸収の延長は、吸収を遅延する作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に含ませることにより、もたらしすることができる。

【0555】

無菌の注射液は、必要とされる量での活性成分を適切な溶媒中に、必要に応じて、上記に列挙した成分の一つまたは組み合わせと共に組み入れ、その後続けてる過滅菌を行うことによって調製することができる。一般に、分散剤は、基本的な分散媒と上記に列挙したものから必要とされるその他の成分とを含む滅菌ビヒクルの中に活性化化合物を組み入れることによって調製される。無菌の注射液の調製用の滅菌粉末の場合、調製の方法は、予め滅菌ろ過したその溶液から任意の付加的な望ましい成分を加えた活性成分の粉末をもらす真空乾燥法および凍結乾燥法である。

【0556】

経口用組成物は概して、不活性希釈剤または食用の担体を含む。それらはゼラチンカプセルの中に封入されるか、または錠剤に圧縮され得る。治療的な経口投与を目的として、活性化化合物を賦形剤と共に組み入れて、錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で 사용할ことができる。経口組成物はまた、口腔洗浄剤として用いるために液体担体を使用して調製することもでき、ここで、液体担体中の化合物は経口的に適用され、かつ口内でゆすがれ（swished）、かつ嚥下されまたは嚥下される。薬学的に適合する結合剤および/またはアジュバント物質を、組成物の一部として含めることができる。この錠剤、丸剤、カプセル、トローチなどは、以下の成分のいずれか、または類似の性質の化合物を含むことができる：結合剤、例えば、微結晶性セルロース、トラガカントゴム、もしくはゼラチン；賦形剤、例えば、でんぷんもしくはラクトース、崩壊剤、例えば、アルギン酸、Primogel、もしくはとうもろこしでんぷん；滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムもしくはStearate；流動促進剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、例えば、スクロースもしくはサッカリン；または香味剤、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ風味。

【0557】

10

20

30

40

50

吸入による投与では、化合物は、適した噴射剤、例えば二酸化炭素などの気体を含有する加圧容器もしくは分注器、または噴霧器からエアロゾルスプレイの形態で送達される。

【0558】

全身投与は、経粘膜的または経皮的な手段によるものとすることもできる。経粘膜投与または経皮投与では、透過されるべきバリアに対して適切な浸透剤が製剤中に用いられる。そのような浸透剤は一般に当技術分野において公知であり、例えば、経粘膜投与では、界面活性剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻腔用スプレイまたは坐剤の使用により達成することができる。経皮投与では、活性化合物は、当技術分野において一般に公知である軟膏剤、膏薬、ゲル、またはクリームに製剤化される。

【0559】

化合物はまた、坐剤（例えば、カカオバターまたは他のグリセリドなど通常の坐剤基剤と共に）または直腸送達用の停留浣腸の形態でも調製することができる。

【0560】

1つの態様において、活性化合物は、インプラントおよびマイクロカプセル化した送達系を含む、体内からの迅速除去に対して化合物を保護する担体、例えば、放出制御製剤と共に調製される。生体分解性の生体適合性高分子、例えば、エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸を用いることができる。そのような製剤の調製のための方法は当業者に明らかである。その材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc.から商業的に入手することもできる。リポソーム懸濁剤もまた、薬学的に許容される担体として用いることができる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されているような、当業者に公知の方法により調製することができる。

【0561】

投与の容易さおよび投与量の均一性のために、経口または非経口組成物を投与量単位形態で製剤化することが特に有利である。投与量単位形態は、本明細書において用いられる場合、処置される対象にとって単一投与量として適した物理的に分離した単位を指し；各単位は、必要とされる薬学的担体と関連して所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化合物を含有する。本開示の投与量単位形態の規格は、活性化合物の特有の特徴および達成されるべき特定の治療効果、ならびに個々人の処置向けのそのような活性化合物の調剤の分野における固有の制限によって決定づけられ、それらに直接的に依拠する。

【0562】

薬学的組成物は、キット、容器、パッケージ、または分注器の中に投与のための指示書と一緒に含めることができる。これらの薬学的組成物は、診断用キット中に使用のための指示書と共に含めることができる。

【0563】

薬学的組成物は、特定の適用の処置または予防に有効な量で投与される。治療の有効量は典型的には、処置される対象の体重、対象の身体的状態もしくは健康状態、処置される状態の広範さ、または処置される対象の年齢によって決まる。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重～約50 mg/kg 体重の範囲の量で投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重～約50 mg/kg 体重の範囲の量で投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重～約20 mg/kg 体重の範囲の量で投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約0.5 mg/kg 体重～約20 mg/kg 体重の範囲の量で投与され得る。

【0564】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約10 mg ～約1,000 mg の範囲の量で投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約20 mg ～約500 mg の範囲の量で投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約20 mg ～約300 mg の範囲の量で投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約20 mg ～約200 mg の範囲の量で投与され得る。

10

20

30

40

50

【0565】

薬学的組成物は、必要に応じて対象に投与され得る。いくつかの態様において、有効用量の薬学的組成物は、対象に1回または複数回投与される。種々の態様において、有効用量の薬学的組成物は、1ヶ月に1回、1ヶ月に1回未満、例えば、2ヶ月毎、3ヶ月毎、または6ヶ月毎に、対象に投与される。他の態様において、有効用量の薬学的組成物は、1ヶ月に1回を上回って、例えば、2週間毎、毎週、週に2回、週に3回、毎日、または1日当たり複数回、投与される。有効用量の薬学的組成物は、対象に少なくとも1回投与される。いくつかの態様において、有効用量の薬学的組成物は、少なくとも1ヶ月、少なくとも6ヶ月、または少なくとも1年の期間を含み、複数回投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、必要とする対象に投与され、状態の1つまたは複数の症状を軽減する。

10

【0566】

VI. 処置および使用の方法

本明細書に記載されるDLL3結合ポリペプチドまたはそれと同じものを発現する操作された細胞は、さまざまな治療的、診断的、および予防的適用で有用である。例えば、DLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、対象におけるさまざまな疾患および障害を処置するのに有用である。そのような方法および使用には、例えば、疾患、状態、または障害、例えば、腫瘍またはがんを有する対象への分子もしくは操作された細胞、またはそれと同じものを含有する組成物の投与を伴う、治療的方法および使用が挙げられる。いくつかの態様において、分子または操作された細胞は、疾患または障害の処置をもたらすのに有効な量で投与される。使用には、そのような方法および処置における、ならびにそのような治療方法を行うための医薬の調製における、DLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞を含む分子の使用が含まれる。いくつかの態様において、方法は、疾患または状態を有するかまたは有することが疑われる対象にDLL3結合ポリペプチドもしくは操作された細胞、またはそれと同じものを含む組成物を投与することによって行われる。いくつかの態様において、方法は、それによって、対象における疾患または状態または障害を処置する。

20

【0567】

1つの態様において、本開示のDLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、治療剤として用いられてもよい。そのような剤は一般に、対象における疾患または病態を診断、予後を予測、モニター、処置、軽減、および/または予防するために利用される。治療レジメンは、標準的な方法を用いて対象、例えば、障害を患っている（または発症するリスクがある）ヒト患者または他の哺乳動物を同定することによって行われる。いくつかの場合において、DLL3を発現する腫瘍を有することが知られている、それが疑われる、またはそれが特定されている、対象が選択される。DLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞が対象に投与される。DLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞が対象に投与され、その標的との結合のために概して作用を有する。

30

【0568】

いくつかの態様において、提供されるDLL3ポリペプチド多重特異性ポリペプチド構築物または操作された細胞は、例えば、細胞におけるCD3のエンゲージメントおよび/またはCD3シグナルなどによって、対象に投与されると免疫応答を調節する、例えば増加することができる。いくつかの態様において、提供される多重特異性構築物もしくは操作された細胞、またはその薬学的組成物の治療的有效量を投与することによって、対象における免疫応答を調節する方法が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、免疫応答を調節する方法は、対象における免疫応答を増加または増強する。例えば、増加または増強された応答は、細胞性免疫の増加であってもよい。いくつかの例において、方法は、T細胞活性、例えば細胞溶解性T細胞（CTL）活性を増加させる。いくつかの態様において、調節された（例えば、増加された）免疫応答は腫瘍またはがんに対する。

40

【0569】

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチド、例えば、Fc領域を含有するDLL3-Fc融合タンパク質または多重特異性構築物の投与は、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領

50

域によるFc Rのエンゲージメントを介して自然免疫細胞を活性化し得る。そのような多重特異性ポリペプチド構築物の投与は、ADCC、サイトカイン放出、脱顆粒、および/またはADCPを含む、自然免疫細胞エフェクター機能をアゴナイズ、刺激、活性化、および/または増加させ得る。制約付き多重特異性ポリペプチド構築物の場合、そのような多重特異性ポリペプチド構築物の投与は、第1の構成成分と第2の構成成分とを連結するリンカーがプロテアーゼによって切断されると、かつ/または標的細胞（例えば、腫瘍細胞）上のDLL3に結合すると、T細胞を活性化し、それによって、抗CD3結合部分をT細胞上のCD3に結合させ得る。いくつかの場合において、多重特異性ポリペプチド構築物の投与は、CD3媒介性T細胞活性化、細胞傷害性、サイトカイン放出、および/または増殖をアゴナイズ、刺激、活性化、および/または増加させ得る。

10

【0570】

いくつかの態様において、提供される方法は、提供されるDLL3結合ポリペプチドもしくは操作された細胞またはその薬学的組成物のいずれかの治療的有効量を投与することによって、対象における疾患または状態を処置するためのものである。いくつかの態様において、疾患または状態は腫瘍またはがんである。一般に、疾患または障害の軽減または処置は、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を緩和することを伴う。例えば、がんの場合、薬物の治療的有効量は、以下の1つまたは組み合わせを達成することができる：がん細胞の数の低減；腫瘍サイズの低減；末梢器官内へのがん細胞浸潤の抑制（すなわち、ある程度まで減少および/または停止）；腫瘍転移の抑制；腫瘍成長をある程度まで抑制；および/またはがんに関連する症状の1つまたは複数にある程度まで軽減。いくつかの態様において、本開示の組成物は、対象、例えば、ヒトまたは他の哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、コンパニオンアニマル（例えば、ネコ、イヌ、ウマ）、家畜、使役動物（work animal）、動物園の動物、における疾患または障害の発症または再発を予防するために用いることができる。対象および患者という用語は、本明細書において互換的に用いられる。

20

【0571】

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドもしくは操作された細胞、またはその薬学的組成物は、哺乳動物がん細胞（例えばヒトがん細胞）の成長を抑制するために用いることができる。がんを標的とする方法は、がんを有する対象に本明細書に記載される薬学的組成物のいずれかの有効量を投与する工程を含むことができる。有効量の薬学的組成物は、がんの進行を抑制、停止、または元に戻すために投与することができる。ヒトがん細胞はインビボまたはエキスピボで処置することができる。ヒト患者のエキスピボ処置では、がん細胞を含有する組織または体液が体外で処置され、次いで、組織または体液が患者に再導入される。いくつかの態様において、がんは、患者内への治療組成物の投与によって、ヒト患者のインビボで処置される。

30

【0572】

疾患の非限定的な例としては、がんの全ての種類（乳房、肺、結腸直腸、前立腺、黒色腫、頭頸部、膵臓等）、関節リウマチ、クローン病、SLE、心血管損傷、虚血等が挙げられる。例えば、適用には、T細胞急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）を含む白血病、多発性骨髄腫を含むリンパ芽球性疾患、ならびに肺のがん、結腸直腸のがん、前立腺のがん、膵臓のがん、およびトリプルネガティブ乳がんを含む乳房のがんを含む固形腫瘍が挙げられる。例えば、適用には、初代腫瘍起源に関係なく、がんにおける骨の疾患または転移；非限定的例として、ER/PR+乳がん、Her2+乳がん、トリプルネガティブ乳がんを含む乳がん；結腸直腸がん；子宮内膜がん；胃がん（gastric cancer）；神経膠芽腫；食道がんなど頭頸部がん；非限定的例として、非小細胞肺がんなどの肺がん；多発性骨髄腫卵巣がん；膵臓がん；前立腺がん；骨肉腫などの肉腫；非限定的例として、腎細胞がんなどの腎がん；および/または非限定的例として、扁平上皮がん、基底細胞がん、もしくは黒色腫などの皮膚がんが含まれる。いくつかの態様において、がんは扁平上皮がんである。いくつかの態様において、がんは皮膚扁平上皮がんである。いくつかの態様において、がんは食道扁平上皮がんである。いくつかの態様において、がんは頭頸部扁平上皮がんである。い

40

50

くつかの態様において、がんは肺扁平上皮がんである。

【0573】

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドもしくは操作された細胞、またはその薬学的組成物は、がんまたは他の腫瘍性状態の症状を処置、軽減する、がんまたは他の腫瘍性状態を寛解させる、および/またはその進行を遅らせるのに有用である。いくつかの態様において、がんは、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、卵巣がん、前立腺がん、精巣がん、食道がん、消化管がん、脾臓がん、結腸直腸がん、結腸がん、腎臓がん、頭頸部がん、肺がん、胃がん (stomach cancer)、胚細胞がん、骨がん、肝臓がん、甲状腺がん、皮膚がん、中枢神経系の腫瘍、リンパ腫、白血病、骨髄腫、肉腫、およびウイルス関連がんである。ある特定の態様においてがんは、転移性がん、難治性がん、または再発がんである。

10

【0574】

いくつかの態様において、本開示のDLL3結合ポリペプチド、例えば融合タンパク質または多重特異性ポリペプチド構築物の治療的有效量は概して、治療目的を達成するのに必要とされる量に関係する。典型的には、投与されるべき本開示の組成物の正確な量は、患者 (患者) の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、および状態における個体差を考慮した上で医師によって決定することができる。

【0575】

いくつかの態様において、治療的有效用量は、非限定的例として、約0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重 ~ 約10 mg/kg 体重であり得る。いくつかの態様において、治療的有效用量は、非限定的例として、約0.01 mg/kg 体重 ~ 約5 ~ 10 mg/kg 体重であり得る。一般的な投与頻度は、例えば、1日2回から週に1回の範囲であり得る。

20

【0576】

いくつかの態様において、本開示の操作された細胞組成物の治療量が投与される。一般に、本明細書に記載されるような操作された細胞、例えばT細胞を含む薬学的組成物は、これらの範囲内の全ての整数値を含む、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞/ kg 体重、例えば $10^5 \sim 10^6$ 細胞/ kg 体重の投与量で投与され得ると言うことができる。操作された細胞組成物、例えばT細胞組成物はまた、これらの投与量で複数回投与されてもよい。細胞は、免疫療法で一般に知られている注入技術を用いることによって投与することができる (例えば、Rosenberg et al, New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988を参照)。特定の患者向けの最適な投与量および処置レジメンは、疾患の徴候について患者をモニターし、それによって処置を調整することによって、医学分野の当業者によって容易に決定することができる。

30

【0577】

処置の効能は、特定の障害を診断または処置するための任意の公知の方法に関連して決定される。望ましい特異性を持つDLL3結合ポリペプチドまたはそれと同じものを含有する操作された細胞のスクリーニングのための方法としては、これらに限定されないが、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) および当技術分野において公知の他の免疫を介する技術が挙げられる。提供されるDLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞の投与が、望ましくない免疫応答を媒介するかまたは媒介することができる免疫細胞を排除、隔離、もしくは不活性化すること；防御免疫応答を媒介するかまたは媒介することができる免疫細胞を誘導、生成、もしくは活性化すること；免疫細胞の物理的または機能的特性を変化させること；またはこれらの作用の組み合わせによって、免疫学的活性を十分に調節するかどうかを決定するための、多種多様な手段が公知である。免疫学的活性の調節の測定の例としては、これらに限定されないが、免疫細胞集団の有無の検査 (フローサイトメトリー、免疫組織化学的検査、組織学的検査、電子顕微鏡検査、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR))；シグナルに応答して増殖または分裂する能力またはそれに対する抵抗性を含む、免疫細胞の機能的能力の測定 (例えば、抗CD3抗体、抗T細胞受容体抗体、抗CD28抗体、カルシウムイオノフォア、PMA (ホルボール12-ミリストート13-アセート)、ペプチドまたはタンパク質抗原を積載した抗原提示細胞による刺激後の3H-チミジン組み込みに基づくT細胞増殖アッセイおよびペプスキャン分析；B細胞増殖アッセイを用いて)；他の細胞を

40

50

殺傷または溶解する能力の測定（細胞傷害性T細胞アッセイなど）；サイトカイン、ケモカイン、細胞表面分子、抗体、および細胞の他の産物の測定（例えば、フローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着検定法、ウエスタンブロット解析、タンパク質マイクロアレイ分析、免疫沈降分析による）；免疫細胞の活性化または免疫細胞内のシグナル伝達経路の生化学的マーカーの測定（例えば、チロシン、セリン、またはスレオニンリン酸化、ポリペプチド切断、およびタンパク質複合体の形成または解離のウエスタンブロット解析および免疫沈降分析；プロテインアレイ分析；DNAアレイまたはサブトラクティブハイブリダイゼーションを用いるDNA転写プロファイリング）；アポトーシス、ネクローシス、または他のメカニズムによる細胞死の測定（例えば、アネキシンV染色、TUNELアッセイ、DNAラダーを測定するためのゲル電気泳動、組織学的検査；蛍光発生カスパーゼアッセイ、カスパーゼ基質のウエスタンブロット解析）；免疫細胞によって生成された遺伝子、タンパク質、および他の分子の測定（例えば、ノーザンブロット解析、ポリメラーゼ連鎖反応、DNAマイクロアレイ、タンパク質マイクロアレイ、2次元ゲル電気泳動、ウエスタンブロット解析、酵素結合免疫吸着検定法、フローサイトメトリー）；ならびに例えば、再発率または疾患重症度の測定による、臨床症状または臨床転帰、例えば、自己タンパク質または自己ポリペプチドに関する自己免疫疾患、神経変性疾患、および他の疾患の改善の測定（臨床スコア、追加療法の使用の必要性、機能状態、画像診断）が挙げられる。

10

【0578】

提供されるDLL3結合ポリペプチドはまた、多種多様な診断用および予防用製剤でも有用である。1つの態様において、DLL3結合ポリペプチドは、前述の障害の1つまたは複数を発症するリスクがある患者に投与される。障害の1つまたは複数に対する患者または器官の素因は、遺伝子型、血清型、または生化学的マーカーを用いて決定することができる。

20

【0579】

本開示の別の態様において、DLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、前述の障害の1つまたは複数に関連する臨床適応症と診断されているヒト個体に投与される。診断時に、そのような治療剤は、臨床適応症の影響を軽減するまたは元に戻すために投与される。

【0580】

組み合わせ療法

本開示のDLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、単独でまたは他の処置の様式、例えば抗がん剤との組み合わせで投与することができる。それらは、他の処置の様式の前に、それと実質的に同時期に、またはその後（すなわち、同時にまたは連続して）提供することができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される処置の方法は、放射線療法、化学療法、ワクチン接種、標的指向腫瘍療法、CAR-T療法、腫瘍溶解性ウイルス療法、がん免疫療法、サイトカイン療法、外科的切除、クロマチン改変、アブレーション、寒冷療法、腫瘍標的に対するアンチセンス剤、腫瘍標的に対するsiRNA剤、腫瘍標的に対するmicroRNA剤もしくは抗がん/腫瘍剤、または生物学的製剤、例えば、抗体、サイトカイン、もしくは受容体細胞外ドメイン-Fc融合物を施与することをさらに含み得る。

30

【0581】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるDLL3結合ポリペプチドは、1つまたは複数の化学療法剤、CAR-T（キメラ抗原受容体 T細胞）療法、腫瘍溶解性ウイルス療法、サイトカイン療法、および/または他のチェックポイント分子、例えば、PD1、PD-L1、LAG3、TIM3、VISTA、gpNMB、B7H4、HLA2、CD73、CTLA4、TIGIT等を標的とする剤と同時に与えられる。

40

【0582】

いくつかの態様において、本開示のDLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、他の抗腫瘍剤、例えば、抗HER-2抗体、抗CD20抗体、上皮増殖因子受容体（EGFR）アンタゴニスト（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤）、HER1/EGFR阻害剤（例えば、エルロチニブ（TARCEVA（登録商標））、血小板由来増殖因子阻害剤（例えば、GLEEVEC（登録商標）（イマチニブメシル酸塩））、COX-2阻害剤（例えば、セレコキシブ）、インターフ

50

エロン、CTLA4阻害剤（例えば、抗CTLA抗体イピリマブ（YERVOY(登録商標)））、PD-1阻害剤（例えば、抗PD1抗体、BMS-936558）、PDL1阻害剤（例えば、抗PDL1抗体、MPDL3280A）、PDL2阻害剤（例えば、抗PDL2抗体）、サイトカイン、以下の標的ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-、BlyS、APRIL、BCMA、PD-1、PDL1、PDL2、CTLA4、もしくはVEGF受容体、TRAIL/Apo2の1つまたは複数に結合するアンタゴニスト（例えば、中和抗体）、ならびに他の生理活性剤および有機化学剤等との組み合わせで用いられる。

【0583】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるDLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、PD-1/PD-L1療法と同時に与えられる。PD-1/PD-L1療法の例としては、ニボルマブ（BMS）；ピジリズマブ（CureTech、CT-011）、ペムブロリズマブ（Merck）；デュルバルマブ（Medimmune/AstraZeneca）；アテゾリズマブ（Genentech/Roche）；アベルマブ（Pfizer）；AMP-224（Amplimmune）；BMS-936559；AMP-514（Amplimmune）；MDX-1105（Merck）；TSR-042（Tesar/ApaptysBio、ANB-011）；STI-A1010（Sorrento Therapeutics）；STI-A1110（Sorrento Therapeutics）；およびプログラム死（programmed death）-1（PD-1）またはプログラム死リガンド 1（PD-L1）に対して向けられている他の剤が挙げられる。

【0584】

いくつかの態様において、本開示のDLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、化学療法剤との組み合わせで用いられてもよい。化学療法剤の例としては、これらに限定されないが、チオテパおよびCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミドなどのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファンなどのアルキルスルホネート；ベンゾドパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドパ（meturedopa）、およびウレドパ（uredopa）などのアジリジン；アルトレートアミン（altretamine）、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド（triethylenethiophosphoramidate）、およびトリメチローロメラミン（trimethylolomelamine）を含むエチレンイミンおよびメチラメラミン；アセトゲニン（特にブラタシンおよびブラタシノン）；カンプトテシン（合成類似体トポテカンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン 1 およびクリプトフィシン 8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、KW-2189およびCB1-TM1を含む）；エリユテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン（chlornaphazine）、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビシン（novembichin）、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどの窒素マスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムヌスチン（ranimustine）などのニトロソ尿素；エンジン抗生物質（例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシン 1I およびカリケアミシン 1I（例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)を参照）などの抗生物質；ジネミシンAを含むジネミシン；クロドナートなどのビスホスホネート；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモホアおよび関連色素タンパク質エンジン抗生物質クロモホア）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オウトラマイシン（a uthramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン（carabic in）、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキシソルピシン（モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、およびデオキシドキシソルピシンを含む）、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCなどのマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、ケラマイシン（quelamycin）、ロドルピシ

ン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗薬、例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル (5-FU)；葉酸類似体、例えば、デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン (pteropterin)、トリメトトレキサート；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えば、アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン；男性ホルモン剤、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充薬、例えば、フロリン酸 (frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド (aldophosphamide glycoside)；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート (edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルチン；ジアジクオン；エルフォルミチン (elfornithine)；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン (lonidainine)；メイタンシノイド、例えば、メイタンシンおよびアンサミトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール (mopidanmol)；ニトラエリン (nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK(登録商標)多糖複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン；リゾキシシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテシン (特に、T-2トキシシン、ベラクリンA (verracurin A)、ロリジンA、およびアングイジン)；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラピノシド (「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、TAXOL(登録商標)パクリタキセル (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、A BRAXANE(登録商標)パクリタキセルのクレモフォルを含まないアルブミン操作されたナノ粒子製剤 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、およびTAXOTERE(登録商標)ドセタキセル (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；GEMZAR(登録商標)ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチン；ピンブラスチン；白金；エトポシド (VP-16)；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；NAVELBINE(登録商標)ピノレルピン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ (xeloda)；イバンドロナート；イリノテカン (Camptosar, CPT-11) (イリノテカンの5-FUおよびロイコボリンとの処置レジメンを含む)；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン (DMFO)；レチノイン酸などのレチノイド；カペシタピン；コンプレタスタチン；ロイコボリン (LV)；オキサリプラチン処置レジメンを (FOLFOX) を含むオキサリプラチン；細胞増殖を低下させる、PKC-、Raf、H-Ras、EGFR (例えば、エルロチニブ (TARCEVA(登録商標))) およびVEGF-Aの阻害剤、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。

【0585】

さらなる非限定的な例示的な化学療法剤としては、がんに対するホルモンの作用を調節または抑制するように作用する抗ホルモン剤、例えば、タモキシフェン (NOLVADEX(登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびFARESTON(登録商標)トレミフェンを含む、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲン受容体調節剤 (SERM)；副腎におけるエストロゲン産生を調節する、酵素アロマトラーゼを阻害するアロマトラーゼ阻害剤、例えば、4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE(登録商標)酢酸メゲストロール、AROMASIN(登録商標)エキセメスタン、ホルメスタニール (formestanie)、ファドロゾール、RIVISOR(登録商標)ボロゾール、FEMARA(登録

商標)レトロゾール、およびARIMIDEX(登録商標)アナストロゾールなど；ならびに抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリン；ならびにトロキサシタピン（1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、具体的には、異常な細胞増殖に關与するシグナル伝達経路における遺伝子、例えば、PKC-、Ralf、およびH-Rasなどの発現を阻害するもの；リボザイム、例えば、VEGF発現阻害剤（例えば、ANGIOZYME(登録商標)リボザイム）およびHER2発現阻害剤；ワクチン、例えば、遺伝子療法ワクチン、例えば、ALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン、およびVAXID(登録商標)ワクチン；PROLEUKIN(登録商標)（アルデスロイキン）rIL-2；LURTOTECAN(登録商標)トポイソメラーゼ1阻害剤；ABARELIX(登録商標) GnRHアゴニスト；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。

10

【0586】

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドおよび追加の剤は、単一の治療的組成物内に処方され、DLL3結合ポリペプチドおよび追加の剤は、同時に投与される。あるいは、DLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、互いに分かれている、例えば、各々が別個の治療的組成物内に処方され、DLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、同時に投与されるか、またはDLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、処置レジメンの間の異なる時点で投与される。例えば、DLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、追加の剤の投与前に投与されるか、DLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、追加の剤の投与に続いて投与されるか、またはDLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、交互に投与される。DLL3結合ポリペプチドおよび追加の剤は、単回用量でまたは複数回用量で投与されてもよい。

20

【0587】

いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、同時に投与される。例えば、DLL3結合ポリペプチドおよび追加の剤は、単一組成物で処方されるか、または2つ以上の別々の組成物として投与され得る。いくつかの態様において、DLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、連続して投与されるか、またはDLL3結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、処置レジメンの間の異なる時点で投与される。

30

【0588】

VII. 例示的な態様

提供される態様は以下のとおりである：

1. DLL3と特異的に結合する少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン（DLL3 VHHDメイン）およびDLL3以外の標的と結合する1つまたは複数の追加の結合ドメインを含む、DLL3結合ポリペプチド構築物。
2. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHDメインが、SEQ ID NO:319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、および456からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）；SEQ ID NO:336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、384、410、および411からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2（CDR2）；ならびにSEQ ID NO:354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、395、および412～415からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3（CDR3）を含み、かつDLL3と結合する、態様1のDLL3結合ポリペプチド構築物。
3. SEQ ID NO:319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、および456からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）；SEQ ID NO:336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、384、410、および411からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2（CD

40

50

R2) ; ならびにSEQ ID NO:354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、395、および412～415からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3 (CDR3) を含み、かつDLL3と結合する、DLL3と特異的に結合する少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン (DLL3 VHHドメイン) を含む、DLL3結合ポリペプチド構築物。

4 . 前記DLL3がヒトDLL3である、態様1～3のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

5 . 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインがヒト化されている、態様1～4のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

6 . 前記1つまたは複数の追加の結合ドメインが免疫細胞上の活性化受容体と結合する、態様1、2、4、および5のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

10

7 . 前記免疫細胞がT細胞である、態様6のDLL3結合ポリペプチド構築物。

8 . 前記活性化受容体がCD3 (CD3) である、態様6または態様7のDLL3結合ポリペプチド構築物。

9 . DLL3およびCD3に対して二重特異性である、態様8のDLL3結合ポリペプチド構築物。

10 . 前記免疫細胞がナチュラルキラー (NK) 細胞である、態様9のDLL3結合ポリペプチド構築物。

11 . 前記活性化受容体がCD16 (CD16a) である、態様6または態様10のDLL3結合ポリペプチド構築物。

20

12 . DLL3およびCD16aに対して二重特異性である、態様11のDLL3結合ポリペプチド構築物。

13 . 前記1つまたは複数の追加の結合ドメインがサイトカイン受容体と結合する、態様1、2、4、および5のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

14 . 前記1つまたは複数の追加の結合ドメインが抗体またはその抗原結合断片を含む、態様1、2、および4～13のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

15 . 前記1つまたは複数の追加の結合ドメインが1価である、態様1、2、および4～14のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

16 . 前記抗体またはその抗原結合断片がFv、ジスルフィド安定化Fv (dsFv)、scFv、Fab、シングルドメイン抗体 (sdAb)、VNAR、またはVHHである、態様14または態様15のDLL3結合ポリペプチド構築物。

30

17 . 前記1つまたは複数の追加の結合ドメインが、サイトカインであるか、またはサイトカイン受容体と結合することができるその切断型断片もしくはバリエーションである、態様13のDLL3結合ポリペプチド構築物。

18 . 前記サイトカインが、インターフェロンであるか、またはインターフェロンの切断型断片もしくはバリエーションである、態様17のDLL3結合ポリペプチド構築物。

19 . 前記インターフェロンが、I型インターフェロンもしくはII型インターフェロンであるか、I型インターフェロンの切断型断片もしくはバリエーションであるか、またはII型インターフェロンの切断型断片もしくはバリエーションである、態様18のDLL3結合ポリペプチド構築物。

40

20 . 前記I型インターフェロンが、IFN もしくはIFN であるか、またはその切断型断片もしくはバリエーションである ; あるいは、

前記II型インターフェロンが、IFN であるか、またはその切断型断片もしくはバリエーションである、

態様19のDLL3結合ポリペプチド構築物。

21 . 前記ポリペプチドが、免疫グロブリンFc領域を含む、態様1～20のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

22 . 前記ポリペプチド構築物が、前記少なくとも1つのVHHドメインと前記1つまたは複数の追加の結合ドメインとを連結する免疫グロブリンFc領域を含む、態様1、2、および4～21のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

50

23. 二量体である、態様1～22のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。
24. 前記Fc領域がホモ二量体Fc領域である、態様21～23のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。
25. 前記Fc領域が、SEQ ID NO:8、10、11、12、もしくは13のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:8、10、11、12、もしくは13のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、態様21～24のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。
26. 前記Fc領域がヒトIgG1である、態様21～24のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。
27. 前記Fc領域が、SEQ ID NO:8に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:8に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、態様26のDLL3結合ポリペプチド構築物。
28. 前記Fc領域がヘテロ二量体Fc領域である、態様21～23のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。
29. 前記Fc領域がエフェクター機能を示す、態様21～28のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。
30. 前記Fc領域が、
エフェクター機能を低減させ、かつ/またはFc 受容体もしくはC1qより選択されるエフェクター分子との結合を低減させる、1つまたは複数のアミノ酸改変を含むポリペプチドを含む、態様21～29のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。
31. 前記1つまたは複数のアミノ酸改変がGlu233、Leu234、またはLeu235のうちの1つまたは複数の欠失である、態様30のDLL3結合ポリペプチド構築物。
32. 前記Fc領域が、SEQ ID NO:9に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:9に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、態様30または態様31のDLL3結合ポリペプチド構築物。
33. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:102、244～275、277～300、302～305、314、401、416、455、476～480～488、および507～518のうちのいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO:102、244～275、277～300、302～305、314、401、416、455、476～480～488、および507～518のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～32のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。
34. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO:244に示される配列、(ii) SEQ ID NO:244のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:244に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。
35. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:319、320、321、322、323、324、325、および326からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:336、337、および338からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:354に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～34のいずれかのDLL3結合ポリペプチド。
36. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO:319、336、および354；それぞれSEQ ID NO:319、337、および354；それぞれSEQ ID NO:319、338、および354；それぞれSEQ ID NO:320、338、および354；それぞれSEQ ID NO:321、338、および354；それぞれSEQ ID NO:322、338、および354；それぞれSEQ I

10

20

30

40

50

D NO:323、338、および354；それぞれSEQ ID NO:324、338、および354；それぞれSEQ ID NO:325、338、および354；または、それぞれSEQ ID NO:326、338、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～35のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

37． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～36のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

38． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～37のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

10

39． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO:258に示される配列、(ii) SEQ ID NO:258のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:258に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

40． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:327に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:339に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:355に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および39のいずれかのDLL3結合ポリペプチド。

20

41． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO:327、339、および355に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33、39、および40のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

42． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:259～263のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:259～263のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および39～41のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

30

43． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:259～263のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および39～42のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

44． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO:264に示される配列、(ii) SEQ ID NO:264のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:264に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

45． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:328、329、または456に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:340に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:356に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および44のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

40

46． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO:328、340、および356；それぞれSEQ ID NO:329、340、および356、または、それぞれSEQ ID NO:456、340、および356に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33、44、および45のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

47． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:265～274、416、455、もしくは476～478のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:265～274、416、455、もしくは476～478のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97

50

％、98％、もしくは99％の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および態様44～46のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

48．前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:265～274、416、455、または476～478のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および態様44～47のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

49．前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO:275に示される配列、(ii) SEQ ID NO:275のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:275に対して少なくとも85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、もしくは99％の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

10

50．前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:320に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:341に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:357に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および49のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

51．前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:277～279および479のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:277～279および479のうちのいずれかに対して少なくとも85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、もしくは99％の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33、49、および50のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

20

52．前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:277～279および479のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および49～51のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

53．前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO:280に示される配列、(ii) SEQ ID NO:280のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:280に対して少なくとも85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、もしくは99％の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

54．前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:330に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:342に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:358に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および53のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

30

55．前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:281～286のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:281～286のうちのいずれかに対して少なくとも85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、もしくは99％の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33、53、および54のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

56．前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:281～286のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および53～55のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

40

57．前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO:287に示される配列、(ii) SEQ ID NO:287のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:287に対して少なくとも85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、もしくは99％の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

58．前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:320に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:345、346、および347からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:359、360、および361からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および57の

50

いずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

59. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO:320、345、および359；それぞれSEQ ID NO:320、346、および359；それぞれSEQ ID NO:320、347、および359；それぞれSEQ ID NO:320、345、および360；それぞれSEQ ID NO:320、345、および361；または、それぞれSEQ ID NO:320、347、および360に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および57～58のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

60. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:288～298もしくは102のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:288～298もしくは102のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および57～59のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

10

61. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:288～298または102のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および57～60のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

62. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO:299に示される配列、(ii) SEQ ID NO:299のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:299に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

20

63. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:331に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:348、349、および350からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:356に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および62のいずれかのDLL3結合ポリペプチド。

64. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO:331、348、および356；それぞれSEQ ID NO:331、349、および356；または、それぞれSEQ ID NO:331、350、および356に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および62～63のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

65. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:300、302～305、および480のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:300、302～305、および480のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および62～64のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

30

66. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:300、302～305、および480のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および62～65のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

67. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO:507に示される配列、(ii) SEQ ID NO:507のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:507に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

40

68. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:332に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:348、349、および350からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:362に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および67のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

69. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO:332、348、および362；それぞれSEQ ID NO:332、349、および362；またはSEQ ID NO:332、3

50

50、および362に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様1～33および67～68のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

70． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:508～514のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:508～514のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および67～69のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

71． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:508～514のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および67～70のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

10

72． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO:401に示される配列、(ii) SEQ ID NO:401のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:401に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

73． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:320に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:384、410、および411からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:395、412、413、414、および415からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および72のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

20

74． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO:320、384、および395；それぞれSEQ ID NO:320、410、および395；それぞれSEQ ID NO:320、411、および395；それぞれSEQ ID NO:320、384、および412；それぞれSEQ ID NO:320、384、および413；それぞれSEQ ID NO:320、384、および414；または、SEQ ID NO:320、384、および415に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および72～73のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

75． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:481～488のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:481～488のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および72～74のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

30

76． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、SEQ ID NO:481～488のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および72～75のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

77． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO:314、518、515、516、もしくは517に示される配列、(ii) SEQ ID NO:314、518、515、516、もしくは517のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:314、518、515、516、もしくは517のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

40

78． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO:333、351、および363；それぞれ334、352、および364；それぞれ320、353、および365；それぞれ334、339、および366；または、それぞれ335、348、および367に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様1～33および77のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物。

79． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインがSEQ ID NO:314、518、515、516、または517に示され、かつDLL3と結合する、態様1～33、77、および78のいずれかの

50

DLL3結合ポリペプチド構築物。

80. (a) 第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドを含むヘテロ二量体Fc領域を含む、第1の構成要素、ならびに(b) 可変重鎖領域(VH) および可変軽鎖領域(VL)を含む抗CD3抗体または抗原結合断片を含む、第2の構成要素を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

抗CD3抗体または抗原結合断片を構成するVHおよびVLがヘテロ二量体Fcの相対するポリペプチドに連結されており；

第1および第2の構成要素がリンカーによってカップリングされており、ヘテロ二量体Fc領域が抗CD3抗体に対してN末端に位置付けられており；

第1および第2の構成要素のうち的一方または両方が、DLL3と特異的に結合するVHHドメイン(DLL3 VHHドメイン)を含む少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、前記多重特異性ポリペプチド構築物。

10

81. 少なくとも、(i) ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインを含む、第1のポリペプチド；ならびに(ii) ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意で、第1のポリペプチドに存在するのと同じリンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方を含む、第2のポリペプチド

を含み、第1および第2のポリペプチドのうち的一方または両方が少なくとも1つのDLL3 VHHドメインを含む、態様80の多重特異性ポリペプチド構築物。

82. 前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1および前記第2のFcポリペプチドのうち的一方または両方が、ホモ二量体Fc領域のポリペプチドと比較して、任意で、SEQ ID NO:8に示されるFcポリペプチドまたはその免疫活性断片と比較して、ヘテロ二量体化を誘導する少なくとも1つの改変を含む、態様80または態様81の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

83. 前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1および前記第2のFcポリペプチドの各々が、独立して、少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、態様82の多重特異性ポリペプチド構築物。

84. 前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1および前記第2のFcポリペプチドの各々が、ノブイントゥホール(knob-into-hole)改変を含むか、または該ポリペプチドの静電的相補性を増加させる電荷の変異を含む、態様83の多重特異性ポリペプチド構築物。

85. 前記アミノ酸改変がノブイントゥホール改変である、態様84の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

86. 前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチドがThr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val、およびそれらの組み合わせの中より選択される改変を含み、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが改変Thr366Trpを含む、態様80~85のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

87. 前記第1および前記第2のFcポリペプチドが非システイン残基のシステイン残基への改変をさらに含み、該第1のFcポリペプチドの改変が位置Ser354およびTyr349のうちの一方にあり、該第2のFcポリペプチドの改変が位置Ser354およびTyr349のもう一方にある、態様86の多重特異性ポリペプチド構築物。

88. 前記アミノ酸改変が、前記ポリペプチドの静電的相補性を増加させる電荷の変異である、態様80~84のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

89. 前記第1および/もしくは前記第2のFcポリペプチドが、または前記第1および前記第2のFcポリペプチドの各々が、相補的な位置に改変を含み、該改変が、もう一方のポリペプチドの相補的なアミノ酸と反対の電荷を有するアミノ酸での置換である、態様80~84および88のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

90. 前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1または前記第2のFcポリペプチドのうち的一方が残基Ile253における改変をさらに含む、態様60~69のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

91. 前記改変がIle253Argである、態様90の多重特異性ポリペプチド構築物。

92. 前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1または前記第2のFcポリペプチドのうち的一方

50

が残基His435における改変をさらに含む、態様80～91のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

93．前記改変がHis435Argである、態様92の多重特異性ポリペプチド構築物。

94．前記Fc領域が、Lys447を欠くポリペプチドを含む、態様80～93のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

95．前記Fc領域が、FcRn結合を増強するための少なくとも1つの改変を含むポリペプチドを含む、態様80～94のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

96．前記改変がMet252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される位置にある、態様95の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

97．前記改変がMet252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、態様96の多重特異性ポリペプチド構築物。

98．前記改変が位置Met252および位置Met428にある、態様96の多重特異性ポリペプチド構築物。

99．前記改変がMet252YおよびMet428Lである、態様98の多重特異性ポリペプチド構築物。

100．前記改変がMet252YおよびMet428Vである、態様96の多重特異性ポリペプチド構築物。

101．前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチドが、SEQ ID NO:103、107、115、または117のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、SEQ ID NO:104、108、111、113、119、または121のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、態様80～100のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

102．前記Fc領域が、

エフェクター機能を低減させ、かつ/またはFc 受容体もしくはC1qより選択されるエフェクター分子との結合を低減させる、少なくとも1つのアミノ酸改変を含むポリペプチドを含む、態様1～101のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

103．前記1つまたは複数のアミノ酸改変がGlu233、Leu234、またはLeu235のうちの1つまたは複数の欠失である、態様102の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

104．前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチドが、SEQ ID NO:105、109、116、または118のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、SEQ ID NO:106、110、112、114、120、または122のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、態様80～103のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

105．前記抗CD3抗体または抗原結合断片が1価である、態様80～104のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

106．前記抗CD3抗体または抗原結合断片が単鎖抗体ではなく、任意で、単鎖可変断片(scFv)ではない、態様80～105のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

107．前記抗CD3抗体または抗原結合断片がFv抗体断片である、態様80～106のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

108．前記Fv抗体断片がジスルフィド安定化抗CD3結合Fv断片(dsFv)を含む、態様107の多重特異性ポリペプチド構築物。

109．前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、

アミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO:29)を含むVH CDR1；

アミノ酸配列

RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30)

を含むVH CDR2；

アミノ酸配列

50

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

を含むVH CDR3；

アミノ酸配列

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

を含むVL CDR1；

アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:33) を含むVL CDR2；および

アミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO:34) を含むVL CDR3

を含む、態様80～108のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

110．前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、

SEQ ID NO:35～65のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:35～65のうちのいずれかに対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有する、VH；ならびに

SEQ ID NO:66～84および368のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:66～84および368のうちのいずれかに対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有する、VLを含む、態様80～109のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

111．前記抗CD3抗体または抗原結合断片がSEQ ID NO:47のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:75のアミノ酸配列を含む、態様80～110のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

112．前記抗CD3抗体または抗原結合断片がSEQ ID NO:47のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:368のアミノ酸配列を含む、態様80～110のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

113．前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、前記多重特異性構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端におよび/または該多重特異性構築物の前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられている、態様80～112のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

114．DLL3と特異的に結合する第1のDLL3 VHHドメインおよびDLL3と特異的に結合する第2のDLL3 VHHドメインを含む、態様80～113のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

115．前記第1または前記第2のDLL3 VHHドメインが、前記多重特異性構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端に位置付けられており、かつ該第1または該第2のDLL3 VHHドメインのもう一方が該多重特異性構築物の前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられている、態様114の多重特異性ポリペプチド構築物。

116．前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、DLL3と結合する第1のDLL3 VHHドメイン、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチド、前記リンカー、前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメイン、およびDLL3と結合する第2のDLL3 VHHドメインを含み；

前記第2のポリペプチドが、N末端からC末端への順序で、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチド、前記リンカー、任意で、該第1の構成要素に存在するのと同じリンカー、および前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方を含む、

40

態様114または態様115の多重特異性ポリペプチド構築物。

117．前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインが同一である、態様114～116のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

118．前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインが異なっている、態様114～116のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

119．前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインが、DLL3の別個のもしくは重複しないエピトープと結合し、かつ/またはDLL3への結合について競合しない、態様118の

50

多重特異性ポリペプチド構築物。

120. 前記第1のVHHドメインが、251、264、267、268、287、299、507、314、517、もしくは455のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、または251、264、267、268、287、299、507、314、517、もしくは455のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合し；

前記第2のVHHドメインが、244、251、258、267、275、280、314、518、515、516、517、455のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはそのヒト化バリエーション、または244、251、258、267、275、280、314、518、515、516、517、455のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、

態様119の多重特異性ポリペプチド構築物。

121. 前記第1のVHHドメインおよび前記第2のVHHドメインが、SEQ ID NO:244およびSEQ ID NO:264；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:517；SEQ ID NO:244およびSEQ ID NO:507；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:507；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:314；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:299；SEQ ID NO:518およびSEQ ID NO:264；SEQ ID NO:251およびSEQ ID NO:268；SEQ ID NO:251およびSEQ ID NO:267；SEQ ID NO:275およびSEQ ID NO:517；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:287；SEQ ID NO:314およびSEQ ID NO:264；SEQ ID NO:515およびSEQ ID NO:517；SEQ ID NO:516およびSEQ ID NO:517；SEQ ID NO:517およびSEQ ID NO:517；SEQ ID NO:251およびSEQ ID NO:455；またはSEQ ID NO:244およびSEQ ID NO:517より選択されるアミノ酸配列を含む、態様119または120の多重特異性ポリペプチド構築物。

122. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:102、244～275、277～300、302～305、314、401、416、455、476～488、もしくは507～518のうちのいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO:102、244～275、277～300、302～305、314、401、416、455、476～488、もしくは507～518のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～121のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

123. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO:244に示される配列、(ii) SEQ ID NO:244のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:244に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

124. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:319、320、321、322、323、324、325、および326からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:336、337、および338からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:354に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～123のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

125. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO:319、336、および354；それぞれSEQ ID NO:319、337、および354；それぞれSEQ ID NO:319、338、および354；それぞれSEQ ID NO:320、338、および354；それぞれSEQ ID NO:321、338、および354；それぞれSEQ ID NO:322、338、および354；それぞれSEQ ID NO:323、

10

20

30

40

50

338、および354；それぞれSEQ ID NO:324、338、および354；それぞれSEQ ID NO:325、338、および354；または、それぞれSEQ ID NO:326、338、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～124のいずれかの多重特異性構築物。

126． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～125のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

127． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～126のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

128． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO:258に示される配列、(ii) SEQ ID NO:258のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:258に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

129． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:327に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:339に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:355に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および128のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

130． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO:327、339、および355に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122、128、および129のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

131． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:259～263のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:259～263のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および128～130のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

132． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:259～263のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および128～131のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

133． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO:264に示される配列、(ii) SEQ ID NO:264のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:264に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

134． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のVHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:328、329、または456に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:340に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:356に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および133のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

50

135. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO:328、340、および356；それぞれSEQ ID NO:329、340、および356；または、それぞれSEQ ID NO:456、340、および356に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80~122、133、および134のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

136. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:265~274、416、455、もしくは476~478のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:265~274、416、455、もしくは476~478のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80~122および態様133~135のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

137. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:265~274、416、455、または476~478のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80~122および態様133~136のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

138. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO:275に示される配列、(ii) SEQ ID NO:275のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:275に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80~122のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

139. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のVHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:320に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:341に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:357に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80~122および138のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

140. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のVHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:277~279および479のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:277~279および479のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80~122、138、および139のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

141. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:277~279および479のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80~122および138~140のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

142. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO:280に示される配列、(ii) SEQ ID NO:110のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:280に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80~122のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

143. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:330に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:342に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:358に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80~122および142のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

144. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のVH

50

Hドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:281～286のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:281～286のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122、142、および143のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

145. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:281～286のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および142～144のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

146. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO:287に示される配列、(ii) SEQ ID NO:287のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:287に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

147. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:320に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:345、346、および347からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:359、360、および361からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および146のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

148. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO:320、345、および359；それぞれSEQ ID NO:320、346、および359；それぞれSEQ ID NO:320、347、および359；それぞれSEQ ID NO:320、345、および360；それぞれSEQ ID NO:320、345、および361；または、それぞれSEQ ID NO:320、347、および360に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122、146、および147のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

149. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:288～298もしくは102のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:288～298もしくは102のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および146～148のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

150. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:288～298または102のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および146～149のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

151. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO:299に示される配列、(ii) SEQ ID NO:299のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:299に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

152. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:331に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:348、349、および350からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:356に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および151のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

153. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO:331、348

10

20

30

40

50

、および356；それぞれSEQ ID NO:331、349、および356；または、それぞれSEQ ID NO:331、350、および356に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122、151、および152のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

154． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:300、302～305、および480のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:300、302～305、および480のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および151～153のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

155． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:300、302～305、および480のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および151～154のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

156． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO:507に示される配列、(ii) SEQ ID NO:507のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:507に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

157． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:332に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:348、349、および350からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:362に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および156のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

158． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO:332、348、および362；それぞれSEQ ID NO:332、349、および362；または、SEQ ID NO:332、350、および362に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122、156、および157のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

159． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:508～514のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:508～514のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および156～158のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

160． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:508～514のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および156～159のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

161． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO:401に示される配列、(ii) SEQ ID NO:401のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:401に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

162． 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:320に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:384、410、および411からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:395、412、413、414、および415からなる群より選択

50

されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および161のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

163. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO:320、384、および395；それぞれSEQ ID NO:320、410、および395；それぞれSEQ ID NO:320、411、および395；それぞれSEQ ID NO:320、384、および412；それぞれSEQ ID NO:320、384、および413；それぞれSEQ ID NO:320、384、および414；または、SEQ ID NO:320、384、および415に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122、161、および162のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

164. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:481～488のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:481～488のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および161～163のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

165. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:481～488のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および161～164のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

166. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のVHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO:314、518、515、516、もしくは517に示される配列、(ii) SEQ ID NO:314、518、515、516、もしくは517のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:314、518、515、516、もしくは517のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

167. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO:333、351、および363；それぞれ334、352、および364；それぞれ320、353、および365；それぞれ334、339、および366；または、それぞれ335、348、および367に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様80～122および166のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

168. 前記少なくとも1つのDLL3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のDLL3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO:314、518、515、516、または517に示され、かつDLL3と結合する、態様80～122、166、および167のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

169. 前記第1および前記第2の構成要素のうちの一方または両方が、共刺激受容体と結合する少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)を含む、態様80～168のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

170. 前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、前記多重特異性ポリペプチド構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端におよび/または該多重特異性ポリペプチド構築物の前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられている、態様169の多重特異性ポリペプチド構築物。

171. 共刺激受容体結合領域(CRBR)を1つだけ含む、態様169または態様170の多重特異性ポリペプチド構築物。

172. 前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、DLL3と結合する第1のDLL3 VHHドメイン、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチド、前記リンカー、前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメイン、およびDLL3と結合する第2のDLL3 VHHドメインを含み；

10

20

30

40

50

前記第2の構成要素が、CRBRを含み、かつ、N末端からC末端への順序で、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチド、前記リンカー、任意で、前記第1の構成要素に存在するのと同じリンカー、前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方を含み、該CRBRが、該第2の構成要素のFc領域に対してアミノ末端に、または該第2の構成要素の該抗CD3抗体もしくは抗原結合断片に対してカルボキシ末端に位置付けられている、

態様169～171のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

173. 前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、

前記共刺激受容体の天然同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、または前記共刺激受容体との結合活性を示すそのバリエーションであるか、あるいはそれを含む、態様169～172のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

174. 前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片である、態様169～173のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

175. 前記抗体またはその抗原結合断片がFv、scFv、Fab、シングルドメイン抗体(VHHドメイン)、VNAR、またはVHHである、態様174の多重特異性ポリペプチド構築物。

176. 前記抗体または抗原結合断片がVHHドメインである、態様174または態様175の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

177. 前記VHHドメインがヒトVHHドメインまたはヒト化VHHドメインである、態様176の多重特異性ポリペプチド構築物。

178. 前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、グルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体(BAFF-R)、B細胞成熟抗原(BCMA)、膜貫通型アクチベーターおよびCAMLインタラクター(Transmembrane activator and CAML interactor)(TACI)、およびNKG2Dの中より選択される共刺激受容体と結合する、態様169～177のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

179. 前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、41BB(CD137)、OX40(CD134)、およびグルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)の中より選択される共刺激受容体と結合する、態様169～178のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

180. 前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、SEQ ID NO:210に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:210に示される配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する配列を含み、かつ4-1BBと結合する、態様169～179のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

181. 前記第1および前記第2の構成要素のうち的一方または両方が、抑制性受容体と結合する少なくとも1つの抑制性受容体結合領域(IRBR)を含む、態様80～180のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

182. 前記少なくとも1つの抑制性受容体結合領域(IRBR)が、前記多重特異性ポリペプチド構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端におよび/または該多重特異性ポリペプチド構築物の前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられている、態様181の多重特異性ポリペプチド構築物。

183. 抑制性受容体結合領域(IRBR)を1つだけ含む、態様181または態様182の多重特異性ポリペプチド構築物。

184. 前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、DLL3と結合する第1のDLL3 VHHドメイン、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチド、前記リンカー、前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメイン、およびDLL3と結合する第

50

2のDLL3 VHHドメインを含み；

前記第2の構成要素が、IRBRを含み、かつ、N末端からC末端への順序で、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチド、前記リンカー、任意で、前記第1の構成要素に存在するのと同じリンカー、前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方を含み、該IRBRが、該第2の構成要素のFc領域に対してアミノ末端にまたは該第2の構成要素の該抗CD3抗体もしくは抗原結合断片に対してカルボキシ末端に位置付けられている、

態様181～183のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

185． 前記少なくとも1つのIRBRが、

前記抑制性受容体の天然同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、または前記抑制性受容体との結合活性を示すそのバリエーションであるか、あるいはそれを含む、態様181～184のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

186． 前記少なくとも1つのIRBRが、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片である、態様181～185のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

187． 前記抗体またはその抗原結合断片がFv、scFv、Fab、シングルドメイン抗体（VHHドメイン）、VNAR、またはVHHである、態様186の多重特異性ポリペプチド構築物。

188． 前記抗体または抗原結合断片がVHHドメインである、態様186または態様187の多重特異性ポリペプチド構築物。

189． 前記VHHドメインがヒトVHHドメインまたはヒト化VHHドメインである、態様188の多重特異性ポリペプチド構築物。

190． 前記少なくとも1つのIRBRが、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、およびTIM3の中より選択される抑制性受容体と結合する、態様181～189のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

191． 前記少なくとも1つのIRBRがPD-1と結合する、態様181～189のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

192． 前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、DLL3と結合する第1のDLL3 VHHドメイン、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチド、前記リンカー、前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメイン、およびDLL3と結合する第2のDLL3 VHHドメインを含み；

前記第2の構成要素が、N末端からC末端への順序で、前記IRBRまたは前記CRBRのうちの一方、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチド、前記リンカー、任意で、前記第1の構成要素に存在するのと同じリンカー、前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方、および前記CRBRまたは前記IRBRのもう一方を含む、態様181～191のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

193． 前記リンカーがペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカーであり、任意で、該リンカーが3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20アミノ酸長である、態様80～192のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

194． 前記リンカーが切断不可能リンカーである、態様80～193のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

195． 前記切断不可能リンカーが、GS、GGS、GGGS (SEQ ID NO: 125)、GGGGGS (SEQ ID NO: 126)

、およびそれらの組み合わせを含む、態様194の多重特異性ポリペプチド構築物。

196． 前記リンカーが、配列GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 127)

10

20

30

40

50

であるか、またはそれを含む、態様80~195のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

197. 前記リンカーが切断可能リンカーである、態様80~193のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

198. 前記切断可能リンカーが、プロテアーゼの基質として機能するポリペプチドである、態様197の多重特異性ポリペプチド構築物。

199. 前記プロテアーゼが、免疫エフェクター細胞によって、腫瘍によって、または腫瘍微小環境に存在する細胞によって産生される、態様198の多重特異性ポリペプチド構築物。

200. 前記プロテアーゼが免疫エフェクター細胞によって産生され、該免疫エフェクター細胞が活性化T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、またはNK T細胞である、態様198または態様199の多重特異性ポリペプチド構築物。

201. 前記プロテアーゼがマトリプターゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、グランザイムB、およびそれらの組み合わせの中より選択される、態様198~200のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

202. 前記プロテアーゼがグランザイムBである、態様201の多重特異性ポリペプチド構築物。

203. 前記切断可能リンカーが、アミノ酸配列
GGSGGGGIEPDIGGSGGS (SEQ ID NO: 171)

を含む、態様198~202のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

204. SEQ ID NO:319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、および456からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）；SEQ ID NO:336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、348、349、350、351、352、353、384、410、および411からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2（CDR2）；ならびにSEQ ID NO:354、355、356、357、358、359、360、361、362、363、364、365、366、367、395、および412~415からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3（CDR3）

を含む、DLL3と結合する単離されたシングルドメイン抗体。

205. SEQ ID NO:102、244~275、277~300、302~305、314、401、416、455、476~480~488、および507~518のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:102、244~275、277~300、302~305、314、401、416、455、476~480~488、および507~518のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204の単離されたシングルドメイン抗体。

206. 前記シングルドメイン抗体が、(i) SEQ ID NO:244に示される配列、(ii) SEQ ID NO:244のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:244に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204または態様205の単離されたシングルドメイン抗体。

207. 前記sdAbが、SEQ ID NO:319、320、321、322、323、324、325、および326からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:336、337、および338からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:354に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204~206のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

208. 前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO:319、336、および354；それぞれSEQ ID NO:319、337、および354；それぞれSEQ ID NO:319、338、および354；それぞれSEQ ID NO:320、338、および354；それぞれSEQ ID NO:321、338、および354；そ

10

20

30

40

50

れぞれSEQ ID NO:322、338、および354；それぞれSEQ ID NO:323、338、および354；それぞれSEQ ID NO:324、338、および354；それぞれSEQ ID NO:325、338、および354；または、それぞれSEQ ID NO:326、338、および354に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204～207のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

209． 前記sdAbが、SEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204～208のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

10

210． 前記sdAbが、SEQ ID NO:245～257のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204～209のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

211． 前記sdAbが、(i) SEQ ID NO:258に示される配列、(ii) SEQ ID NO:258のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:258に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204または態様205の単離されたシングルドメイン抗体。

212． 前記sdAbが、SEQ ID NO:327に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:339に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:355に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および211のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

20

213． 前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO:327、339、および355に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、211、および212のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

214． 前記sdAbが、SEQ ID NO:259～263のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:259～263のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および211～213のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

30

215． 前記sdAbが、SEQ ID NO:259～263のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および211～214のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

216． 前記sdAbが、(i) SEQ ID NO:264に示される配列、(ii) SEQ ID NO:264のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:264に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204または態様205の単離されたシングルドメイン抗体。

217． 前記sdAbが、SEQ ID NO:328、329、または456からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:340に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:356に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、態様205、または態様216の単離されたシングルドメイン抗体。

40

218． 前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO:328、340、および356；またはそれぞれSEQ ID NO:329、340、および356；それぞれSEQ ID NO:456、340、および356に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および216～217のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

219． 前記sdAbが、SEQ ID NO:265～274、416、455、もしくは476～478のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:265～274、416、455、もしくは476～478のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の

50

配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および216～218のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

220. 前記少なくとも1つのDLL3 sdAbが、SEQ ID NO:265～274、416、455、または476～478のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および216～219のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

221. 前記sdAbが、(i) SEQ ID NO:275に示される配列、(ii) SEQ ID NO:275のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:275に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204または態様205の単離されたシングルドメイン抗体。

10

222. 前記sdAbが、SEQ ID NO:320に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:341に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:357に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、または221のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

223. 前記sdAbが、SEQ ID NO:277～279および479のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:277～279および479のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および221～222のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

20

224. 前記sdAbが、SEQ ID NO:277～279および479のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、態様204、205、および221～223のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

225. 前記sdAbが、(i) SEQ ID NO:280に示される配列、(ii) SEQ ID NO:280のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:280に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204または態様205の単離されたシングルドメイン抗体。

226. 前記sdAbが、SEQ ID NO:330に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:342に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO:358に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および225のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

30

227. 前記sdAbが、SEQ ID NO:281～286のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:281～286のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および225～226のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

228. 前記sdAbが、SEQ ID NO:281～286のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および225～227のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

40

229. 前記sdAbが、(i) SEQ ID NO:287に示される配列、(ii) SEQ ID NO:287のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:287に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204または態様205の単離されたシングルドメイン抗体。

230. 前記sdAbが、SEQ ID NO:320に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:345、346、および347からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:359、360、および361からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および229のいずれかの単離された

50

シングルドメイン抗体。

231. 前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO:320、345、および359；それぞれSEQ ID NO:320、346、および359；それぞれSEQ ID NO:320、347、および359；それぞれSEQ ID NO:320、345、および360；それぞれSEQ ID NO:320、345、および361；または、それぞれSEQ ID NO:320、347、および360に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および229～230のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

232. 前記sdAbが、SEQ ID NO:288～298もしくは102のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:288～298もしくは102のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および229～231のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

10

233. 前記sdAbが、SEQ ID NO:288～298または102のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および229～232のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

234. 前記sdAbが、(i) SEQ ID NO:299に示される配列、(ii) SEQ ID NO:299のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:299に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204または態様205の単離されたシングルドメイン抗体。

20

235. 前記sdAbが、SEQ ID NO:331に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:348、349、および350からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:356に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および234のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

236. 前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO:331、348、および356；それぞれSEQ ID NO:331、349、および356；または、それぞれSEQ ID NO:331、350、および356に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および234～235のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

237. 前記sdAbが、SEQ ID NO:300、302～305、および480のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:300、302～305、および480のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および234～236のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

30

238. 前記sdAbが、SEQ ID NO:300、302～305、および480のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および234～237のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

239. 前記sdAbが、(i) SEQ ID NO:507に示される配列、(ii) SEQ ID NO:507のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:507に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204または態様205の単離されたシングルドメイン抗体。

40

240. 前記sdAbが、SEQ ID NO:332に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO:348、349、および350からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO:362に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および239のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

241. 前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO:332、348、および362；それぞれSEQ ID NO:332、349、および362；またはSEQ ID NO:332、350、および362に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および239～

50

240のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

242. 前記sdAbが、SEQ ID NO:508~514のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:508~514のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および239~241のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

243. 前記sdAbが、SEQ ID NO:508~514のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および239~242のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

244. 前記sdAbが、(i) SEQ ID NO:401に示される配列、(ii) SEQ ID NO:401のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:401に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204または態様205の単離されたシングルドメイン抗体。

10

245. 前記sdAbが、SEQ ID NO:320に示されるアミノ酸配列を含むCDR1; SEQ ID NO:384、410、および411からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2; ならびにSEQ ID NO:395、412、413、414、および415からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および244のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

246. 前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO:320、384、および395; それぞれSEQ ID NO:320、410、および395; それぞれSEQ ID NO:320、411、および395; それぞれSEQ ID NO:320、384、および412; それぞれSEQ ID NO:320、384、および413; それぞれSEQ ID NO:320、384、および414; またはSEQ ID NO:320、384、および415に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および244~245のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

20

247. 前記sdAbが、SEQ ID NO:481~488のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:481~488のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および244~246のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

30

248. 前記sdAbが、SEQ ID NO:481~488のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および244~247のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

249. 前記sdAbが、(i) SEQ ID NO:314、518、515、516、もしくは517に示される配列、(ii) SEQ ID NO:314、518、515、516、もしくは517のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO:314、518、515、516、もしくは517のうちのいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、かつDLL3と結合する、態様204または態様205の単離されたシングルドメイン抗体。

250. 前記少なくとも1つのDLL3 sdAbが、それぞれSEQ ID NO:333、351、および363; それぞれ334、352、および364; それぞれ320、353、および365; それぞれ334、339、および366; または、それぞれ335、348、および367に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、かつDLL3と結合する、態様204、205、および249のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

40

251. 態様1~79のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物をコードする、ポリヌクレオチド。

252. 態様80~203のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物をコードする、ポリヌクレオチド。

253. 態様80~203のいずれかの多重特異性構築物の第1のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、該多重特異性構築物の第2のポリペプチドをコードする第2の核酸配

50

列とを含む、ポリヌクレオチドであって、該第1および該第2の核酸配列が、配列内リボソーム進入部位（IRES）によってまたは自己切断ペプチドもしくはリボソームスキッピングを引き起こすペプチドをコードする核酸によって隔てられている、前記ポリヌクレオチド。
 254． 前記第1の核酸配列および前記第2の核酸配列が同一のプロモーターに機能的に連結されている、態様253のポリヌクレオチド。

255． 自己切断ペプチドまたはリボソームスキッピングを引き起こすペプチドをコードする前記核酸がT2A、P2A、E2A、またはF2Aより選択される、態様254のポリヌクレオチド。

256． 態様204～250のいずれかのシングルドメイン抗体をコードする、ポリヌクレオチド。

257． 態様251～256のいずれかのポリヌクレオチドを含む、ベクター。

258． 発現ベクターである、態様257のベクター。

259． ウイルスベクターまたは真核生物ベクターであり、任意で、該真核生物ベクターが哺乳動物ベクターである、態様257または態様258のベクター。

260． 態様251～256のいずれかの1つもしくは複数のポリヌクレオチドまたは態様257～259のいずれかの1つもしくは複数のベクターを含む、細胞。

261． 組換えであるかまたは単離されている、態様260の細胞。

262． 哺乳動物細胞である、態様261の細胞。

263． 態様251～256のいずれかの1つもしくは複数のポリヌクレオチドまたは態様257～259のいずれかの1つもしくは複数のベクターを細胞へ導入する工程、および多重特異性ポリペプチド構築物を産生する条件下で該細胞を培養する工程を含む、ポリペプチドを産生する方法。

264． 前記ポリペプチドを前記細胞から単離するかまたは精製する工程をさらに含む、態様263の方法。

265． 態様263または態様264の方法によって産生されたポリペプチド。

266． 態様204～250のいずれかのシングルドメイン抗体を含む細胞外ドメイン；膜貫通ドメイン；および細胞内シグナル伝達ドメイン

を含むキメラ抗原受容体を含む、操作された免疫細胞。

267． 前記細胞がリンパ球である、態様266の操作された免疫細胞。

268． 前記細胞がT細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞である、態様266または態様267の操作された免疫細胞。

269． 前記細胞内シグナル伝達ドメインが免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM）シグナル伝達ドメインを含む、態様266～268のいずれかの操作された免疫細胞。

270． 前記細胞内シグナル伝達ドメインがCD3 シグナル伝達ドメイン、任意で、ヒトCD3 シグナル伝達ドメインであるか、またはそれを含む、態様266～269のいずれかの操作された免疫細胞。

271． 前記細胞内シグナル伝達ドメインが共刺激分子のシグナル伝達ドメインをさらに含む、態様269または態様270の操作された免疫細胞。

272． 前記共刺激分子がCD28、ICOS、41BB、またはOX40、任意で、ヒトCD28、ヒトICOS、ヒト41BB、またはヒトOX40である、態様271の操作された免疫細胞。

273． 態様1～79のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物、態様80～203のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物、態様204～250のいずれかのシングルドメイン抗体、または態様266～272のいずれかの操作された免疫細胞を含む、薬学的組成物。

274． 薬学的に許容される担体を含む、態様273の薬学的組成物。

275． 無菌である、態様273または態様274の薬学的組成物。

276． その必要がある対象に、態様1～79のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物、態様80～203のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物、態様204～250のいずれかのシングルドメイン抗体、または態様266～272のいずれかの操作された免疫細胞、または態様273～275のいずれかの薬学的組成物を投与する工程を含む、対象における免疫応

10

20

30

40

50

答を刺激するかまたは誘導する方法。

277. 腫瘍または癌、任意で、DLL3を発現する腫瘍または癌に対する免疫応答が増加する、態様276の方法。

278. 前記対象における疾患または状態を処置する、態様276または態様277の方法。

279. その必要がある対象に、治療有効量の、態様1~79のいずれかのDLL3結合ポリペプチド構築物、態様80~203のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物、態様204~250のいずれかのシングルドメイン抗体、または態様266~272のいずれかの操作された免疫細胞、または態様273~275のいずれかの薬学的組成物を投与する工程を含む、対象における疾患または状態を処置する方法。

280. 前記疾患または状態が腫瘍または癌である、態様278または態様279の方法。

281. 前記対象がヒトである、態様276~277のいずれかの方法。

【実施例】

【0589】

VIII. 実施例

以下の実施例は、例証の目的のみで含まれ、本発明の範囲を限定するようには意図されない。

【0590】

実施例1: DLL3 sdAbの生成

ヒトDLL3を標的とするシングルドメイン抗体は、ラマおよびアルパカの免疫を介して生成された。ラマおよびアルパカを、以下に示されるヒトDLL3細胞外ドメイン (ECD; ヒトDLL3 (例えば、UniProt番号Q9NYJ7) のアミノ酸27~492) の組換えバージョン (SEQ ID NO:475) によって免疫した。

AGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSEEAAESPCALGAALSARGPVY
TEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLA
AGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRCGPGLRPCAPLEDECE
APLVCRAGCSPEHGFCQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSSATTGCLVPGPGPC
DGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICH
CPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACA
NGGTCVEGGGAHRCSCALGFGRDCRERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVACAPGYMG
ARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL

【0591】

特異的な抗DLL3抗体力価の発達の後、免疫された動物に由来する血液500mLからラマ/アルパカ末梢血単核細胞 (PBMC) を単離し、全mRNAを、Qiagen RNeasy Maxiキットを使用して単離し、その後、Thermo Superscript IV Reverse TranscriptaseおよびオリゴdTプライミングを使用して第1鎖cDNAへ変換した。シングルドメイン抗体 (sdAb; VHHとも呼ばれる) 配列を、鋳型としてcDNAを使用したPCRを介して特異的に増幅し、sdAb-Fc-AGA2融合タンパク質として酵母表面ディスプレイベクターへクローニングした。Fcは、(SEQ ID NO:8に示される) ヒトIgG1 Fc、または、いくつかのケースにおいて、低下したエフェクター機能を有するそのバリエーション (Fc xELL; SEQ ID NO:9) であった。

【0592】

これらのsdAbをディスプレイする酵母ライブラリーを、磁気ビーズ単離後の蛍光活性化細胞選別 (FACS) を介して、DLL3 ECDの組換え型を使用して濃縮した。選別された酵母を播種し、単離されたコロニーを96穴ブロックに取り、sdAb-Fcの表面ディスプレイから培地への分泌に発現を切り替える培地において成長させた。96穴酵母分泌培養物由来の上清を、SHP-77細胞 (DLL3陽性) またはCCRF-CEM細胞 (DLL3陰性) に適用し、洗浄し、フルオロフォアによって標識された抗ヒトFc二次抗体によって処理し、96穴フローサ

イトメトリーによって分析した。

【 0 5 9 3 】

DLL3陽性細胞と結合し、DLL3陰性細胞とは結合しないものを、sdAb-Fcとして哺乳動物発現ベクターへクローニングし、ポリエチレンイミンを使用したHEK293 freestyle細胞（293F細胞）またはCHO細胞における一過性トランスフェクションによって発現させた。上清へ分泌された組換えタンパク質を、3～7日後に収集し、プロテインAクロマトグラフィーによって精製し、280nmにおける吸光度によって定量化した。

【 0 5 9 4 】

例示的な同定されたsdAbは、表E1Aに示される。いくつかのケースにおいて、sdAbは、Fcまたは他のsdAbのような他のポリペプチドとの連結のための可動性リンカー（例えば、GG）を含み得る。

【 0 5 9 5 】

（表 E 1 A）DLL3 sdAb

クローン名	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
L10D9	GSILSINAMG	319	GFTGDGNTI	336	DVQLFSRDYEFY	354	244
L10E5	GFTLDDYTIG	327	CISSSGGSTY	339	YCPVVVGPELG YDY	355	258
L8E7	EIITSDKSVG	328	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	264
L3G3	GSIFSINAMG	320	GFTGDGMTK	341	DVFTDRDHVDWY	357	275
L5A7	GSDFSINAIG	330	GFTGDGVTT	342	DVKIGGDYEW F	358	280
L5A8	GSIFSINAMG	320	VVSSDGRTT	345	REWYSDSDWRDY	359	287
L6C5	EITFSDKTVG	331	VISNVDSTN	348	RDFENEY	356	299
L6F1	EIIFSDKTVG	332	VISNVDSTN	348	RDFESEY	362	306 507
3B4	GSDFSINAMG	333	GFTGDGNPI	351	DVKIGGDYEWY	363	314
6A1	GFSLDDYTIG	334	CISSSGGSTV	352	WCGVATMTEDLPFDY	364	315 518
5H8	GSIFSINAMG	320	GFTSEGS AK	353	DIFSDRDHVDWY	365	316 515
3B12	GFSLDDYTIG	334	CISSSGGSTY	339	YCPVTIADELGF DY	366	317 516
6B4	EITLSDKTVG	335	VISNVDSTN	348	RDFEAEY	367	318 517
3C5	GSIFSINAMG	320	GFTGDGSTK	384	DVQLLNSDYEFY	395	401

【 0 5 9 6 】

実施例2：フローサイトメトリーによるsdAbのDLL3発現細胞との結合

DLL3発現細胞において、精製されたsdAb-Fcについて、特異性および相対的親和性を査定した。DLL3発現細胞株、肺癌細胞株（SHP-77）、またはDLL3によってトランスフ

エクトされた293FS細胞株（DLL3 293FS）を使用して、フローサイトメトリーによって、DLL3-sdAb-Fc融合タンパク質の結合を査定した。融合タンパク質の滴定系列を、96穴プレートにおいて、FACS緩衝液（PBS 1%BSA、0.1%NaN₃ pH 7.4）において、4 で30分間、DLL3発現細胞株（およそ $2.5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4$ 細胞/ウェル）と共にインキュベートした。FACS緩衝液での3回の洗浄工程の後、APCがコンジュゲートされた抗ヒトFc特異的二次抗体（Jackson ImmunoResearch）を添加し、4 で30分間インキュベートした。FACS緩衝液でのさらに3回の洗浄工程の後、結合した抗体をフローサイトメトリー（IQue Intellicyte）を介して検出した。

【0597】

図1は、例示的なDLL3 sdAb、即ち、10D9（SEQ ID NO:244）、10E5（SEQ ID NO:258）、8E7（SEQ ID NO:264）、3G3（SEQ ID NO:275）、5A7（SEQ ID NO:280）、5A8（SEQ ID NO:287）、6C5（SEQ ID NO:299）、6F1（SEQ ID NO:306）のようなSEQ ID NO:507）、3B4（SEQ ID NO:314）、5H8（SEQ ID NO:316に示されるようなSEQ ID NO:515）、3B12（SEQ ID NO:317に示されるようなSEQ ID NO:516）、および6B4（SEQ ID NO:318に示されるようなSEQ ID NO:517）についての結合の結果を示す。

【0598】

他の抗体の抗原エピトープとの結合の阻止について、対で抗体を試験するため、例示的な生成されたsdAbを使用して、DLL3との結合についてのエピトープ結合アッセイを実施した。結果は、表E1Bに示される。

【0599】

（表E1B）エピトープ結合

10D9	BIN2
10E5	BIN2
8E7	BIN1
3G3	BIN2
5A7	BIN2
5A8	BIN1
6C5	BIN1
6F1	BIN1
3B4	BIN2
5H8	BIN2
3B12	BIN2
6B4	BIN1

【0600】

実施例3：ラクダ科動物由来DLL3 sdAbのヒト化

例示的なラクダ科動物由来DLL3 sdAb、L10D9（SEQ ID NO:244）、L10E5（SEQ ID NO:258）、L8E7（SEQ ID NO:264）、L3G3（SEQ ID NO:275）、L5A7（SEQ ID NO:280）、L5A8（SEQ ID NO:287）、L6C5（SEQ ID NO:299）、およびL6F1（SEQ ID NO:507）を、足場としてヒトVH3-23生殖系列を使用してヒト化した。可溶性、特異性、安定性、および/または親和性に寄与するラクダ科動物残基は、未改変のままにした。さらに、（US20160207981に記載されたように）Leu11Glu（L11E）の改変、ならびにSer112Lys（S112K）およびSer113Pro（S113P）のカルボキシ末端改変は、sdAbに対する既存のADAの認識を防止するかまたは低下させることが公知であるため、全てのヒト化バリエーションが、これらを含んでいた。

【0601】

表E2は、例示的なDLL3 sdAbヒト化バリエーションを示す。いくつかのケースにおいて、s

dAbは、Fcまたは他のsdAbのような他のポリペプチドとの連結のための可動性リンカー（例えば、GG）を含み得る。

【 0 6 0 2 】

（表 E 2）DLL3 sdAbヒト化バリエーション

クローン名	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
10D9 ヒト化バリエーション							
hz10D9v1	GSILSINAMG	319	GFTGDGNTI	336	DVQLFSRDYEFY	354	245
hz10D9v2	GSILSINAMG	319	GFTGDGNTI	336	DVQLFSRDYEFY	354	246
hz10D9v3	GSILSINAMG	319	GFTGEGNTI	337	DVQLFSRDYEFY	354	247
hz10D9v4	GSILSINAMG	319	GFTGDTNTI	338	DVQLFSRDYEFY	354	248
hz10D9v5	GSILSINAMG	319	GFTGDTNTI	338	DVQLFSRDYEFY	354	249
hz10D9v6	GSILSINAMG	319	GFTGDTNTI	338	DVQLFSRDYEFY	354	250
hz10D9v7	GSIFSINAMG	320	GFTGDTNTI	338	DVQLFSRDYEFY	354	251

10

20

30

40

50

クローン名	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
hz10D9v8	GFTFSINAMG	321	GFTGDTNTI	338	DVQLFSRDYEFY	354	252
hz10D9v9	GFTFSSYAMG	322	GFTGDTNTI	338	DVQLFSRDYEFY	354	253
hz10D9v10	GSIFSSNAMG	323	GFTGDTNTI	338	DVQLFSRDYEFY	354	254
hz10D9v11	GFIFSSYAMG	324	GFTGDTNTI	338	DVQLFSRDYEFY	354	255
hz10D9v12	GSIFSIYAMG	325	GFTGDTNTI	338	DVQLFSRDYEFY	354	256
hz10D9v13	GFIFSINAMG	326	GFTGDTNTI	338	DVQLFSRDYEFY	354	257
10E5 ヒト化バリエント							
hz10E5v1	GFTLDDYTIG	327	CISSSGGSTY	339	YCPVVVGPELG YDY	355	259
hz10E5v2	GFTLDDYTIG	327	CISSSGGSTY	339	YCPVVVGPELG YDY	355	260
hz10E5v3	GFTLDDYTIG	327	CISSSGGSTY	339	YCPVVVGPELG YDY	355	261
hz10E5v4	GFTLDDYTIG	327	CISSSGGSTY	339	YCPVVVGPELG YDY	355	262
hz10E5v5	GFTLDDYTIG	327	CISSSGGSTY	339	YCPVVVGPELG YDY	355	263
8E7 ヒト化バリエント							
hz8E7v1	EIITSDKSVG	328	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	265
hz8E7v2	EIITSDKSVG	328	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	266
hz8E7v3	EIITSDKSVG	328	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	267
hz8E7v4	EIITSDKSVG	328	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	268
hz8E7v5	EIITSDKSVG	328	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	416
hz8E7v6	EIIFSDKSVG	329	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	269
hz8E7v8	EIITSDKSVG	328	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	270

10

20

30

40

50

クローン名	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
hz8E7v9	EIITSDKSVG	328	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	271
hz8E7v10	EIITSDKSVG	328	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	272
hz8E7v11	EIITSDKSVG	328	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	273
hz8E7v12	EIITSDKSVG	328	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	274
hz8E7v13	EIITSDKSMG	456	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	476
hz8E7v14	EIITSDKSVG	328	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	477
hz8E7v15	EIITSDKSMG	456	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	<u>478</u>
hz8E7v16	EIITSDKSMG	456	GISNVGSTN	340	RDFENEY	356	455
3G3 ヒト化バリエーション							
hz3G3v1	GSIFSINAMG	320	GFTGDGMTK	341	DVFTDRDHVDWY	357	276 479
hz3G3v2	GSIFSINAMG	320	GFTGDGMTK	341	DVFTDRDHVDWY	357	277
hz3G3v3	GSIFSINAMG	320	GFTGDGMTK	341	DVFTDRDHVDWY	357	278
hz3G3v4	GSIFSINAMG	320	GFTGDGMTK	341	DVFTDRDHVDWY	357	279
5A7 ヒト化バリエーション							
hz5A7v1	GSDFSINAIG	330	GFTGDGVTT	342	DVKIGGDYEFW	358	281
hz5A7v2	GSDFSINAIG	330	GFTGDTVTT	343	DVKIGGDYEFW	358	282
hz5A7v3	GSDFSINAIG	330	GFTGEGVTT	344	DVKIGGDYEFW	358	283
hz5A7v4	GSDFSINAIG	330	GFTGDGVTT	342	DVKIGGDYEFW	358	284
hz5A7v5	GSDFSINAIG	330	GFTGDGVTT	342	DVKIGGDYEFW	358	285
hz5A7v6	GSDFSINAIG	330	GFTGDGVTT	342	DVKIGGDYEFW	358	286

10

20

30

40

50

クローン名	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
5A8 ヒト化バリエント							
hz5A8v1	GSIFSINAMG	320	VVSSDGRTT	345	REWYSDSDWRDY	359	288
hz5A8v2	GSIFSINAMG	320	VVSSDGRTT	345	REWYSDSDWRDY	359	289
hz5A8v3	GSIFSINAMG	320	VVSSDGRTT	345	REWYSDSDWRDY	359	290
hz5A8v4	GSIFSINAMG	320	VVSSDGRTT	345	REWYSDSDWRDY	359	102
hz5A8v5	GSIFSINAMG	320	VVSSDGRTT	345	REWYSDSDWRDY	359	291
hz5A8v6	GSIFSINAMG	320	VVSSEGRIT	346	REWYSDSDWRDY	359	292
hz5A8v7	GSIFSINAMG	320	VVSSDARTT	347	REWYSDSDWRDY	359	293
hz5A8v8	GSIFSINAMG	320	VVSSDGRTT	345	REWYSDADWRDY	360	294
hz5A8v9	GSIFSINAMG	320	VVSSDGRTT	345	REWYSESDWRDY	361	295
hz5A8v10	GSIFSINAMG	320	VVSSDARTT	347	REWYSDADWRDY	360	296
hz5A8v11	GSIFSINAMG	320	VVSSDGRTT	345	REWYSDSDWRDY	359	297
hz5A8v12	GSIFSINAMG	320	VVSSDGRTT	345	REWYSDSDWRDY	359	298
6C5 ヒト化バリエント							
hz6C5v1	EITFSDKTVG	331	VISNVDSTN	348	RDFENEY	356	300
hz6C5v2	EITFSDKTVG	331	VISNVDSTN	348	RDFENEY	356	301 480
hz6C5v3	EITFSDKTVG	331	VISNVDSTN	348	RDFENEY	356	302
hz6C5v4	EITFSDKTVG	331	VISNVDSTN	348	RDFENEY	356	303
hz6C5v5	EITFSDKTVG	331	VISNVESTN	349	RDFENEY	356	304
hz6C5v6	EITFSDKTVG	331	VISNVDATN	350	RDFENEY	356	305

10

20

30

40

50

クローン名	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
6F1 ヒト化バリエント							
hz6F1v1	EIIFSDKTVG	332	VISNVDSTN	348	RDFESEY	362	307 508
hz6F1v2	EIIFSDKTVG	332	VISNVDSTN	348	RDFESEY	362	308 509
hz6F1v3	EIIFSDKTVG	332	VISNVDSTN	348	RDFESEY	362	309 510
hz6F1v4	EIIFSDKTVG	332	VISNVDSTN	348	RDFESEY	362	310 511
hz6F1v5	EIIFSDKTVG	332	VISNVDSTN	348	RDFESEY	362	311 512
hz6F1v6	EIIFSDKTVG	332	VISNVESTN	349	RDFESEY	362	312 513
hz6F1v7	EIIFSDKTVG	332	VISNV DATN	350	RDFESEY	362	313 514
3C5 ヒト化バリエント							
hz3C5v1	GSIFSINAMG	320	GFTGDGSTK	384	DVQLLNSDYEFY	395	402 481
hz3C5v2	GSIFSINAMG	320	GFTGDGSTK	384	DVQLLNSDYEFY	395	403 482
hz3C5v3	GSIFSINAMG	320	GFTGDTSTK	410	DVQLLNSDYEFY	395	404 483
hz3C5v4	GSIFSINAMG	320	GFTGEGSTK	411	DVQLLNSDYEFY	395	405 484
hz3C5v5	GSIFSINAMG	320	GFTGDGSTK	384	DVQLLSSDYEFY	412	406 485
hz3C5v6	GSIFSINAMG	320	GFTGDGSTK	384	DVQLLTSDYEFY	413	407 486
hz3C5v7	GSIFSINAMG	320	GFTGDGSTK	384	DVQLLQSDYEFY	414	408 487
hz3C5v8	GSIFSINAMG	320	GFTGDGSTK	384	DVQLLNTDYEFY	415	409 488

【 0 6 0 3 】

DLL3 sdAbのヒト化バリエントを、実質的に実施例2に記載されるように、DLL3発現細胞と結合する能力について試験し、結合を親sdAbと比較した。DLL3を内因的に発現するSHP-77細胞を、これらの研究において使用した。ヒト化バリエントの結合を確認する結果が、図2A～Lに示される。いくつかのケースにおいて、結合は、親sdAbと比較して増加した。

【 0 6 0 4 】

実施例4：DLL3標的型制約CD3結合タンパク質を産生する方法

制約されたCD3結合を示すジスルフィド安定化抗CD3 Fv結合領域、ヘテロ二量体Fcドメイン、ならびにFc領域に対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカル

ボキシ末端に位置付けられた前記の1つまたは複数のDLL3 sdAbを含有している多重特異性ポリペプチド構築物を生成した。図3A～3Eに示される様々な配置で多重特異性構築物を生成した。いくつかのケースにおいて、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられた少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)を含有した。例示的なCRBRは、(例えば、それぞれSEQ ID NO:457、458、および459に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有し;例えば、SEQ ID NO:210に示される)4-1BB共刺激受容体を標的とするsdAbである。

【0605】

例示的な構築物において、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を少なくともコードするポリヌクレオチドを生成し、発現のためのプラスミドヘクローニングした。第1のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端への順序で、(例えば、SEQ ID NO:112、またはいくつかのケースにおいて、SEQ ID NO:114に示される)Fcホールポリペプチド;プロテアーゼの1つまたは複数の基質認識部位を含有するもののような切断可能リンカーまたは切断不可能なリンカー;および(例えば、SEQ ID NO:75に示される)dsFv抗CD3抗体の可変軽鎖(VL)ドメインを含んでいた。第2のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端への順序で、(例えば、SEQ ID NO:105、またはいくつかのケースにおいて、SEQ ID NO:109に示される)Fcノブポリペプチド;第1のポリペプチド鎖と同一の切断可能リンカーまたは同一の切断不可能リンカー;および(例えば、SEQ ID NO:47に示される)dsFv抗CD3抗体の可変重鎖ドメインを含んでいた。例示的な切断不可能リンカー
GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:127)

またはグランザイムBの基質認識部位を含有する例示的な切断可能リンカー
GGSGGGGIEPDIGGSGGS (SEQ ID NO:171)

を含む構築物を生成した。ポリペプチド鎖のうち的一方または両方は、様々な配置で、Fcドメインのアミノ末端におよび/もしくはCD3結合領域のカルボキシ末端に1つもしくは複数のDLL3 sdAbを、かつ/またはFcドメインのアミノ末端におよび/もしくはCD3結合領域のカルボキシ末端に共刺激受容体結合ドメインを、さらにコードした。

【0606】

ヘテロ二量体制約CD3結合タンパク質の各鎖をコードする別々のプラスミドを、ポリエチレンジオキサンを使用して、哺乳動物細胞(HEK293またはCHOのいずれか)へ等モル比で一過性トランスフェクトした。上清中に分泌された組換えタンパク質を、3～7日後に収集し、プロテインAクロマトグラフィ後の調製用サイズ排除クロマトグラフィ(SEC)またはフロースルー疎水性相互作用クロマトグラフィ(HIC)のいずれかによって精製した。プロテインAに結合しないよう、ヘテロ二量体Fcの一方の鎖(一般的には、ホールFc)の位置I253RまたはH435Rにおいて設計された変異によって、ヘテロ二量体タンパク質を選択的に精製した。より疎水性であり、予想される分子量の2倍である、2つのヘテロ二量体Fcを含有している不要のクロスペア種を除去するため、SEC(Superdex-200樹脂を含むAKTA)またはFT-HIC(ブチル/フェニルセファロースを含むAKTA)における第2のクロマトグラフィ工程を使用した。

【0607】

方法は、ヘテロ二量体Fcの適切に対合した種ならびに記載されるジスルフィド安定化抗CD3 Fv(抗CD3のSEQ ID NO:47に示される変異G44Cを含むVHおよびSEQ ID NO:75に示される変異G100Cを含むVL)を含有しているヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の生成に有利であった。精製されたヘテロ二量体制約CD3結合タンパク質は、安定しており、4 でのインキュベーションの延長、またはタンパク質濃度の増加によって、クロスペア種を蓄積しなかった。

【0608】

10

20

30

40

50

表E3は、例示的な生成された制約多重特異性構築物を示す。

【 0 6 0 9 】

(表 E 3) DLL3 VHH制約多重特異性構築物

構築物	鎖	N末端 sdAb (標的) (SEQ ID NO)	Fc	リンカー	CD3 結合 ドメイン	C末端 sdAb (標的) (SEQ ID NO)
cx4720	1	10D9 (DLL3) (244)	xELL- ノブ	(G5S)3	Con1 VH	8E7 (DLL3) (264)
	2	-	xELL-ホール	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5 (41BB) (例 えば210)
cx3715	1	3B4 (DLL3) (314)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	6B4(DLL3)(517, 例えば318)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	RH3v5 (41BB) (例 えば210)
cx4422	1	10D9 (DLL3) (244)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	6F1(DLL3)(507, 例えば306)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx3708	1	3B4 (DLL3) (314)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	6B4(DLL3)(517, 例えば318)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx3985	1	3B4 (DLL3) (314)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	6F1(DLL3)(507, 例えば306)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx3991	1	3B4 (DLL3) (314)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	6C5 (DLL3) (299)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx4888	1	hz10D9v7 (DLL3) (251)	xELL- ノブ	(g5s)3	Con1 VH	hz8E7v4 (DLL3) (268)
	2	-	xELL-ホール	(g5s)3	Con1 VL	RH3v5(41BB)(例 えば210)
cx4890	1	10D9 (DLL3) (244)	xELL- ノブ	(g5s)3	Con1 VH	8E7 (DLL3) (264)
	2	-	xELL-ホール	(g5s)3	Con1 VL	-
cx4887	1	hz10D9v7 (DLL3) (251)	xELL- ノブ	(g5s)3	Con1 VH	hz8E7v4 (DLL3) (268)
	2	-	xELL-ホール	(g5s)3	Con1 VL	-
cx4895	1	10D9 (DLL3) (244)	xELL- ノブ	(g5s)3	Con1 VH	8E7 (DLL3) (264)
	2	-	xELL-ホール	(g5s)3	Con1 VL	RH3v5(41BB)(例 えば210)
cx4899	1	hz8E7v3 (DLL3) (267)	xELL- ノブ	(g5s)3	Con1 VH	hz10D9v7 (DLL3) (251)
	2	-	xELL-ホール	(g5S)3	Con1 VL	-

10

20

30

40

50

cx4896	1	10D9v7 (DLL3) (251)	xELL- ノブ	(g5s)3	Con1 VH	hz8E7v3 (DLL3) (267)
	2	-	xELL-ホール	(g5s)3	Con1 VL	RH3v5 (41BB) (例えば 210)
cx4052	1	3G3 (DLL3) (275)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	6B4 (DLL3) (517, 例えば 318)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx4087	1	3B4 (DLL3) (314)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	5A8 (DLL3) (287)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx4088	1	3B4 (DLL3) (314)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	8E7 (DLL3) (264)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx4059	1	5H8 (DLL3) (515, 例えば 316)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	6B4 (DLL3) (517, 例えば 318)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx4049	1	3B12 (DLL3) (516, 例えば 317)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	6B4 (DLL3) (517, 例えば 318)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx4050	1	6A1 (DLL3) (518, 例えば 315)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	6B4 (DLL3) (517, 例えば 318)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx4060	1	10D9 (DLL3) (244)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	6B4 (DLL3) (517, 例えば 318)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx3711	1	6B4 (DLL3) (517, 例えば 318)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	3B4 (DLL3) (314)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx4406	1	10D9 (DLL3) (244)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	8E7 (DLL3) (264)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx3707	1	6B4 (DLL3) (517, 例えば 318)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	6B4 (DLL3) (517, 例えば 318)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx3710	1	3B4 (DLL3) (314)	hFc -ノブ	IEPDI	Con1 VH	3B4 (DLL3) (314)
	2	-	hFc -ホール	IEPDI	Con1 VL	-

10

20

30

【 0 6 1 0 】

実施例5：単離された初代T細胞との結合と、DLL3発現癌細胞との結合との比較

cx4720、cx3715、cx4422、cx3708、cx4052、cx3985、cx4059、cx4087、cx4088、cx4895、cx3991、cx3711、cx4887、cx4896、cx4899、cx4406、cx3707、cx3710、cx4888、およびcx4890と本明細書において呼ばれる、DLL3を標的とする例示的な本開示の制約CD3エンゲージング構築物の、初代T細胞の表面上のCD3との結合を、健常ヒトドナーのleukopaksから単離されたPBMCからネガティブ濃縮されたT細胞を使用して、フローサイトメトリー（SONY SA3800スペクトル型アナライザー）を介して査定した。DLL3を標的とする代表的な制約CD3エンゲージング構築物を、T細胞およびDLL3発現細胞（SHP-77）との結合について査定した。結合したcx4720、cx3715、cx4422、cx3708、cx4052、cx3985、cx4059、cx4087、cx4088、cx4895、cx3991、cx3711、cx4887、cx4896、cx4899、cx4406、cx3707、cx3710、cx4888、およびcx4890を、フルオロフォアがコンジュゲートされた、ヒトFcに特異的な二次抗体によって検出し、結合をフローサイトメトリーによって測定した。二次抗体のみと共にインキュベートされた細胞は、陰性対照として役立った。

40

【 0 6 1 1 】

図4A～23Aに示されるように、DLL3を標的とする例示的な制約CD3エンゲージャー（cx4720、cx3715、cx4422、cx3708、cx4052、cx3985、cx4059、cx4087、cx4

50

088、cx4895、cx3991、cx3711、cx4887、cx4896、cx4899、cx4406、cx3707、cx3710、cx4888、およびcx4890)は、DLL3を発現するSHP-77細胞と結合することが見出された。しかしながら、図4B～23Bに示されるように、同構築物は、単離されたT細胞とは結合することができなかった。

【0612】

表E4は、これらの研究において、フローサイトメトリーから決定された、例示的な分子のDLL3またはCD3に対する親和性を要約したものである。

【0613】

(表E4) 構築物の結合親和性

構築物番号	親和性 DLL3	親和性 CD3
cx4720	0.115 nM	> 200 nM
cx3715	0.044 nM	> 200 nM
cx4422	0.183 nM	> 200 nM
cx3708	0.138 nM	> 200 nM
cx3985	0.084 nM	> 200 nM
cx3991	0.155 nM	> 200 nM
cx4888	0.134 nM	> 200 nM
cx4890	0.062 nM	> 200 nM
cx4887	0.410 nM	> 200 nM
cx4895	0.065 nM	> 200 nM
cx4899	0.397 nM	> 200 nM
cx4896	0.339 nM	> 200 nM
cx4052	0.186 nM	> 200 nM
cx4087	0.597 nM	> 200 nM
cx4088	0.093 nM	> 200 nM
cx4059	0.134 nM	> 200 nM
cx4049	ND	ND
cx4050	ND	ND
cx4060	ND	ND
cx3711	0.357 nM	> 200 nM
cx4406	0.320 nM	> 200 nM
cx3707	0.208 nM	> 200 nM
cx3710	0.315 nM	> 200 nM

10

20

30

【0614】

実施例6：レポーターアッセイを使用したDLL3依存的なCD3レポーターT細胞活性化の査定

この実施例は、cx3707、cx3710、cx3708、cx3711、cx4720、cx4422、cx3715、cx3985、cx3991、cx4894、cx4888、cx4890、cx4887、cx4895、cx4899、cx4052、cx4083、cx4087、cx4088、cx4059、cx4049、cx4050、cx4060、およびcx4896と本明細書において呼ばれる、DLL3を標的とする様々な代表的な制約CD3エンゲージング構築物の、DLL3発現SHP-77細胞またはDLL3陰性細胞株HEK-293 freestyle細胞と共培養されたCD3 NFATレポーターJurkat細胞株を活性化する能力の査定を記載する。これらのアッセイは、(実施例5において示されたように) CD3結合ドメインを介したT細胞結合は、単離されたT細胞においては制限されているかまたは阻害されているが、本明細書中に提供されたDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物が、同族抗原と結合した後は、T細胞とエンゲージし、T細胞活性化を媒介することができるようになることを証明するため、使用された。

40

【0615】

標的細胞と、NFATによって駆動される緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現する操作されたJurkat細胞との共培養物において、抗原を標的とする制約CD3エンゲージング構築物を滴定した。CD3のエンゲージメントは、NFATシグナル伝達および緑色蛍光の生成をも

50

たらず。接着標的細胞を利用したレポーターアッセイのため、標的細胞を播種し、均一な分布のために室温で静置し、接着（または部分的な接着）を可能にするため、37℃で数時間インキュベートした後、レポーター細胞、および抗原を標的とする制約CD3エンゲージング構築物を添加した。アッセイプレートをIncucyte ZOOM系を使用して連続的に画像化し、全緑色オブジェクト積分強度を測定することによってCD3レポーター細胞活性化を決定した。図24A～24Bおよび25A～25Dに示されるように、査定されたDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物は、DLL3陽性細胞（SHP-77）を含有する培養物においてレポーター活性を誘導したが（図24A、25A、25C）、T細胞がDLL3陰性細胞株（293 FS）と共に培養された時には、測定可能なレポーター活性が観察されなかった（図24B、25B、25D）。

10

【0616】

図24Aは、DLL3上の2つの異なるエピトープのターゲティングからの結果を図示し、制約CD3エンゲージング構築物内の特異的なDLL3標的型sdAbの位置が、結合に影響し得るという観察と一致している。cx3707は、DLL3標的型sdAb、6B4の2コピーを含有する。cx3710は、DLL3標的型sdAb、3B4の2コピーを含有する。従って、cx3707およびcx3710は、DLL3ターゲティングにおいて2価であり、各々、相互に異なるエピトープではあるが、DLL3上の単一のエピトープを認識する。cx3708およびcx3711は、各々、3B4の1コピーおよび6B4の1コピーを含有し、従って、2価の2エピトープ性のターゲティングによりDLL3と結合する。cx3708は、Fcに対してN末端に位置付けられた3B4およびCD3結合ドメインに対してC末端に位置付けられた6B4を有する。反対に、cx3711は、Fcに対してN末端に位置付けられた6B4およびCD3結合ドメインに対してC末端に位置付けられた3B4を有する。2エピトープ性のDLL3結合が可能な構築物（cx3708およびcx3711）は、Jurkat CD3-NFAT-GFPレポーターを使用して立証されたように、T細胞を活性化する能力に関して、1エピトープ性のDLL3結合のみが可能な構築物（cx3707およびcx3710）より優れている。注目すべきことに、cx3708は、cx3711と比較して、T細胞活性化の媒介に関して実質的に優れているため、特異的なsdAbの位置付けも活性に影響する。さらに、DLL3標的型sdAb 10D9および8E7ならびにそれらのヒト化バリエーションの組み合わせを含有する構築物は、図25に示されるように、強力なCD3シグナル伝達を媒介することが見出された。

20

【0617】

実施例7：機能的活性の査定

この実施例は、ヒト初代T細胞インビトロアッセイにおいて試験されたDLL3標的制約CD3エンゲージング構築物の査定および特徴決定を記載する。

30

【0618】

1. T細胞媒介細胞傷害

標的細胞を、Cytoldレッドによって蛍光標識した。接着性標的細胞SHP-77またはHEK-293FSを利用した細胞傷害アッセイのため、標的細胞を播種し、均一な分布のために室温で静置し、接着を可能にするため、37℃で24時間インキュベートした後、その他のアッセイ構成要素を添加した。初代T細胞を、健康ヒトドナーのleukopaksから単離されたPBMCからネガティブ濃縮し、10:1～40:1のT細胞-標的細胞比で添加した。アポトーシスを受けている細胞の核DNAを蛍光標識する緑色カスパーゼ3/7試薬を添加した。抗体を共培養物において滴定し、アッセイプレートをIncucyte ZOOM系を使用して連続的に画像化した。全赤色/緑色オーバーラップオブジェクトエリアを測定することによって、標的細胞死を決定した。

40

【0619】

図26A～26Bに示されるように、例示的なDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物、cx4887、cx4896、cx3708、cx4899、およびcx4406は、抗原陽性細胞株（SHP-77）の強力なT細胞媒介細胞傷害を誘導したが、抗原陰性細胞株（HEK-293FS）ではそうではなく、このことは、抗原依存的なT細胞活性化を強力に誘導する能力と一致していた。これらの観察は、本明細書中に提供された抗原標的型制約CD3フォーマットが、強力なDL

50

L3依存的なT細胞細胞傷害を誘導する能力を維持しながら、単離されたT細胞との結合の低下を示すことを支持する。注目すべきことに、それぞれ、N末端およびC末端に位置付けられたDLL3標的型sdAb hz10D9v7およびhz8E7v3のヒト化バリエーションを含有するcx4887は、強力なT細胞媒介細胞傷害を誘発した。

【0620】

2. T細胞活性化

T細胞活性化を査定するため、T細胞媒介細胞傷害アッセイからの細胞を収集し、生死判別染料、ならびにフルオロフォアがコンジュゲートされた抗CD4抗体、抗CD8抗体、および/または抗CD25抗体によって染色した。細胞を、SONY SA3800スペクトル型アナライザーを使用して分析し、CD4+T細胞またはCD8+T細胞の活性化を、CD25の発現レベルを測定することによって決定した。

【0621】

図27A~27Bおよび図27C~27Dは、それぞれ、例示的な構築物の存在下で、T細胞をDLL3陽性細胞株(SHP-77)またはDLL3陰性細胞株(HEK-293FS)と共に培養した時の、CD4 T細胞およびCD8 T細胞におけるCD25発現についての結果を図示する。図27A~27Dに示されるように、例示的なDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物、cx4887、cx4896、cx3708、cx4899、およびcx4406は、CD3結合を介したDLL3依存的なT細胞活性化を媒介した。従って、結果は、DLL3を標的とする本発明の制約CD3エンゲージング構築物が、増強されたCD25発現によって立証されるように、CD4 T細胞およびCD8 T細胞の両方の強力な抗原依存的な活性化を誘導することを証明した。

【0622】

3. T細胞サイトカイン産生(ELISA)

T細胞媒介細胞傷害アッセイからの上清を、サンドイッチELISA(BioLegend,USA)によって、IFN 含量について分析した。製造業者の説明書に従い、標準曲線を生成し、そこから、上清試料のサイトカイン濃度値を内挿した。検出下限未満の吸光度値を有する試料には、最低標準濃度のものの半分に等しいサイトカイン濃度を割り当てた。図28は、例示的なDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物、cx4887、cx4896、cx3708、cx4899、およびcx4406が、T細胞によるIFN 産生を抗原依存的に誘発することを示している。

【0623】

実施例8：制約されたCD3結合を有する追加の構築物の生成

実施例8は、制約されたCD3結合を示すCD3結合領域を含有している多重特異性ポリペプチド構築物の生成および発現を記載する。CD3結合領域にリンカー(例えば、切断不可能リンカー)によってカップリングされた免疫グロブリンのヘテロ二量体Fc領域、ならびに多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端におよび/または多重特異性ポリペプチド構築物のCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられた腫瘍関連抗原(TAA)に結合する1つまたは複数の抗原結合ドメインを含有している多重特異性構築物を、図29Aおよび29Bに示されるように、様々な配置で生成した。

【0624】

A. 構築物の設計および生成

ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を少なくともコードするポリヌクレオチドを生成し、発現のためのプラスミドへクローニングした。第1のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端への順序で、第1のFcポリペプチド(例えば、Fcホールポリペプチド)；切断不可能リンカー；および抗CD3抗体の可変軽鎖(VL)ドメインを含んでいた。第2のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端への順序で、第2のFcポリペプチド(例えば、Fcノブポリペプチド)；第1のポリペプチド鎖と同一の切断不可能リンカー；および抗CD3抗体の可変重鎖(VH)ドメインを含んでいた。抗CD3抗体は、表E5に示されるように、ジスルフィド安定化(dsFv)抗体(抗CD3の変異G44Cを含むVHおよび変異G100Cを含むVL)を含むか、または非ジスルフィド安定化Fv抗体を含有した。表E5に示されるように、ポリペプチド鎖のヘテロ二

10

20

30

40

50

量体化を容易にする様々な例示的なFcポリペプチド対を使用した。ポリペプチド鎖のうち的一方または両方は、様々な配置で、Fcドメインに対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に1つまたは複数のTAA抗原結合ドメインをさらにコードした。他のヘテロ二量体Fc配置、例えば、記載された任意のもののような他のノブイントゥホール配置；他のCD3結合領域、例えば、他の抗CD3抗体、例えば、dsFvもしくはその他の1価断片；またはscFvフォーマット、sdAbフォーマット、もしくはFabフォーマットのような他のTAA抗原結合断片を使用して、類似の構築物が生成されてもよい。

【0625】

生成された構築物において、切断不可能リンカーには、3～18アミノ酸の範囲のサイズのリンカーが含まれた。例示的な生成された分子において使用された切断不可能リンカーの例は、
GGG, GGSGGS (SEQ ID NO:1), GGSGGSGGS (SEQ ID NO:2), GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:3),
GGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:4), および GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:127) または
GGSGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:129)

であった。

【0626】

TAAと結合する任意の抗原結合ドメインが、提供された多重特異性ポリペプチド構築物において利用され得る。例示的な生成されたタンパク質は、デルタ様3 (DLL3) と結合する抗原結合ドメインを含有した。抗原結合ドメインは、単鎖断片 (例えば、sdAbもしくはscFv) または二本鎖抗原結合断片 (Fab) を含み得る。TAAが単鎖断片、例えば、sdAbまたはscFvとして提供された時、TAA抗原結合ドメインは、ペプチドリinker、例えば、P GGGG (SEQ ID NO:450) によって、Fcヘテロ二量体の一方もしくは両方のポリペプチド鎖 (例えば、ホールおよび/もしくはノブ) にN末端で連結され、かつ/またはペプチドリinker、例えば、GGGG (SEQ ID NO:5) によって、CD3結合領域の一方もしくは両方のドメイン (例えば、VHおよび/もしくはVL) にC末端で連結された。他の類似したペプチドリinkerが利用されてもよい。

【0627】

例えば、それぞれ、1価、2価、または3価の結合を提供するため、1、2、または3つのTAA抗原結合ドメインを含有する多重特異性ポリペプチド構築物を生成した。DLL3を標的とする複数のsdAb TAA抗原結合ドメインを含むよう操作された構築物において、TAA抗原結合ドメインは異なっており、従って、生成された多重特異性ポリペプチド構築物は、同一のTAAの少なくとも2つの異なるエピトープに対する特異性を示した (2エピトープ性)。

【0628】

生成されたタンパク質には、TAA抗原結合ドメインがシングルドメイン抗体 (sdAb) として構成された構築物が含まれていた。切断不可能リンカーを含有している例示的な多重特異性ポリペプチド構築物のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドを生成した。これらには、図29Aおよび29Bに図示される、cx5352、cx5800、cx5801、およびcx5499と名付けられた、DLL-3を標的とするsdAb含有構築物が含まれていた。構築物は、抗CD3抗体のVHドメインおよびVLドメインを安定化するジスルフィド連結によって操作された。注目すべきことに、生成された例示的な構築物のうちのいくつかは、4-1BB共刺激受容体を標的とする (それぞれSEQ ID No:457、458、および459に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有し；例えば、SEQ ID NO:210に示される) sdAbをさらに含有していた (例えば、cx5352、cx5800、cx5801)。cx5499は、共刺激受容体を標的とするsdAbを含有するよう操作されていなかった。sdAbおよびFab TAAドメインを有する例示的な制約CD3結合構築物のリストは、以下の表E5に与えられる。

【0629】

(表E5) 例示的な制約CD3エンゲージング構築物

10

20

30

40

50

構築物 ID	鎖	N-末端 sdAb (SEQ ID NO)	Fc (SEQ ID NO)	リンカー(SEQ ID NO)	CD3 結合 ドメイン (SEQ ID NO)	C-末端 sdAb (SEQ ID NO)	ジスルフィド 安定化
cx5352	1	DLL3 sdAb 1 (251)	xELL-ノブ (105, 109 または 442)	GGGGGSGG GGGSGGGG GS (127)	VH13 (47)	DLL3 sdAb2 (455)	あり
	2	なし	xELL-ホール (112, 114 または 445)	GGGGGSGG GGGSGGGG GS (127)	VL10 (75)	共刺激 受容体 sdAb	
cx5800	1	DLL3 sdAb 1 (251)	xELL-ノブ (SEQ ID NO: 105, 109 または 442)	GGGGGSGG GGGSGGGG GS (127)	VH13 (S47)	なし	あり
	2	なし	xELL-ホール (112, 114 または 445)	GGGGGSGG GGGSGGGG GS (127)	VL10 (75)	共刺激 受容体 sdAb	
cx5801	1	なし	xELL-ノブ (105, 109 または 442)	GGGGGSGG GGGSGGGG GS (127)	VH13 (47)	DLL3 sdAb 2 (455)	あり
	2	なし	xELL-ホール (112, 114 または 445)	GGGGGSGG GGGSGGGG GS (127)	VL10 (75)	共刺激 受容体 sdAb	
cx5499	1	DLL3 sdAb1 (251)	xELL-ノブ (105, 109 または 442)	GGGGGSGG GGGSGGGG GS (127)	VH13 (47)	DLL3 sdAb 2 (455)	あり
	2	なし	xELL-ホール (112, 114 または 445)	GGGGGSGG GGGSGGGG GS (127)	VL10 (75)	なし	

10

20

【 0 6 3 0 】

B. 生成された構築物の発現および精製

30

ヘテロ二量体制約CD3結合タンパク質の各鎖をコードする別々のプラスミドを、ポリエチレンイミンを使用して、哺乳動物細胞（HEK293またはCHOのいずれか）へ等モル比で一過性トランスフェクトした。上清中に分泌された組換えタンパク質を、3～14日後に収集し、プロテインAクロマトグラフィ後の調製用サイズ排除クロマトグラフィ（SEC）またはフロースルー疎水性相互作用クロマトグラフィ（HIC）のいずれかによって精製した。いくつかのケースにおいて、プロテインAに結合せず、従って、I253RまたはH435Rのホモ二量体が精製されないよう、ヘテロ二量体Fcの一方の鎖（例えば、ホールFc）の位置I253RまたはH435Rにおいて設計された変異によって、精製中にヘテロ二量体タンパク質が濃縮された。より疎水性であり、予想される分子量の2倍である、2つのヘテロ二量体Fcを含有する不要のクロスペア種を除去するため、SEC（Superdex-200樹脂を含むAKTA）またはFT-HIC（ブチル/フェニルセファロースを含むAKTA）による第2のクロマトグラフィ工程を使用した。

40

【 0 6 3 1 】

方法は、ヘテロ二量体Fcおよび抗CD3 Fv（例えば、ジスルフィド安定化抗CD3 Fv）の適切に対合した種を含有しているヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の生成に有利であった。精製されたヘテロ二量体制約CD3結合タンパク質は、安定しており、4でのインキュベーションの延長、またはタンパク質濃度の増加によって、クロスペア種を蓄積しなかった。

【 0 6 3 2 】

実施例9：単一または複数の抗原結合DLL3ターゲティングドメインを含有しているCD3制

50

約多重特異性構築物の査定

この実施例は、例示的な生成されたDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物のヒト初代T細胞インビトロアッセイにおける査定および特徴決定を記載する。

【0633】

抗原結合ドメインとしての抗DLL3 sdAbによってフォーマットされたDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物（例えば、cx5352、cx5800、cx5801、およびcx5499）の結合および活性を査定した（図29A～Bおよび表E5を参照すること）。全ての試験された構築物が、抗CD3のVL G100Cと対にされたVH G44Cの改変によって作出された鎖間ジスルフィド結合を含有しているジスルフィド安定化抗CD3 Fv（dsFv）を含有していた。さらに、共刺激受容体sdAbドメインを含有していなかったcx5499を除き、DLL3標的型構築物は、CD3 dsFvに対してC末端に共刺激受容体sdAbを含有するよう操作されていた。

10

【0634】

A．結合

DLL3に対する抗原結合ドメインを含有している例示的な本開示の多重特異性ポリペプチド構築物の、初代T細胞の表面上のCD3およびDLL3陽性細胞（SHP-77）との結合を、フローサイトメトリーによって査定した。図30Aに示されるように、DLL3を標的とする2価制約CD3エンゲージング構築物cx5352は、1価バージョンcx5800およびcx5801と比較して、より高い結合親和性をDLL3陽性SHP-77細胞に対して示した。図30Bに図示されるように、試験された構築物は、いずれも、DLL3陰性初代T細胞との結合を示さなかった。これらの結合アッセイは、フルオロフォアがコンジュゲートされた抗ヒトIgG Fc二次抗体を使用して、結合した構築物が検出される、フローサイトメトリーによって実施された。

20

【0635】

B．T細胞レポーター活性

NFATによって駆動されるルシフェラーゼを発現するJurkat細胞を使用したレポーターアッセイにおいて、T細胞活性を査定した。CD3の作動は、NFATシグナル伝達およびルシフェラーゼの産生をもたらし、それがモニタリングされ得る。NFATによって駆動されるルシフェラーゼCD3 Jurkatレポーター細胞を、DLL3抗原に対する抗原結合ドメインを含有する1価および2価の構築物の存在下で、SHP-77（DLL3陽性）標的細胞と共培養した（図29Aを参照すること）。具体的には、図30Cに示されるように、例示的な2価構築物cx5352は、例示的な1価構築物cx5800およびcx5801と比較して、実質的に大きいルシフェラーゼ活性を、このアッセイにおいて誘導した。

30

【0636】

C．細胞傷害

アミノ末端およびカルボキシ末端に位置する2つの異なるsdAb結合ドメインによってフォーマットされたDLL3標的型CD3制約結合構築物cx5499の存在下で、細胞傷害を査定した。標的細胞は、DLL3発現細胞株SHP-77であった。標的細胞を1ウェル当たり 1.0×10^4 細胞で播種し、均一な分布のために室温で静置し、37℃で数時間インキュベートした。初代T細胞を、健常ヒトドナーのleukopaksから単離されたPBMCからネガティブ濃縮し、10:1のT細胞-標的細胞比で添加した。アポトーシスを受けている細胞の核DNAを蛍光標識する緑色カスパーゼ3/7試薬を添加した。制約されたCD3エンゲージング活性を有する多重特異性構築物を共培養物において滴定し、アッセイプレートをIncucyte ZOOM系を使用して連続的に画像化した。全赤色/緑色オーバーラップオブジェクトエリアを測定することによって、標的細胞死を決定した。図31Aに示されるように、cx5499は、SHP-77細胞株に対する強力なT細胞媒介細胞傷害を誘導した。

40

【0637】

D．T細胞モジュレーション

T細胞モジュレーションをさらに査定するため、構築物のT細胞活性化マーカーをモジュレートする能力をモニタリングすることによって、例示的な多重特異性CD3制約結合構築物を査定した。T細胞活性化を査定するため、cx5499の存在下で、DLL3陽性SHP-77細胞と共にT細胞を培養することを含む、前記のT細胞細胞傷害アッセイからの懸濁細胞を収

50

集した。細胞を、生死判別染料、ならびにフルオロフォアがコンジュゲートされた抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD25抗体、および/または抗CD69抗体によって染色した。細胞を、SONY SA3800スペクトル型アナライザーを使用して分析し、CD25もしくはCD69の発現レベルまたはCD25もしくはCD69の陽性率を測定することによって、CD4+T細胞またはCD8+T細胞の活性化を決定した。

【0638】

図31Bおよび図31Dは、例示的なDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物cx5499の存在下で、T細胞をDLL3陽性SHP-77細胞と共に培養した時の、CD4 T細胞およびCD8 T細胞におけるCD25発現についての結果を、それぞれ、図示する。図31Cおよび図31Eは、例示的なDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物cx5499の存在下で、T細胞をDLL3陽性SHP-77細胞と共に培養した時の、CD4細胞およびCD8 T細胞におけるCD69発現についての結果を、それぞれ、図示する。結果は、CD4+T細胞およびCD8+T細胞におけるCD25およびCD69の発現の増加によって立証されるように、cx5499が、CD3結合を介した用量依存的なDLL3依存的なT細胞活性化を媒介したことを示した。

【0639】

E. 概要

総合すると、これらの結果は、抗DLL3 sdAb結合ドメインおよびCRBRによってフォーマットされた制約抗CD3構築物が、DLL3発現細胞株SHP-77に結合することができ、抗原依存的なT細胞活性化を誘発することができることを証明している。これは、本明細書中に記載された制約抗CD3構築物が、ある標的抗原に特異的ではなく、様々な抗原に結合して、標的を発現する細胞に対するT細胞の細胞傷害および活性化を誘発するために有効であることを示唆している。

【0640】

実施例10：DLL3ターゲティングドメインを含有するCD3制約多重特異性構築物における共刺激受容体結合領域の効果

CD3結合ドメインに対してC末端に位置付けられたCRBRを含有するDLL3標的型構築物の活性を、CRBRを含有しない構築物と比較するため、それぞれ、例示的な構築物cx5352およびcx5499を、T細胞活性に対する効果を査定するため、様々なアッセイにおいて試験した（表E5を参照すること）。

【0641】

A. T細胞レポーターアッセイ

共刺激受容体結合ドメインを含有する制約CD3エンゲージング構築物の、共刺激シグナル伝達経路の特異的な作動を媒介する能力を、査定した。共刺激受容体結合ドメインを含まないか（cx5499）または41BB結合ドメインを含む（cx5352）DLL3を標的とする例示的な制約CD3エンゲージング構築物を試験するため、Jurkat 41BB NF Bルシフェラーゼレポーター細胞を使用した。レポーター細胞を、DLL3陰性細胞株HEK-293またはDLL3の切断型バージョン（SEQ ID NO:86の残基276～618）を一過性発現するHEK-293細胞のいずれかと共培養した。図32に示されるように、cx5352は、DLL3発現細胞の存在下でのみ頑強なルシフェラーゼ活性が観察される、DLL3依存的な41BB作動を示した。低レベルのDLL3依存的なNFkB活性化が、cx5499によって観察され、このことは、このアッセイにおけるCD3シグナル伝達が、ある程度のNFkB活性化をもたらし得ることを示していた。

【0642】

B. 細胞傷害活性

初代ヒトT細胞を、3人の異なる健常ヒトドナーのleukopaksから単離されたPBMCからネガティブ濃縮し、10:1～40:1のT細胞-標的細胞比で添加した。ここでは、標的細胞をCytoldレッドによって赤色に標識し、アポトーシスを緑色蛍光カスパーゼ3/7基質によってモニタリングした；従って、アポトーシス標的細胞は、赤色および緑色に二重標識されたものである。アッセイプレートをIncucyte ZOOM系を使用して連続的に画像化した。全赤色/緑色オーバーラップオブジェクトエリアを測定することによって、標的細胞死を決

10

20

30

40

50

定した。

【0643】

例示的なアッセイにおいて、試験されたCD3エンゲージング構築物は、41BB結合CRBRと共に二重DLL3標的型sdAbを含んでいた（cx5352）。標的細胞は、DLL3発現SHP-77細胞、またはDLL3を発現しない293FS細胞であった。図33Aに示されるように、cx5352は、T細胞媒介抗原特異的細胞傷害を誘発することができた。DLL3陰性細胞を含有する共培養物において、赤色/緑色オーバーラップオブジェクトエリアがなかったことから示されるように、抗原の非存在下では、細胞傷害が観察されなかった（図33B）。このデータは、41BB結合ドメインを含む例示的なDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物の、T細胞媒介抗原特異的細胞傷害を誘発する能力を証明している。

10

【0644】

類似したアッセイにおいて、健常ヒトドナーのleukopaksから単離された初代ヒトPBMCを、10:1、5:1、または1.25:1のエフェクター-標的（E:T）細胞比で添加した。PBMCを、DLL3発現SHP-77標的細胞と共培養し、DLL3標的型sdAbを含有している例示的な構築物でCRBRを含むもの（cx53532）および含まないもの（cx5499）の増加する濃度の存在下でインキュベートした。図34A～Cに示されるように、cx5352は、分析された3つのE:T比の全てにおいて、標的細胞に対する増強された細胞傷害を示した。

【0645】

C. T細胞サイトカイン発現

SHP-77細胞を標的細胞として、実質的に前記のように実施されたT細胞媒介細胞傷害アッセイからの上清を、サンドイッチELISA（BioLegend、USA）によって、IFN 含量について分析した。製造業者の説明書に従い、標準曲線を生成し、そこから、上清試料のサイトカイン濃度値を内挿した。検出下限未満の吸光度値を有する試料には、最低標準濃度のものの半分に等しいサイトカイン濃度を割り当てた。

20

【0646】

図35に示されるように、41BB結合ドメインが組み入れられたDLL3標的型制約CD3エンゲージング構築物cx5352は、41BB結合ドメインを欠く類似した構築物cx5499と比較して、増強されたT細胞によるIFN 産生をもたらした。

【0647】

実施例11：抗原ターゲティングドメインを含有しているCD3制約多重特異性構築物におけるCD3結合領域の方向の比較

30

A. 構築物の設計および生成

図36A～Bに示されるように、CD3結合領域にリンカー（例えば、切断不可能リンカー）によってカップリングされた免疫グロブリンのヘテロ二量体Fc領域、CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられたCRBRとしての抗原結合ドメイン（例えば、sdAb）、ならびに多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端およびCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられた腫瘍関連抗原（TAA）と結合する二重の抗原結合ドメインを含有する多重特異性構築物を生成した。生成された例示的な構築物は、（それぞれSEQ ID NO:457、458、および459に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有し；例えば、SEQ ID NO:210に示される）sdAbを含有した。

40

【0648】

ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を少なくともコードするポリヌクレオチドを生成し、発現のためのプラスミドへクローニングした。第1のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端への順序で、第1のFcポリペプチド（例えば、Fcホールポリペプチド）；切断不可能リンカー；抗CD3抗体の可変軽鎖（VL；図36B）ドメインまたは可変重鎖（VH；図36A）ドメイン；およびCRBRとしての抗原結合ドメイン（例えば、sdAb）を含んでいた。第2のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端への順序で、第1の抗原結合ドメイン（例えば、sdAb #1）、第2のFcポリペプチド（例えば、Fcノブポリペプチド）；第1のポリペプチド鎖と同一のリンカー；抗CD3抗体の可変重鎖（VH）ドメインまたは可変軽鎖（VL）ドメインのもう一

50

方；および第2の抗原結合ドメイン（例えば、sdAb # 2）を含んでいた。抗CD3抗体は、ジスルフィド安定化（dsFv）抗体（抗CD3の変異G44Cを含むVHおよび変異G100Cを含むVL）を含んでいた。

【0649】

注目すべきことに、図36に示されるように、ヘテロ二量体Fc領域のFcノブまたはFcホールに対するCD3 Fvの抗CD3 VHおよび抗CD3 VLの方向を、異なって位置付けた。図36Aに示されるように、ヘテロ二量体構築物の第1のポリペプチドが、Fcノブに対してC末端に位置付けられたCD3 FvのVLを有し、N末端およびC末端に抗原結合ドメインを有し、ヘテロ二量体構築物の第2のポリペプチドが、Fcホールに対してC末端に位置付けられたCD3 FvのVHを有し、C末端にCRBR sdAbを有する、構築物を生成した。対照的に、図36Bは、ヘテロ二量体構築物の第1のポリペプチドが、Fcノブに対してC末端に位置付けられたCD3 FvのVHを有し、N末端およびC末端に抗原結合ドメインを有し、ヘテロ二量体構築物の第2のポリペプチドが、Fcホールに対してC末端に位置付けられたCD3 FvのVLを有し、C末端にCRBR sdAbを有する、例示的な構築物を図示する。

10

【0650】

構築物を、実質的に実施例8に記載されるように、発現させ、精製した。

【0651】

B. T細胞レポーター活性

CD3エンゲージメントを比較するため、例示的な構築物を、抗原依存的CD3レポーターアッセイにおいて、標的抗原発現細胞と共培養されたCD3 NFATレポーターJurkat細胞株を活性化する能力を査定することによって試験した。Jurkatレポーター細胞における緑色蛍光シグナルまたはルシフェラーゼレポーターシグナルのいずれかをモニタリングすることによって、活性化を査定した。

20

【0652】

標的抗原を発現するA375細胞または標的抗原を発現しない対照CCRF-CEM細胞のいずれかと、NFATによって駆動される緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する操作されたJurkat細胞との共培養物において、抗原を標的とする制約CD3エンゲージング構築物を滴定した。CD3のエンゲージメントは、NFATシグナル伝達および緑色蛍光の生成をもたらす。接着性標的細胞を利用したレポーターアッセイのため、標的細胞を播種し、均一な分布のために室温で静置し、接着を可能にするために37℃で数時間インキュベートした後、レポーター細胞および抗原を標的とする制約CD3エンゲージング構築物を添加した。アッセイプレートにIncucyte ZOOM系を使用して連続的に画像化し、全緑色オブジェクト積分強度を測定することによって、CD3レポーター細胞活性化を決定した。

30

【0653】

図37Aに示されるように、例示的な標的抗原型制約CD3エンゲージング構築物は、標的抗原を発現する標的細胞の存在下で、レポーターT細胞共培養物においてインキュベートされた時、標的抗原特異的なT細胞活性化を媒介する能力を示した。しかしながら、レポーター活性は、標的抗原を発現しない細胞との共培養物においては観察されなかった（図37B）。注目すべきことに、ノブVH；ホールVLフォーマットを有する構築物は、ノブVL；ホールVHフォーマットを有する構築物と比較して、増強されたT細胞活性化を示した。

40

【0654】

類似したアッセイにおいて、同一の抗原を標的とする制約CD3エンゲージング構築物を、標的抗原を発現するA375細胞または標的抗原を発現しない対照CCRF-CEM細胞のいずれかと、NFATによって駆動されるルシフェラーゼを発現する操作されたJurkat細胞との共培養物において滴定した。図37Cに示されるように、例示的な標的抗原型制約CD3エンゲージング構築物は、抗原を発現する標的細胞の存在下で、レポーターT細胞共培養物においてインキュベートされた時、標的抗原特異的なT細胞活性化を媒介する能力を示した。再び、標的抗原を発現しない細胞との共培養物においては、レポーター活性が観察されなかった（図37D）。GFPレポーターアッセイと同様に、ノブVH；ホールVLフォーマットを有する構築物は、ノブVL；ホールVHフォーマットを有する構築物と比較して、増強

50

されたT細胞活性化を示した。

【0655】

これらの結果は、VHおよびVLが、それぞれ、Fcノブ領域およびFcホール領域に対してC末端に位置付けられるよう、CD3 Fvの構成要素が方向付けられる時、増強されたCD3エンゲージメントおよび活性が観察されるという観察と一致している。

【0656】

実施例12：レポーターアッセイを使用したDLL3依存的なCD16レポーターT細胞活性化の査定

この実施例は、cx7886、cx7887、cx3373、およびcx3425と本明細書において呼ばれる例示的なDLL3標的型sdAbの、DLL3発現細胞（DLL3-CHO）と共培養されたNFATレポーターJurkat細胞株を活性化するFcエフェクター機能の査定を記載する。Jurkatレポーター細胞株を、NFATによって駆動されるルシフェラーゼレポーター遺伝子と共に、CD16aを安定的に発現するように操作した。レポーター細胞を、DLL3発現細胞（DLL3-CHO；およそ 3×10^4 細胞/ウェル）の存在下または非存在下で播種した（およそ 6×10^4 細胞/ウェル）。cx7886（hz10D9v7-Fc）、cx7887（hz8E7v16-Fc）、cx3373（3B4-Fc）、またはcx3425（6B4-Fc）を、細胞において滴定し、アッセイプレートに、75マイクロリットルの最終アッセイ体積で、37℃で6時間インキュベートした。アッセイプレートを、室温に平衡化し、75マイクロリットルのBio-Gloをサンプルウェルに添加し、アッセイプレートを室温で10分間インキュベートした。100マイクロリットルのアリコートをし、白色96穴プレートに移し、発光をClariostarマイクロプレートリーダーを使用して測定した。図38Aは、全ての構築物が抗原依存的にCD16レポーター細胞を活性化することができ、cx7886（hz10D9v7-Fc）およびcx7887（hz8E7v16）がレポーター細胞のより大きい活性化を誘導することを図示する。図38Bに示されるように、活性化は、DLL3発現細胞の非存在下では観察されなかった。

【0657】

本発明は、例えば、本発明の様々な局面を例示するために提供された、具体的な開示された態様に限定されないものとする。記載された組成物および方法に対する改変が、本明細書中の説明および教示から明らかになるであろう。そのような変動は、本開示の真の範囲および本旨を逸脱することなく実施され得、本開示の範囲に含まれるものとする。

【0658】

配列

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
1	GGSGGS	(GGS)2リンカー
2	GGSGGSGGS	(GGS)3リンカー
3	GGSGGSGGSGGS	(GGS)4リンカー
4	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGS)5リンカー
5	GGGG	グリシンリンカー
6	GGGGG	グリシンリンカー
7	GGGGGG	グリシンリンカー
8	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	ヒト IgG1 Fc
9	PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSQRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK	Fc xELL
10	PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	ヒト IgG2 Fc
11	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVVS LTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKTK KGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRFTQK SLSLSPGK	ヒト IgG3 Fc
12	PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	ヒト IgG4 Fc
13	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL	ヒト IgG4 Fc

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
	HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	
14	EPKSSDKTHTCPPC	改変型IgG1 ヒンジ
15	DKTHTCPPC	切断型IgG1 ヒンジ
16	ESKYGPPCPPC	改変型IgG4 ヒンジ
17	GQGTLVTVKPGG	カルボキシ末端 配列
18	GQGTLVTVPEGG	カルボキシ末端 配列
19	QVQLVQSGGG VVQPGRSLRL SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGYINPSRGYTNV NQKVKDRFTI SRDNSKNTAF LQMDSLRLPED TGVYFCARYYDDHYCLDYWG QGTPVTVSS	OKT3 VH
20	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCASSSVS YMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLSAGVPSR FSGSGSGTDY TFTISLQPE DIATYYCQQW SSNPFTFGQGTKLQIT	OKT3 VL
21	QVQLVQSGGG VVQPGRSLRL SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGYINPSRGYTNV NQKVKDRFTI SRDNSKNTAF LQMDSLRLPED TGVYFCARYYDDHYSLDYWG QGTPVTVSS	OKT3ヒト化 VH
22	DVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGQGLEWIGYINPSRGYTNV ADSVKGRFTI TTDKSTSTAY MELSSLRSED TATYYCARYYDDHYCLDYWG QGTTVTVSS	OKT3ヒト化 VH
23	QVQLVQSGAE LKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGQCLEWMGYINPSRGYTNV NQKFKDKATL TADKSTSTAY MELRSLRSDD TAVYYCARYYDDHYSLDYWG QGTLVTVSS	OKT3ヒト化 VH
24	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDTSKLSAGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSGTKLEIN	OKT3ヒト化 VL
25	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSVS YMNWYQQKPG KAPKRWIYDTSKVASGVPAR FSGSGSGTDY SLTINSLEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGGGTKVEIK	OKT3ヒト化 VL
26	DIQLTQSPSI LSASVGDRVT ITCRASSSVS YMNWYQQKPG KAPKRWIYDTSKVASGVPR FSGSGSGTEY TLTISSMQPE DFATYYCQQW SSNPFTFGCGTKVEIKRT	OKT3ヒト化 VL

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
27	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQM NNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSA	抗 CD3 H _v
28	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKP HLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAI YFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 L _v
29	TYAMN	抗 CD3 VH CDR1
30	RIRSKYNNYATYYADSVKD	抗 CD3 VH CDR2
31	HGNFGNSYVSWFAY	抗 CD3 VH CDR3
32	RSSTGAVTTSNYAN	抗 CD3 VL CDR1
33	GTNKRAP	抗 CD3 VL CDR2
34	ALWYSNLWV	抗 CD3 VL CDR3
35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH1
36	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH2
37	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH3
38	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH4
39	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH5
40	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVSIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH6

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPG KGLEWVGRIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH7
42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVS	抗 CD3 VH8
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	抗 CD3 VH9
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSYFAYWGQGTTVTVSS	抗 CD3 VH10
45	EVQLVESGGGLVQPKGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQM NNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH11
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVKP	抗 CD3 VH12
47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVKP	抗 CD3 VH13
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGCGTLTVTVKP	抗 CD3 VH14
49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH15
50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVSRIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH16
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVSRIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH17
52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH18
53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVSRIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH19

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVSRIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH20
55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVGRIRSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH21
56	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH22
57	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH23
58	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH24
59	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH25
60	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVSRIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH26
61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPG KCLEWVGRIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH27
62	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVS	抗 CD3 VH28
63	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQTTTVTVSS	抗 CD3 VH29
64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFAYWGQTTTVTVSS	抗 CD3 VH30
65	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQM NNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH31
66	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPD HLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAI YFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL1

10

20

30

40

#	配列	注釈
67	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKP GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEA DYCCALWYSNHWVFGCGTKLEIK	抗 CD3 VL2
68	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDE ADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL3
69	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPG QAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESI YFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL4
70	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPG QAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESI YFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL5
71	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPG QAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESD YYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL6
72	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEK GQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL7
73	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQQKPG QAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTISGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL8
74	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGGGTKLEIK	抗 CD3 VL9
75	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGCGTKLEIK	抗 CD3 VL10
76	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQCFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGEGTKLEIK	抗 CD3 VL11
77	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPD HLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAI YFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL12
78	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKP GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEA DYCCALWYSNHWVFGGGTKLEIK	抗 CD3 VL13
79	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDE ADYYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL14

10

20

30

40

#	配列	注釈
80	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPG QAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESI YFCALWYSNLWVFGGCKLTVL	抗 CD3 VL15
81	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPG QAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESI YFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL16
82	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPG QAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDES YYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL17
83	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKEP GQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL18
84	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGTFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL19
85	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYHMGWFRQAPG KERELVA AISGSGSTYYTDSVKGRFTISRNNAKNTMSLQMSN LKPEDTG VY YCTTPTEKGSSIDYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPD Y	抗 CD3 VHH
86	MVSPRMSGLLSQTIVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGGA PRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSEEA AESPCALGAALSARGPV YTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSFIETWREELGD QIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYR ARCEPPAVGTACTRLCRPSAPSRCPGLRPCAPLEDECEAPLV CRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGP SSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGL RCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNC EKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDL DDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPC AARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASA LPAAPPGLRPGDPQRYLLPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRL GHSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSV DWNRPEDVDPQGIYVISAPSIYAREVATPLFPPLHTGRAGQRQH LLFPYPSSILSVK	標準DLL3配列 (例えば、 UniProt番号 Q9NYJ7)
87	MVSPRMSGLLSQTIVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGGA PRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSEEA AESPCALGAALSARGPV YTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRDAWPGTFSFIETWREELGD QIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYR ARCEPPAVGTACTRLCRPSAPSRCPGLRPCAPLEDECEAPLV CRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCTVPVSTSSCLSPRGP SSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGSCSETPRSFECTCPRGFYGL RCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICHCPPGFQGSNC EKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHDL DDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALGFGGRDCRERADPC AARPCAHGGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHPDGASA LPAAPPGLRPGDPQRYLLPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRL	非標準DLL3配列 (例えば、 UniProt番号 Q9NYJ7-2)

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
	GHSQDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEGSGDGPSSSV DWNRPEDVDPQGIYVISAPSIYAREA	
88	GGSGGS	(GGG)2リンカー
89	GGSGGSGGS	(GGG)3リンカー
90	GGSGGSGGSGGS	(GGG)4リンカー
91	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGG)5リンカー
92	GGGG	グリシンリンカー
93	GGGGG	グリシンリンカー
94	GGGGGG	グリシンリンカー
95	GGSGGS	(GGG)2リンカー
96	GGSGGSGGS	(GGG)3リンカー
97	GGSGGSGGSGGS	(GGG)4リンカー
98	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGG)5リンカー
99	GGGG	グリシンリンカー
100	GGGGG	グリシンリンカー
101	GGGGGG	グリシンリンカー
102	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QRELVAVVSSDGRRTTVAPSVKGRFTISRDNANKNTVSLQMSSLR AEDTAVYYCGVREWYSDSDWRDYEGQGLVTVKP	hz5A8v4
103	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP	ノブ Fc
104	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP	ホール Fc
105	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP	ノブ Fc

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
	PVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPT	
106	DKTHTCPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPT	ホール Fc
107	DKTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	ノブ Fc
108	DKTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	ホール Fc
109	DKTHTCPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG	ノブ Fc
110	DKTHTCPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG	ホール Fc
111	DKTHTCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NRYTQKSLSLSPT	ホール Fc
112	DKTHTCPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYT QKSLSLSPT	ホール Fc

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
113	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NRYTQKSLSLSPG	ホール Fc
114	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYT QKSLSLSPG	ホール Fc
115	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNH YTQKSLSLSPT	ノブ Fc
116	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYT QKSLSLSPT	ノブ Fc
117	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNH YTQKSLSLSPG	ノブ Fc
118	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYT QKSLSLSPG	ノブ Fc
119	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRY TQKSLSLSPT	ホール Fc
120	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP	ホール Fc

10

20

30

40

#	配列	注釈
	PVLDSDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRYT QKSLSLSPT	
121	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRY TQKSLSLSPG	ホール Fc
122	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDSGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRYT QKSLSLSPG	ホール Fc
123	(GGGGS) _n (nは1～5である)	リンカー
124	(GGGGGS) _n (nは1～4である)	リンカー
125	GGGGS	リンカー
126	GGGGGS	リンカー
127	GGGGGSGGGGSGGGGGS	リンカー
128	GGGGSGGGGSGGGGS	リンカー
129	GGSGGGGSGGGGSGGGGS	リンカー
130	GlyxXaa-Glyy-Xaa-Glyz XaaはA、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、 H、D、またはEより独立に選択される。 x、y、およびzは各々1～5の範囲の整数である。	リンカー
131	Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly XaaはA、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、 H、D、またはEより独立に選択される。	リンカー
132	(SSSSG) _n n=1-9	リンカー
133	GGGGG-C-GGGGG	リンカー
134	(EAAAK) _n n=2-20	リンカー
135	AS-(AP) _n -GT n=2-20	リンカー

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
136	AS-(EAAAK) _n -GT n=2-20	リンカー
137	(GGGGA) _n n=2-20	リンカー
138	(PGGGS) _n n=2-20	リンカー
139	(AGGGS) _n n=2-20	リンカー
140	GGs-(EGKSSGSGSESKST) _n -GGs n=2-20	リンカー
141	SSSASASSA	リンカー
142	GSPGSPG	リンカー
143	ATTTGSSPGPT	リンカー
144	X1 X2 X3 X4 X5 (P4 P3 P2 P1 ↓ P1') X1=I, L, Y, M, F, V, または A; (P4=I, L, Y, M, F, V, または A) X2=A, G, S, V, E, D, Q, N, または Y; (P3=A, G, S, V, E, D, Q, N, または Y) X3=H, P, A, V, G, S, または T; (P2=H, P, A, V, G, S, または T) X4=D または E; (P1=D または E) X5=I, L, Y, M, F, V, T, S, G または A (P1'=I, L, Y, M, F, V, T, S, G または A)	リンカーコンセンサス
145	X1 E X3 D X5 (P4 P3 P2 P1 ↓ P1') X1=I または L; (P4=I または L) (P3=E) X3=P または A; (P2=P または A) X5=I, V, T, S, または G (P1'=I, V, T, S, または G)	リンカーコンセンサス
146	LEAD	グランザイムB 基質
147	LEPD	リンカー
148	LEAE	リンカー
149	IEPDI	リンカー
150	LEPDG	リンカー
151	LEADT	リンカー
152	IEPDG	リンカー
153	IEPDV	リンカー

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
154	IEPDS	リンカー
155	IEPDT	リンカー
156	X1QARX5 (P1QAR↓(A/V)) X1 = 任意のアミノ酸 ; (P1 = 任意のアミノ酸) X5 = A または V	リンカー-コンセンサス
157	RQARX5 (RQAR(A/V)) X5 = A または V	リンカー
158	RQAR	マトリプターゼ 基質
159	RQARV	リンカー
160	X1X2X3X4 (P3P2P1↓P1') X1 = P, V または A; (P3 = P, V または A) X2 = Q または D; (P2 = Q または D) X3 = A または N; (P1 = A または N) X4 = L, I または M (P1' = L, I または M)	リンカー-コンセンサス
161	PX2X3X4 (P3P2P1↓P1') (P3 = P) X2 = Q または D; (P2 = Q または D) X3 = A または N; (P1 = A または N) X4 = L または I (P1' = L または I)	リンカー-コンセンサス
162	PAGL	MMP 基質
163	TGLEADGSPAGLGRQARVG	リンカー
164	TGLEADGSRQARVGPAGLG	リンカー
165	TGSPAGLEADGSRQARVGS	リンカー
166	TGPAGLGLEADGSRQARVG	リンカー
167	TGRQARVGLEADGSPAGLG	リンカー
168	TGSRQARVGPAGLEADGS	リンカー
169	TGPAGLGSRQARVGLEADGS	リンカー
170	GPAGLGLEPDGSRQARVG	リンカー
171	GGSGGGGIEPDIGSGGS	リンカー
172	GGSGGGGLEADTGGSGGS	リンカー
173	GSIEPDIGS	リンカー

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
174	GSLEADTGS	リンカー
175	GGSGGGGIEPDGGGSGGS	リンカー
176	GGSGGGGIEPDVGGSGGS	リンカー
177	GGSGGGGIEPDSGGSGGS	リンカー
178	GGSGGGGIEPDTGGSGGS	リンカー
179	GGGSLEPDGSGS	リンカー
180	GPAGLGLEADGSRQARVG	リンカー
181	GGEGGGGSGGSGGS	リンカー
182	GSSAGSEAGGSGQAGVGS	リンカー
183	GGSGGGGLEAEGSGGGS	リンカー
184	GGSGGGGIEPDPGGSGGS	リンカー
185	TGGSGGGGIEPDIGGSGGS	リンカー
186	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRVAVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEANSAGFGQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	41BBL
187	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGK GLEWMGKIYPGDSYTNYSFQGVSTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGTTLTVSS	41BB VH
188	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSP VLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC ATYTGFGSLAVFGGGTKLTVL	41BB VL
189	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPE KGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLTVSS	41BB VH
190	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGGTDFLTISLSEPEDFAVYYCQ QRSNWPPALTFGGGTKVEIK	41BB VL
191	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSGYYMHWVRQAP GQGLEWMGWVNPMSGGTNYAQKFQGRVTITRDTASTAYME LSSLRSEDTAVYYCAREGMAMRLELDKWGQGTTLTVSS	41BB VH

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
192	SYELTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAP VLVIYYDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC QVWDSSSVVFGGGTQLTVL	41BB VL
193	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGK WYVVGQAGNIKLR EDKDPNKMMATIIYELKEDKSYNVTGVT FDDKKCTYAISTFVP GSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQ NREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	41BB Anticalin
194	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGK WYVVGQAGNIRLR EDKDPIKMMATIIYELKEDKSYDVTMVKFDDKKCMYDIWTFVP GSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQ NREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	41BB Anticalin
195	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGK WYVVGQAGNIRLR EDKDPNKMMATIIYELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTFVP GSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQ NREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	41BB Anticalin
196	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGK WYVVGQAGNIKLR EDKDPNKMMATIIYELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTFVP GSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQ NREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	41BB Anticalin
197	QDSTSDLIPA PPLSKVPLQQ NFQDNQFHGK WYVVGQAGNI KLREDSKMMMA TIYELKEDKS YDVTGVSFDD KKCTYAIMTF VPGSQPGEFT LGKIKSFPGH TSSLVRVVST NYNQHAMVFF KFVFQNREEF YITLYGRTKE LTSELKENFI RFSKSLGLPE NHIVFPVPID QCIDG	41BB Anticalin
198	QDSTSDLIPA PPLSKVPLQQ NFQDNQFHGK WYVVGQAGNI KLREDKDPVK MMATIIYELKE DKS YDVTGVT FDDKKCRYDI STFVPGSQPG EFTFGKIKSF PGHTSSLVRV VSTNYNQHAM VFFKFVFQNR EEFYITLYGR TKELTSELKE NFIRFSKSLG LPENHIVFPV PIDQCIDG	41BB Anticalin
199	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGK WYVVGQAGNIRLR EDKDPHKMMATIIYELKEDKSYDVTGVT FDDKKCTYAISTFVP GSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQ NREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	41BB Anticalin
200	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGK WYVVGQAGNIKLR EDKDPNKMMATIIYELKEDKSYDVTGVT FDDKKCTYAISTLVP GSQPGEFTFGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQ NREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	41BB Anticalin

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
201	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIRLR EDKDPSKMMATIELKEDKSYDVTAVTFDDKKCNYAISTFVPG SQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQN REEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQC IDG	41BB Anticalin
202	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 71～254
203	DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 85～254
204	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SRSE	ヒト41BBLの 80～254
205	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 52～254
206	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGL	ヒト41BBLの 71～248
207	DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 85～248
208	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 80～248
209	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 52～248

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
210	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMGWYRQAPGK RREFVAAIESGRNTVYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCGLLKGNRVVSPSVAYWGQGLTVTKP	41BB sdAb
211	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNSVII NCDGFYILSLKGYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL MVASLTYSKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFC VL	OX40 リガンド
212	QVSHRYPRFQ SIKVQFTEYK KEKGFIILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNLSLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYSKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
213	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNSVII NCDGFYILSLKGYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL MVASLTYSKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFC VL	OX40 リガンド
214	QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFIILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNLSLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYSKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
215	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNSVIIN CDGFYILSLKGYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLM VASLTYSKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCV L	OX40 リガンド
216	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTAYLELS SLRSEDVAVYYCVLAPRWYFSVWGQGLTVTVSS	OX40 VH
217	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIKRT	OX40 VL
218	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASG KGLEWVGRIRSKANSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTAVYYCTSGIYDSSGYDYWGQGLTVTVSS	OX40 VH
219	DIVMTQSPLSLPVTGPASISCRSSQSLHNSGYNLYLDWYLQK PGQSPQLLIYLGSRASGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCMQALQPLTFTGGGTKVEIK	OX40 VL
220	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAFMYWVRQAPG KGLEWVSSISNRGLKTAYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCSRVDGDFRGQGLTVTKP	OX40 sdAb
221	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQ NGLYLIYGVQAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKI QNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFIS	GITR リガンド

10

20

30

40

#	配列	注釈
222	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVASISSGGTTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGGYYDSMDYWGGQGLTVTVSS	GITR VH
223	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASESDNYGVSMNWYQQK PGQAPRLLIYAASNQSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQTKQKVTWTFGQGTKVEIK	GITR VL
224	QVTLRSGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQPPG KALEWLAHIWDDDKYYQPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTN MDPVDATAYYCARTRRYFPFAYWGQGLTVTVSS	GITR VH
225	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQNVGTNVAWYQQKPGQ APRLLIYSASYRSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYNTDPLTFGGGQGTKVEIK	GITR VL
226	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSGGYFWSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGTTYNP SLKSRVTISIDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARDLFYYDTSGPRGFDPWGQGLTVTVSS	GITR VH
227	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVSSNYLAWYQQKPGQ APRLLIYGSSTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYDSSPWTFGQGTKVEIK	GITR VL
228	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYPGSNKYYAESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGGELGRYYYYGMDVWGQGT TVTVSS	GITR VH
229	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTCRASQGIRNDLGWYQQKPGK APKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY CLQHNNYPWTFGQGTKVDIK	GITR VL
230	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPG KQRELVAVLSGISSAKYAASAPGRFTISRDN AKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYADVSTGWGRDAHGYWGQGLTVTV	GITR sdAb
231	<u>MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQ</u> <u>AQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQODPRLYWQGGPALGRSF</u> <u>LHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLA</u> <u>VGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGT</u> <u>LLPSRNTDETFFGVQWVRP</u>	UniProt 番号 P32970; CD70- ECD 残基 39- 193 (下線)
232	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGSGNWGFFDYWGQGLTVTVSS	CD70 VH
233	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYNTYPRTFGQGTKVEIK	CD70 VL

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
234	QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINGMGWYRQAPG KERELVAGLTSGGSVTNYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCRAEIFTRTGENYYGMDYWGKGTQVTVKP	ICOS sdAb
235	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMGWFRQAPG KEREFVAAINYRRDAADYAESVKGRFTISRDNANKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRRDDYNYWGQGTLLVTVKP	CD28 sdAb
236	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ζ シグナリング ドメイン
237	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB由来 共刺激 ドメイン
238	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28由来 共刺激 ドメイン
239	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28由来 共刺激 ドメイン 2
240	FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RS	CD28由来 共刺激 ドメイン 3
241	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFA SDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	CD8由来ヒンジ および 膜貫通 ドメイン

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
242	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	CD8由来ヒンジ および 膜貫通 ドメイン
243	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	CD8ヒンジおよび 膜貫通 ドメイン
244	EVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGSILSINAMGWYRQPPGK QREMVAGFTGDGNTIYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSL KPEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGTQVTVKP	L10D9
245	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSILSINAMGWYRQAPGK QREMVAGFTGDGNTIYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGTLLVTVKP	hz10D9v1
246	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSILSINAMGWYRQAPGK QRELVAGFTGDGNTIYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGTLLVTVKP	hz10D9v2
247	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSILSINAMGWYRQAPGK QREMVAGFTGEGNTIYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGTLLVTVKP	hz10D9v3
248	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSILSINAMGWYRQAPGK QREMVAGFTGDTNTIYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGTLLVTVKP	hz10D9v4
249	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSILSINAMGWYRQAPGK QRELVAGFTGDTNTIYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGTLLVTVKP	hz10D9v5

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
250	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSILSINAMGWYRQPPGK QREL VAGFTGDTNTIYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGLVTVKP	hz10D9v6
251	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDTNTIYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGLVTVKP	hz10D9v7
252	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSINAMGWYRQAPG KQREL VAGFTGDTNTIYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGLVTVKP	hz10D9v8
253	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMGWYRQAPG KQREL VAGFTGDTNTIYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGLVTVKP	hz10D9v9
254	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSSNAMGWYRQAPG KQREL VAGFTGDTNTIYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGLVTVKP	hz10D9v10
255	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFIFSSYAMGWYRQAPG KQREL VAGFTGDTNTIYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGLVTVKP	hz10D9v11
256	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSİYAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDTNTIYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGLVTVKP	hz10D9v12
257	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDTNTIYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLFSRDYEFYWGQGLVTVKP	hz10D9v13
258	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYTIGWFRQFPGK EREGVSCISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDN AKNTVWLQMNDL KSEDTAIYYCATYCPVVVGPELGYDYWGQGTQVTVKP	L10E5
259	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYTIGWFRQAPGK EREGVSCISSSGGSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCATYCPVVVGPELGYDYWGQGLVTVKP	hz10E5v1
260	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYTIGWFRQAPGK EREGVSCISSSGGSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTVWLQMSSL RAEDTAVYYCATYCPVVVGPELGYDYWGQGLVTVKP	hz10E5v2
261	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYTIGWFRQAPGK EREGVSCISSSGGSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNDL RAEDTAVYYCATYCPVVVGPELGYDYWGQGLVTVKP	hz10E5v3
262	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYTIGWFRQAPGK EREGVSCISSSGGSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLK SEDTAIYYCATYCPVVVGPELGYDYWGQGLVTVKP	hz10E5v4

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
263	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYTIGWFRQFP GK EREGVSCISSGGSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCATYCPVVVGPELGYDYWGQGT LVTVKP	hz10E5v5
264	EVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCGPSEIITSDKSVGWWRQAP GK QRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDN AKNTLFLQMNSLK PEDTAVYYCYARDFENEYWGRGTQVTVKP	L8E7
265	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIITSDKSVGWWRQAP GK QRNLVAGISNVGSTNYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGT LVTVKP	hz8E7v1
266	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIITSDKSVGWWRQAP GK QRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGT LVTVKP	hz8E7v2
267	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSVGWWRQAP GK QRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGT LVTVKP	hz8E7v3
268	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIITSDKSVGWWRQAP GK QRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDN AKNTLFLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGT LVTVKP	hz8E7v4
269	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIIFSDKSVGWWRQAP GK QRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGT LVTVKP	hz8E7v6
270	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSVGWYRQAP GK QRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGT LVTVKP	hz8E7v8
271	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSVGWVRQAP GK QRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGT LVTVKP	hz8E7v9
272	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSVGWWRQAP GK QREL VAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGT LVTVKP	hz8E7v10
273	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSVGWFRQAP GK Q RNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLRA EDTAVYYCYARDFENEYWGQGT LVTVKP	hz8E7v11
274	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSVGWWRQAP GK GRELVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGT LVTVKP	hz8E7v12
275	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYREAP G KQREL VAGFTGDGMTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMN SLKPEDTGVYYCAADVFTDRDHDVWYWGQGTQVTVKP	L3G3

10

20

30

40

#	配列	注釈
276	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGMTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSL RAEDTAVYYCAADVFTDRDHVDWYWGQGT LVT VKPGG	hz3G3v1
277	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYREAPGK QREL VAGFTGDGMTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSL RAEDTAVYYCAADVFTDRDHVDWYWGQGT LVT VKP	hz3G3v2
278	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGMTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSL RAEDTAVYYCAADVFTDRDHVDWYWGQGT LVT VKP	hz3G3v3
279	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGMTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSL RAEDTGVYYCAADVFTDRDHVDWYWGQGT LVT VKP	hz3G3v4
280	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDFSINAIGWYRQAPGK QRDMVAGFTGDGVTTYADSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMNSL KPEDTAVYYCAADV KIGGDYEFWFGQGTQVTVKP	L5A7
281	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSDFSINAIGWYRQAPGK QRDMVAGFTGDGVTTYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSL RAEDTAVYYCAADV KIGGDYEFWFGQGT LVT VKP	hz5A7v1
282	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSDFSINAIGWYRQAPGK QRDMVAGFTGDGVTTYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSL RAEDTAVYYCAADV KIGGDYEFWFGQGT LVT VKP	hz5A7v2
283	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSDFSINAIGWYRQAPGK QRDMVAGFTGEGVTTYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSL RAEDTAVYYCAADV KIGGDYEFWFGQGT LVT VKP	hz5A7v3
284	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSDFSINAIGWYRQAPGK QRDLVAGFTGDGVTTYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSL RAEDTAVYYCAADV KIGGDYEFWFGQGT LVT VKP	hz5A7v4
285	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSDFSINAIGWYRQAPGK QRDWVAGFTGDGVTTYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSL RAEDTAVYYCAADV KIGGDYEFWFGQGT LVT VKP	hz5A7v5
286	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSDFSINAIGWYRQPPGK QRDMVAGFTGDGVTTYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSL RAEDTAVYYCAADV KIGGDYEFWFGQGT LVT VKP	hz5A7v6
287	QVQLVQSGGGLVQAGESLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQVLG KQREL VAVVSSDGRTTVAPSVKGRFTISRDN AKNTVSLQMNSL KPEDTGVYYCGVREWYSDSDWRDYEGQGTQVTVKP	L5A8
288	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAVVSSDGRTTVAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSL AEDTAVYYCGVREWYSDSDWRDYEGQGT LVT VKP	hz5A8v1

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
289	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISSINAMGWYRQAPGK QRELVAVVSSDGRITTVAPSVKGRFTISRDNANKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCGVREWYSDSDWRDYEGQGTLVTVKP	hz5A8v2
290	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISSINAMGWYRQVLGK QRELVAVVSSDGRITTVAPSVKGRFTISRDNANKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCGVREWYSDSDWRDYEGQGTLVTVKP	hz5A8v3
291	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISSINAMGWYRQAPGK QRELVAVVSSDGRITTVAPSVKGRFTISRDNANKNTVYLMSSLR AEDTGVYYCGVREWYSDSDWRDYEGQGTLVTVKP	hz5A8v5
292	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISSINAMGWYRQAPGK QRELVAVVSSDGRITTVAPSVKGRFTISRDNANKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCGVREWYSDSDWRDYEGQGTLVTVKP	hz5A8v6
293	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISSINAMGWYRQAPGK QRELVAVVSSDARTTVAPSVKGRFTISRDNANKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCGVREWYSDSDWRDYEGQGTLVTVKP	hz5A8v7
294	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISSINAMGWYRQAPGK QRELVAVVSSDGRITTVAPSVKGRFTISRDNANKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCGVREWYSDADWRDYEGQGTLVTVKP	hz5A8v8
295	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISSINAMGWYRQAPGK QRELVAVVSSDGRITTVAPSVKGRFTISRDNANKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCGVREWYSEDWRDYEGQGTLVTVKP	hz5A8v9
296	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISSINAMGWYRQAPGK QRELVAVVSSDARTTVAPSVKGRFTISRDNANKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCGVREWYSDADWRDYEGQGTLVTVKP	hz5A8v10
297	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSISSINAMGWYRQAPGK QREWVAVVSSDGRITTVAPSVKGRFTISRDNANKNTVYLMSSL RAEDTAVYYCGVREWYSDSDWRDYEGQGTLVTVKP	hz5A8v11
298	EVQLVESGGGEVQAGGSLRLSCAASGSISSINAMGWYRQAPGK QRELVAVVSSDGRITTVAPSVKGRFTISRDNANKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCGVREWYSDSDWRDYEGQGTLVTVKP	hz5A8v12
299	QVQLQESGGGLVQTGGSLTLSCGASEITFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAHSVKGRFTISRDNANKNTVYLMNSL KPEDTAVYYCHARDFENEYWGRGTQVTVKP	L6C5
300	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEITFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAESVKGRFTISRDNANKNTLYLMSSLR AEDTAVYYCHARDFENEYWQGTLVTVKP	hz6C5v1
301	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEITFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAESVKGRFTISRDNANKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCHARDFENEYWQGTLVTVKPG	hz6C5v2

10

20

30

40

#	配列	注釈
302	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEITFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAHSVKGRTISRDNANTVYLMSSLR AEDTAVYYCHARDFENEYWGQGTLLTVKP	hz6C5v3
303	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGASEITFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAESVKGRTISRDNANTVYLMSSLR AEDTAVYYCHARDFENEYWGQGTLLTVKP	hz6C5v4
304	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEITFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVESTNYAESVKGRTISRDNANTVYLMSSLR AEDTAVYYCHARDFENEYWGQGTLLTVKP	hz6C5v5
305	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEITFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDATNYAESVKGRTISRDNANTVYLMSSLR AEDTAVYYCHARDFENEYWGQGTLLTVKP	hz6C5v6
306	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCGASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAQSVKGRTISRDNANTVYLMNSL KPEDTAVYYCYARDFESEYWGRTQVTVK	L6F1
307	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAESVKGRTISRDNANTLYLMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGQGTLLTVK	hz6F1v1
308	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAESVKGRTISRDNANTVYLMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGQGTLLTVK	hz6F1v2
309	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAQSVKGRTISRDNANTVYLMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGQGTLLTVK	hz6F1v3
310	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAESVKGRTISRDNANTVYLMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGQGTLLTVK	hz6F1v4
311	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAESVKGRTISRDNANTVYLMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGRTQVTVK	hz6F1v5
312	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVESTNYAESVKGRTISRDNANTVYLMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGQGTLLTVK	hz6F1v6
313	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDATNYAESVKGRTISRDNANTVYLMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGQGTLLTVK	hz6F1v7
314	QVQLQQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGDSFSINAMGWYRQGEL VAGFTGDGNPIYADSVKGRTISRGNAENTVSLQMNSLKPEDT AVYYCAADVKGGDYEWYWGQGTQVTVK	3B4

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
315	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSLDDYTIGWFRQAPG KREGVSCISSGGSTVHADSVKGRFTISRDNANTVWLQMNS LKPEDTAVYYCATWCGVATMTEDLPFDYWGQGLVTVK	6A1
316	QVQLQESGGGLVQAGGSLTLSCAASGSIFSINAMGWYRQGD VAGFTSEGS AKYADSVKGRFTISRDDAKNMVTLQMNSLKPED TAVYYCAADIFSDRDHVDWYWGQGLVTVK	5H8
317	QVQLQESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLDDYTIGWFRQAPGK EREGVSCISSGGSTYYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSL KPEDTAVYYCATYCPVTIADDELGFDYWGQGLVTVK	3B12
318	QVTLRSGGGLVQAGGSLRLSCGASEITLSDKTVGWYRQAPG KQRVLVAVISNVDSTNYAHSV KGRFTISRDNANTVYLQMNS LKPEDTAVYYCYARDFEAEYWGQGLVTVK	6B4
319	GSILSINAMG	CDR-H1 (L10D9, hz10D9v1,2,3,4,5, 6)
320	GSIFSINAMG	CDR-H1 (hz10D9v7, L3G3, hz3G3v1,2,3,4, L5A8, hz5A8v1,2,3,4,5,6, 7,8,9,10,11,12, DLL3-5H8- 3245.seq, DLL3- 3G12-3245.seq, DLL3-3C9- 3245.seq, DLL3- 3C5-3245.seq, DLL3-3F6- 3245.seq, DLL3- 3H12-3245.seq, 3C5, hz3C5v1,2,3,4,5,6, 7,8)
321	GFTFSINAMG	CDR-H1 (hz10D9v8)
322	GFTFSSYAMG	CDR-H1 (hz10D9v9)
323	GSIFSSNAMG	CDR-H1 (hz10D9v10)
324	GFIFSSYAMG	CDR-H1 (hz10D9v11)

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
325	GSIFSIYAMG	CDR-H1 (hz10D9v12)
326	GFIFSINAMG	CDR-H1 (hz10D9v13)
327	GFTLDDYTIG	CDR-H1 (L10E5, hz10E5v1,2,3,4,5)
328	EIITSDKSVG	CDR-H1 (L8E7, hz8E7v1,2,3,4,5,8, 9,10,11,12,14)
329	EIIFSDKSVG	CDR-H1 (hz8E7v6)
330	GSDFSINAIG	CDR-H1 (L5A7, hz5A7v1,2,3,4,5,6)
331	EITFSDKTVG	CDR-H1 (L6C5, hz6C5v1,2,3,4,5,6)
332	EIIFSDKTVG	CDR-H1 (L6F1, hz6F1v1,2,3,4,5,6, 7)
333	GSDFSINAMG	CDR-H1 (3B4)
334	GFSLDDYTIG	CDR-H1 (DLL3- 6A1-3245.seq, DLL3-3B12- 3245.seq)
335	EITLSDKTVG	CDR-H1 (DLL3- 6B4-3245.seq)
336	GFTGDGNTI	CDR-H2 (L10D9, hz10D9v1,2)
337	GFTGEGNTI	CDR-H2 (hz10D9v3)
338	GFTGDTNTI	CDR-H2 (hz10D9v4,5,6,7,8, 9,10,11,12,13)
339	CISSSGGSTY	CDR-H2 (L10E5, hz10E5v1,2,3,4,5, DLL3-3B12- 3245.seq)
340	GISNVGSTN	CDR-H2 (L8E7, hz8E7v1,2,3,4,5,6,

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
		8,9,10,11,12, 13, 14, 15, 16)
341	GFTGDGMTK	CDR-H2 (L3G3, hz3G3v1,2,3,4, DLL3-3G12- 3245.seq, DLL3- 3H12-3245.seq)
342	GFTGDGVTT	CDR-H2 (L5A7, hz5A7v1,4,5,6)
343	GFTGDTVTT	CDR-H2 (hz5A7v2)
344	GFTGEGVTT	CDR-H2 (hz5A7v3)
345	VVSSDGRTT	CDR-H2 (L5A8, hz5A8v1,2,3,4,5,8, 9,11,12, DLL3- 3E7-3245.seq)
346	VVSSEGRIT	CDR-H2 (hz5A8v6)
347	VVSSDARTT	CDR-H2 (hz5A8v7,10)
348	VISNVDSTN	CDR-H2 (L6C5, hz6C5v1,2,3,4, L6F1, hz6F1v1,2,3,4,5, DLL3-6B4- 3245.seq)
349	VISNVESTN	CDR-H2 (hz6C5v5, hz6F1v6)
350	VISNV DATN	CDR-H2 (hz6C5v6,hz6F1v7)
351	GFTGDGNPI	CDR-H2 (3B4)
352	CISSSGGSTV	CDR-H2 (DLL3- 6A1-3245.seq)
353	GFTSEGS AK	CDR-H2 (DLL3- 5H8-3245.seq)

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
354	DVQLFSRDYEFY	CDR-H3 (L10D9, hz10D9v1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13)
355	YCPVVVGPELGYDY	CDR-H3 (L10E5, hz10E5v1,2,3,4,5)
356	RDFENEY	CDR-H3 (L8E7, hz8E7v1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16; L6C5, hz6C5v1,2,3,4,5,6)
357	DVFTDRDHVDWY	CDR-H3 (L3G3, hz3G3v1,2,3,4, DLL3-3G12-3245.seq)
358	DVKIGGDYEFW	CDR-H3 (L5A7, hz5A7v1,2,3,4,5,6)
359	REWYSDSDWRDY	CDR-H3 (L5A8, hz5A8v1,2,3,4,5,6,7,11,12, DLL3-3E7-3245.seq)
360	REWYSDADWRDY	CDR-H3 (hz5A8v8,10)
361	REWYSEDWRDY	CDR-H3 (hz5A8v9)
362	RDFESEY	CDR-H3 (L6F1, hz6F1v1,2,3,4,5,6,7)
363	DVKIGGDYEWY	CDR-H3 (3B4)
364	WCGVATMTEDLPFDY	CDR-H3 (DLL3-6A1-3245.seq)
365	DIFSDRDHVDWY	CDR-H3 (DLL3-5H8-3245.seq)
366	YCPVTIADELGFDY	CDR-H3 (DLL3-3B12-3245.seq)
367	RDFEAEY	CDR-H3 (DLL3-6B4-3245.seq)

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
368	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL (CON)
369	GGSGGS	(GGG)2リンカー
370	GGSGGS	(GGG)3 リンカー
371	GGSGGS	(GGG)4リンカー
372	GGSGGS	(GGG)5リンカー
373	GGGG	グリシンリンカー
374	GGGGG	グリシンリンカー
375	GGGGGG	グリシンリンカー
376	GGSGGS	(GGG)2リンカー
377	GGSGGS	(GGG)3 リンカー
378	GGSGGS	(GGG)4リンカー
379	GGSGGS	(GGG)5リンカー
380	GGGG	グリシンリンカー
381	GGGGG	グリシンリンカー
382	GGGGGG	グリシンリンカー
383	GGGGGG	グリシンリンカー
384	GFTGDGSTK	CDR-H2 (3C5, hz3C5v1,2,5,6,7,8)
385	GGSGGS	(GGG)2リンカー
386	GGSGGS	(GGG)3 リンカー
387	GGSGGS	(GGG)4リンカー
388	GGSGGS	(GGG)5リンカー
389	GGGG	グリシンリンカー
390	GGGGG	グリシンリンカー
391	GGGGGG	グリシンリンカー
392	GGSGGS	(GGG)4リンカー

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
393	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGG)5リンカー
394	GGGG	グリシンリンカー
395	DVQLLNSDYEFY	CDR-H3 (3C5, hz3C5v1,2,3,4)
396	GGSGGS	(GGG)2リンカー
397	GGSGGSGGS	(GGG)3リンカー
398	GGSGGSGGSGGS	(GGG)4リンカー
399	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGG)5リンカー
400	GGGG	グリシンリンカー
401	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQPPG KQREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMNS LKPEDTAVYYCAADVQLLNSDYEFYWGQGTQVTVKP	3C5
402	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLNSDYEFYWGQGT LTVKPGG	hz3C5v1
403	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQPPGK QREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLNSDYEFYWGQGT LTVKPGG	hz3C5v2
404	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDTSTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLNSDYEFYWGQGT LTVKPGG	hz3C5v3
405	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGEGSTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLNSDYEFYWGQGT LTVKPGG	hz3C5v4
406	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLSSDYEFYWGQGT LTVKPGG	hz3C5v5
407	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLTS DYEFYWGQGT LTVKPGG	hz3C5v6
408	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLQSDYEFYWGQGT LTVKPGG	hz3C5v7
409	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLNTDYEFYWGQGT LTVKPGG	hz3C5v8

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
410	GFTGDTSTK	CDR-H2 (hz3C5v3)
411	GFTGEGSTK	CDR-H2 (hz3C5v4)
412	DVQLLSSDYEFY	CDR-H3 (hz3C5v5)
413	DVQLLTSDYEFY	CDR-H3 (hz3C5v6)
414	DVQLLQSDYEFY	CDR-H3 (hz3C5v7)
415	DVQLLNTDYEFY	CDR-H3 (hz3C5v8)
416	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSVGWWRQAPGK QRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGTLLTVKPKP	hz8E7v5
417	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKGRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMSSLR RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPKPGG	hz18H10v1
418	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMSSLR RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPKPGG	hz18H10v2
419	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPKPGG	hz18H10v3
420	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPKPGG	hz18H10v4
421	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPKPGG	hz18H10v5
422	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPKPGG	hz18H10v6
423	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPKPGG	hz18H10v7
424	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAPG KQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPKPGG	hz18H10v8
425	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAPG KQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPKPGG	hz18H10v9
426	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSLR RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPKPGG	hz18H10v10

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
427	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRENAKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v11
428	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRENAKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v12
429	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRELVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRENAKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v13
430	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v14
431	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v15
432	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRENAKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v16
433	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v17
434	GSMTGANTMG	CDR1
435	GSVTGANTMG	CDR1
436	GSITGANTMG	CDR1
437	LIGNYVTH	CDR2
438	YTDNLGTS	CDR3
439	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYHYADSVKGRFTISRENAKNTVILQMNSLNP EDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	18H10
440	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP	ノブ Fc
441	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP	ホール Fc
442	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT QKSLSLSP	ノブ Fc
443	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYT QKSLSLSP	ホール Fc

10

20

30

40

#	配列	注釈
444	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NRYTQKSLSLSP	ホール Fc
445	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYT QKSLSLSP	ホール Fc
446	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNH YTQKSLSLSP	ノブ Fc
447	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYT QKSLSLSP	ノブ Fc
448	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRY TQKSLSLSP	ホール Fc
449	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRYT QKSLSLSP	ホール Fc
450	PGGGG	リンカー
451	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKP GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEA DYICALWYSNHWVFGGCKLTVL	CD3-VL20
452	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKP GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEA DYICALWYSNHWVFGCGTKLTVL	CD3-VL21
453	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTSTYAMNWVRQAPG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	CD3-VH32
454	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTSTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADTVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTV	CD3-VH34
455	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEITSDKSMGWVRQAPGK QRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGLTVTVKP	hz8E7v16

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
456	EIITSDKSMG	CDR-H1 (L8E7, hz8E7v13, 15, 16)
457	GFSFSINAMG	41BB CDR1
458	AIESGRNTV	41BB CDR2
459	LKGNRVVSPSVAY	41BB CDR3
460	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	CD3-VH33
461	GFTFNTYAMN	抗CD3 VH CDR1
462	RIRSKYNNYATY	抗CD3 VH CDR2
463	HGNFGDSYVSWFAY	CD3-VH7, VH33 CDR3
464	ALWYSNHWV	CD3-VL2, VL21 CDR3
465	VLWYSNRWV	CD3-VL8 CDR3
466	GFTFSTYAMN	CD3 VH33 CDR1
467	RIRSKYNNYATY	CD3 VH33 CDR2
468	GSSTGAVTTSNYAN	CD3 VL21 CDR1
469	GTNKRAP	CD3 VL21 CDR2
470	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMGWYRQAPG KRREFVAAIESGRNTVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCGLLKGNRVVSPSVAYWGQGLTVTVKP	41BB sdAb
471	IEPDP	リンカー
472	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	Fc-Het-1
473	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	Fc-Het-2
474	GGG(GGS) _n , (n=0~10)	リンカー
475	AGVFELQIHSFGPGPGAPRSPCSARLPCRLFFRVCLKPGLSEE AAESPCALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDGLLQVPFRD AWPGTFSEFIETWREELGDQIGGPAWSLLARVAGRRRLAAGGP WARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAPSRC GPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGW TGPLCTVPVSTSSCLSPRGPSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGG SCSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGG ADPDSAYICHCPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGH ALRCRCRAGFAGPRCEHDLDDCAGRACANGGTCVEGGGAHR CSCALGFGGRDCRERADPCAARPCAHHGGRCYAHFSGLVCA PGYMGARCEFPVHPDGASALPAAPPGLRPGDPQRYL	DLL3 ECD; ヒト DLL3のアミノ酸 27~492, UniProt 番号 Q9NYJ7
476	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSMGWWRQAPGK QRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGLTVTVKP	hz8E7v13

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
477	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSVGWVRQAPGK QRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGLTVTKP	hz8E7v14
478	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSMGWVRQAPGK QRNLVAGISNVGSTNYAQSVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFENEYWGQGLTVTKP	hz8E7v15
479	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGMTKYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSL RAEDTAVYYCAADVFTDRDHVDWYWGQGLTVTKP	hz3G3v1
480	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEITFSDKTGVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVGSTNYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCHARDFENEYWGQGLTVTKP	hz6C5v2
481	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLNSDYEFYWGQGLTVTKP	hz3C5v1
482	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQPPGK QREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLNSDYEFYWGQGLTVTKP	hz3C5v2
483	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDTSTKYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLNSDYEFYWGQGLTVTKP	hz3C5v3
484	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGEGSTKYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLNSDYEFYWGQGLTVTKP	hz3C5v4
485	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLSDYEFYWGQGLTVTKP	hz3C5v5
486	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLTSDYEFYWGQGLTVTKP	hz3C5v6
487	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLQSDYEFYWGQGLTVTKP	hz3C5v7
488	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGK QREL VAGFTGDGSTKYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCAADVQLLNTDYEFYWGQGLTVTKP	hz3C5v8
489	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYHYADSVKGRFTISRENAKNTVILQMNSLNP EDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTKP	18H10
490	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKGRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTKP	hz18H10v1
491	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTKP	hz18H10v2
492	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTKP	hz18H10v3
493	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTKP	hz18H10v4

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
494	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v5
495	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v6
496	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v7
497	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v8
498	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v9
499	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v10
500	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v11
501	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v12
502	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRELVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v13
503	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v14
504	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v15
505	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v16
506	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v17
507	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCGASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAQSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCYARDFESEYWGRTQVTVKP	L6F1
508	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGQGLVTVKP	hz6F1v1
509	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGQGLVTVKP	hz6F1v2
510	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAQSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGQGLVTVKP	hz6F1v3

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
511	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAESVKGRFTISRDNNAKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGQGTLLVTVKP	hz6F1v4
512	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDSTNYAESVKGRFTISRDNNAKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGRTQVTVKP	hz6F1v5
513	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVESTNYAESVKGRFTISRDNNAKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGQGTLLVTVKP	hz6F1v6
514	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASEIIFSDKTVGWYRQAPGK QRVLVAVISNVDATNYAESVKGRFTISRDNNAKNTVYLMSSLR AEDTAVYYCYARDFESEYWGQGTLLVTVKP	hz6F1v7
515	QVQLQESGGGLVQAGGSLTLSCAASGSIFSINAMGWYRQGD VAGFTSEGS AKYADSVKGRFTISRDDAKNMVTLQMNSLKPED TAVYYCAADIFSDRDHVDWYWGQGTLLVTVKP	5H8
516	QVQLQESGGGLVQSGGSLRLSCAASGFSLLDYYTIGWFRQAPGK EREGVSCISSSGGSTYYADSVKGRFTISRDNNAENTVYLMNSL KPEDTAVYYCATYCPVTIADDELGFYWGQGTLLVTVKP	3B12
517	QVTLRESGGGLVQAGGSLRLSCGASEITLSDKTVGWYRQAPG KQRVLVAVISNVDSTNYAHSVKGRTISRDNNAKNTVYLMNS LKPEDTAVYYCYARDFEAEYWGQGTLLVTVKP	6B4
518	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGFSLLDYYTIGWFRQAPG KREGVSCISSSGGSTVHADSVKGRFTISRDNNAKNTVWLMNS LKPEDTAVYYCATWCGVATMTEDLPFDYWGQGTLLVTVKP	6A1
519	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSGYADSVKGRFTISRDNNAKNSLYLMNSL RAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLLTVSS	抗CD3 VH 312557
520	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KCLEWVSGISWNSGSGYADSVKGRFTISRDNNAKNSLYLMNSL RAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLLTVSS	抗CD3 VH 312557 G44C
521	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYNNWPWTFGQGTKVEIK	抗CD3 VL 312557
522	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYNNWPWTFGCGTKVEIK	抗CD3 VL 312557Q100C
523	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCVASGFTFDDYSMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSKDYADSVKGRFTISRDNNAKNSLYLMN SLRAEDTALYYCAKYGSGYGKIFYHYGLDVWGQGTLLTVSS	CD3-VH-G
524	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCVASGFTFDDYSMHWVRQAPG KCLEWVSGISWNSGSKDYADSVKGRFTISRDNNAKNSLYLMN SLRAEDTALYYCAKYGSGYGKIFYHYGLDVWGQGTLLTVSS	CD3-VH-G
525	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTPPITFGQGRLEIK	V _{K1} -39J _{K5}
526	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTPPITFGCGTRLEIK	V _{K1} -39J _{K5} Q100C
527	(ADAAP) _n n=2-20	リンカー
528	(ADAAP) _n -G n=2-20	リンカー

10

20

30

40

#	配列	注釈
529	(GEPQG)n n=2-20	リンカー
530	(GEPQG)n-G n=2-20	リンカー
531	(AGGEP)n n=2-20	リンカー
532	(AGGEP)n-G n=2-20	リンカー
533	(AGSEP)n n=2-20	リンカー
534	(AGSEP)n-G n=2-20	リンカー
535	(GGGEQ)n n=2-20	リンカー
536	(GGGEQ)n-G n=2-20	リンカー
537	ADAAPADAAPG	リンカー
538	GEPQGGEPQGG	リンカー
539	AGGEPAGGEPG	リンカー
540	AGSEPAGSEPG	リンカー
541	GGGEQGGGEQG	リンカー

10

20

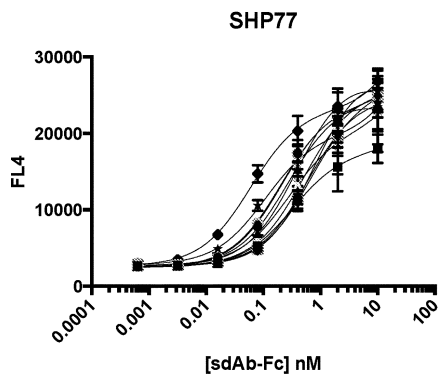
30

40

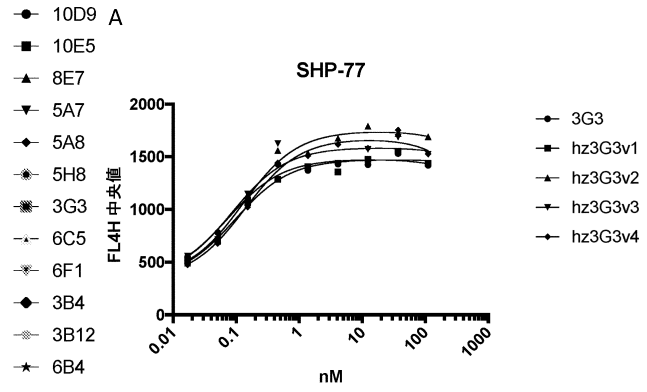
50

【図面】

【図 1】

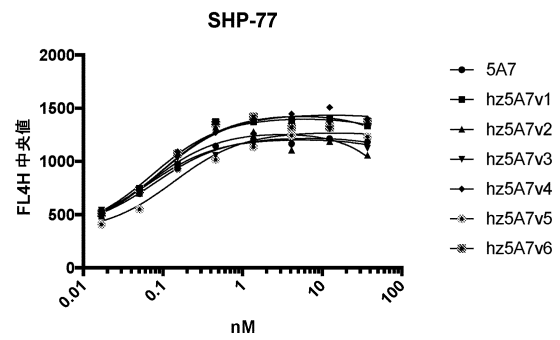


【図 2 - 1】



10

B



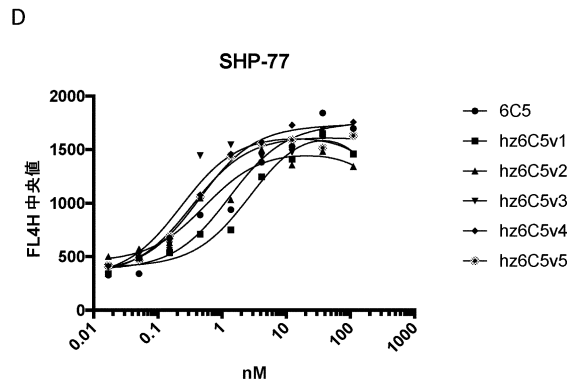
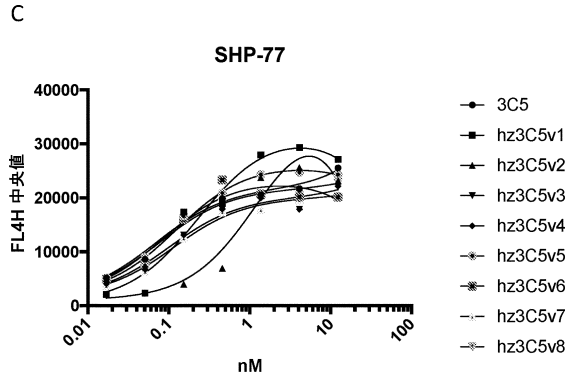
20

30

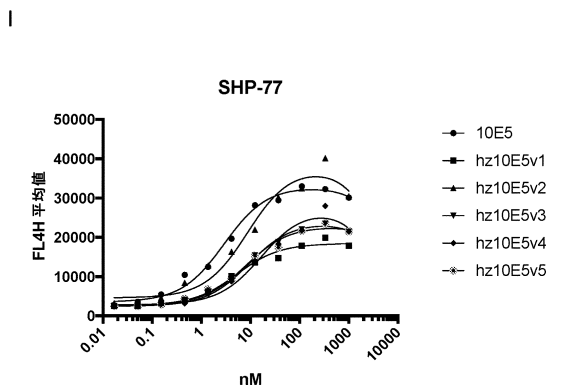
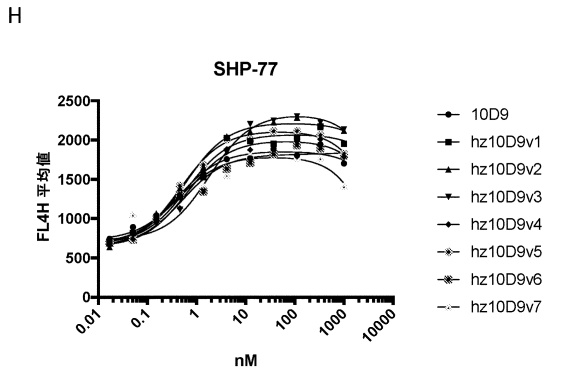
40

50

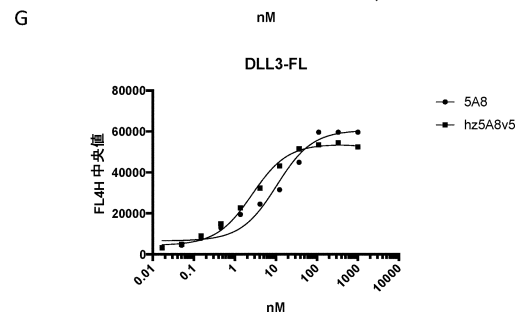
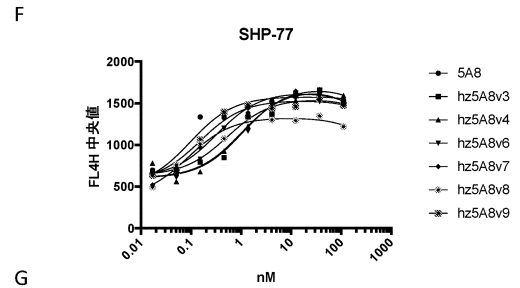
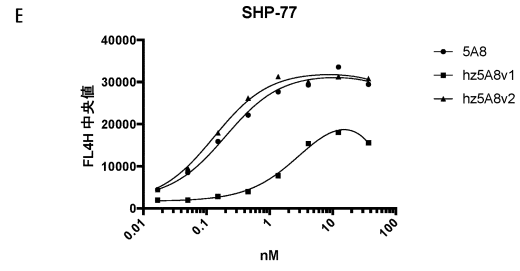
【図 2 - 2】



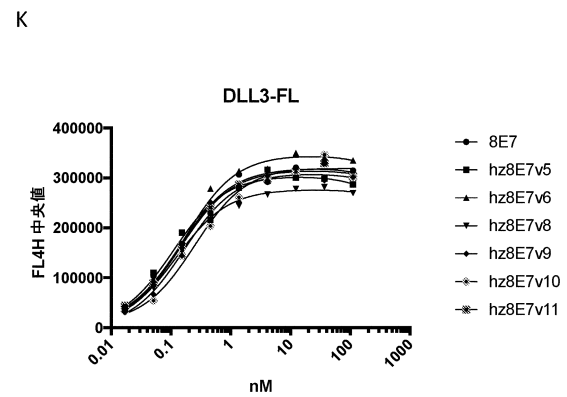
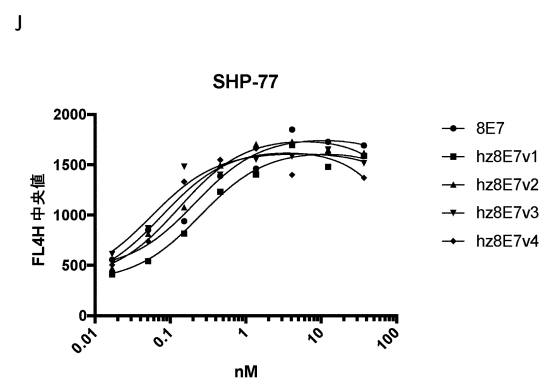
【図 2 - 4】



【図 2 - 3】



【図 2 - 5】



10

20

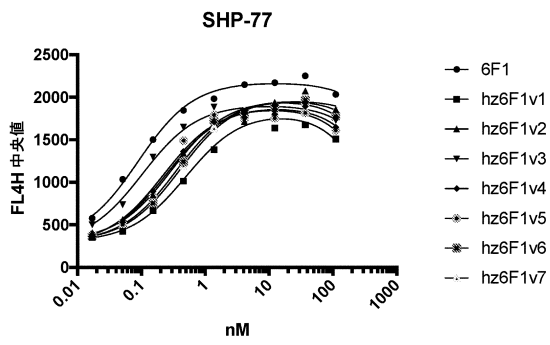
30

40

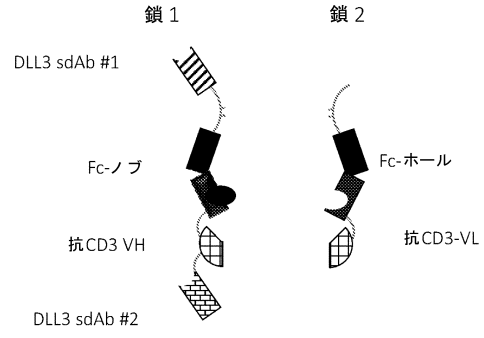
50

【図 2 - 6】

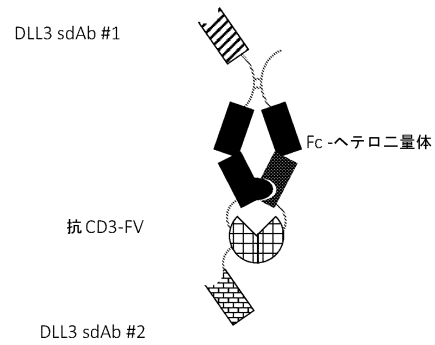
L



【図 3 A】

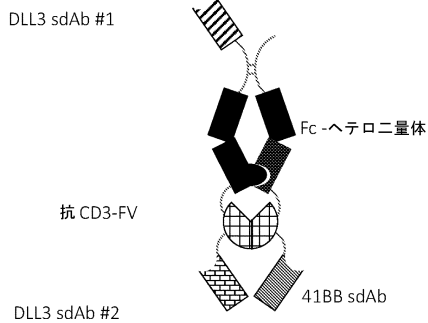
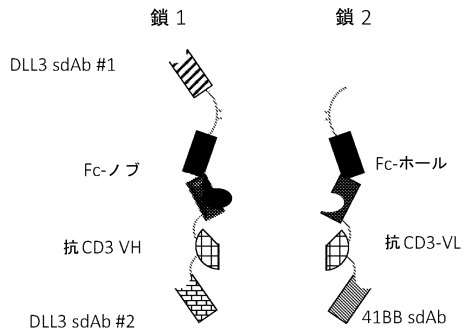


10

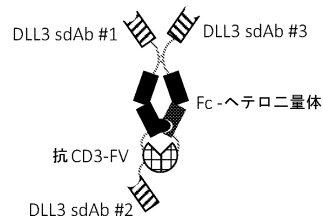
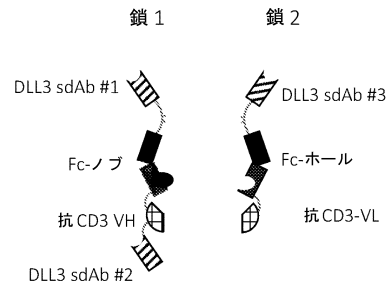


20

【図 3 B】



【図 3 C】

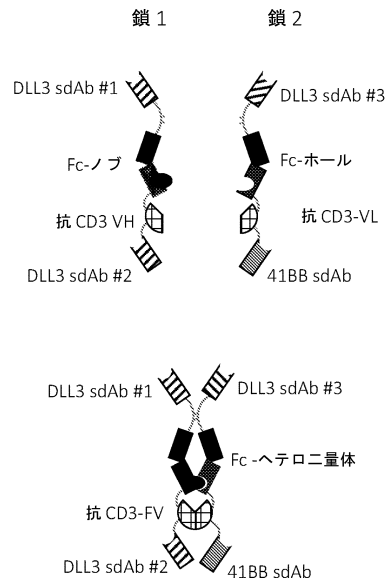


30

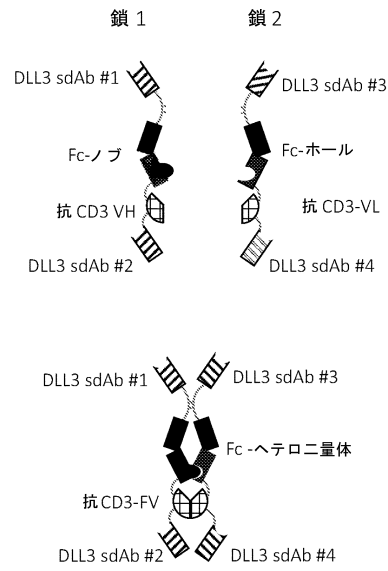
40

50

【図 3 D】



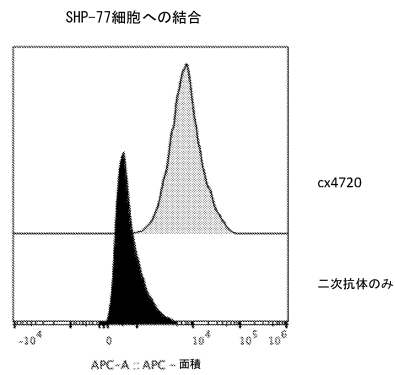
【図 3 E】



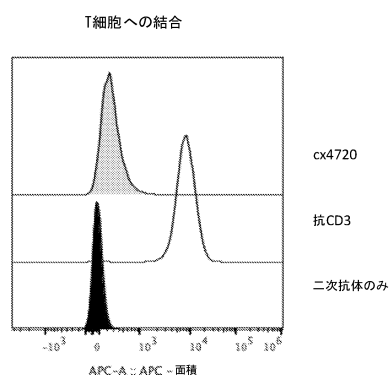
10

【図 4】

A

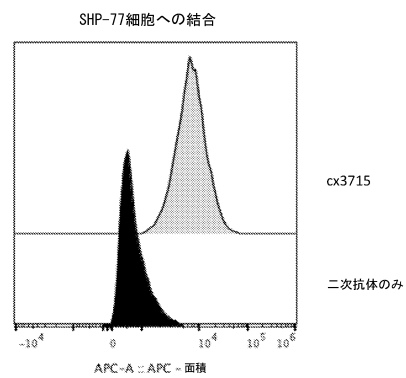


B

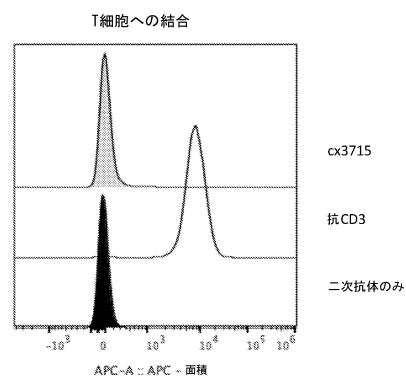


【図 5】

A



B



20

30

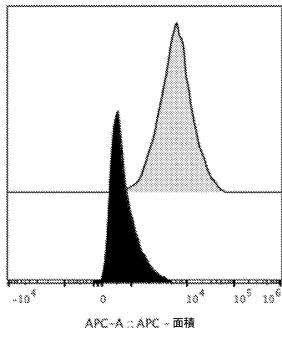
40

50

【図 6】

A

SHP-77細胞への結合

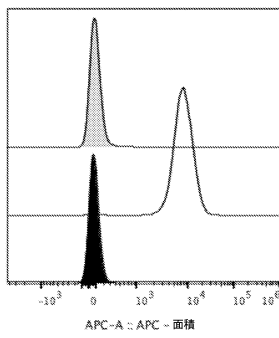


cx4422

二次抗体のみ

B

T細胞への結合



cx4422

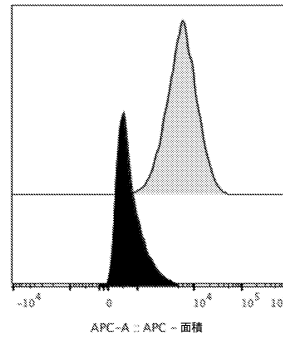
抗CD3

二次抗体のみ

【図 7】

A

SHP-77細胞への結合

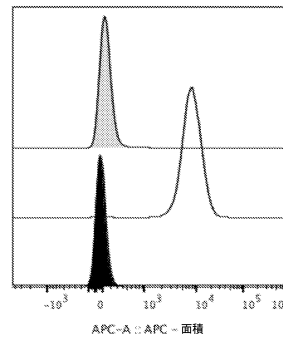


cx3708

二次抗体のみ

B

T細胞への結合



cx3708

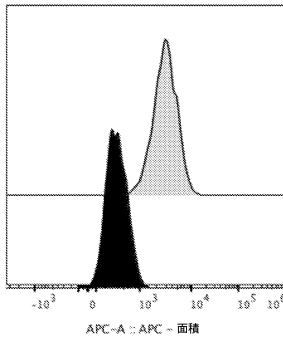
抗CD3

二次抗体のみ

【図 8】

A

SHP-77細胞への結合

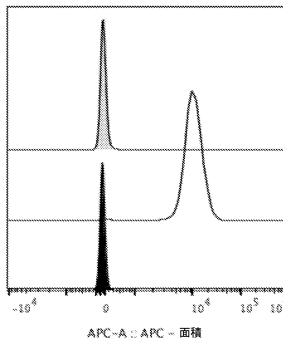


cx4052

二次抗体のみ

B

T細胞への結合



cx4052

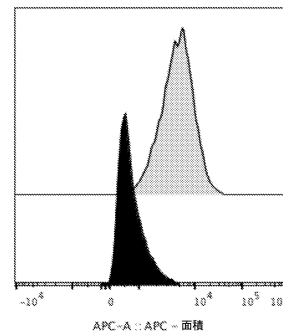
抗CD3

二次抗体のみ

【図 9】

A

SHP-77細胞への結合

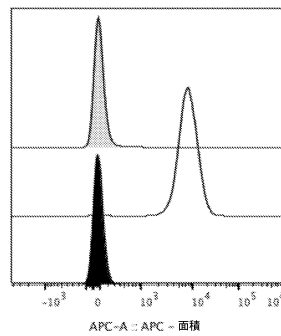


cx3985

二次抗体のみ

B

T細胞への結合



cx3985

抗CD3

二次抗体のみ

10

20

30

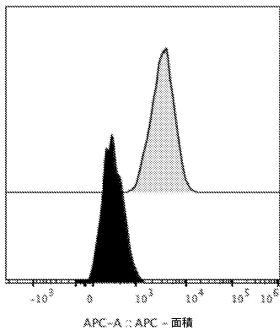
40

50

【図 1 0】

A

SHP-77細胞への結合

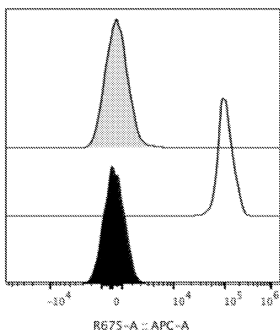


cx4059

二次抗体のみ

B

T細胞への結合



cx4059

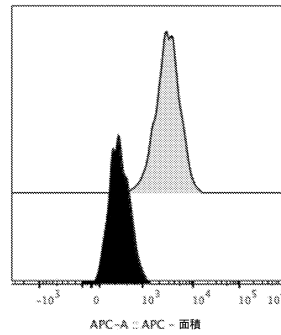
抗CD3

二次抗体のみ

【図 1 1】

A

SHP-77細胞への結合

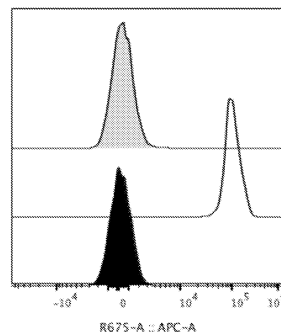


cx4087

二次抗体のみ

B

T細胞への結合



cx4087

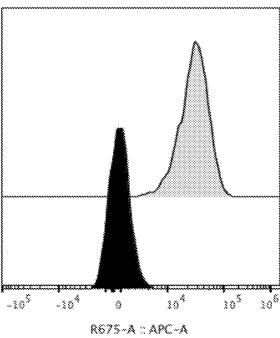
抗CD3

二次抗体のみ

【図 1 2】

A

SHP-77細胞への結合

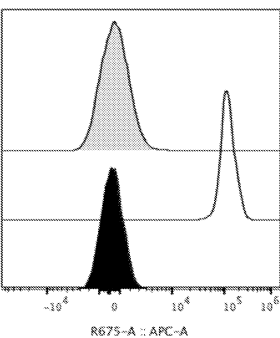


cx4088

二次抗体のみ

B

T細胞への結合



cx4088

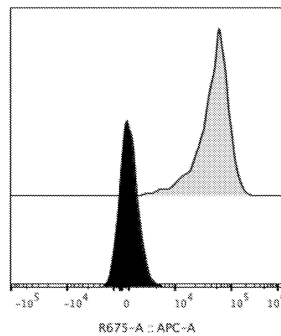
抗CD3

二次抗体のみ

【図 1 3】

A

SHP-77細胞への結合

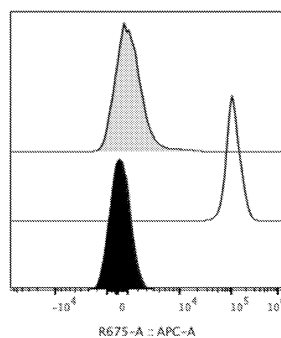


cx4895

二次抗体のみ

B

T細胞への結合



cx4895

抗CD3

二次抗体のみ

10

20

30

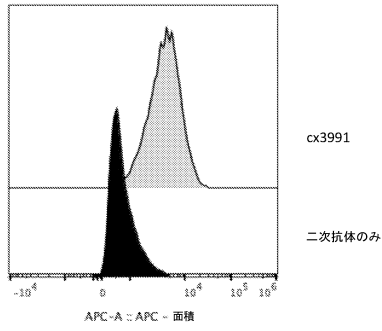
40

50

【図 1 4】

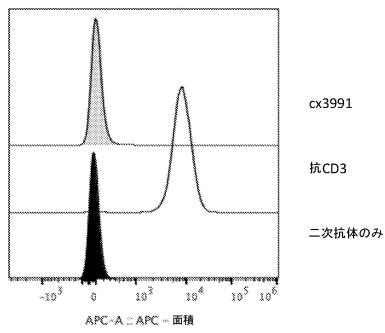
A

SHP-77細胞への結合



B

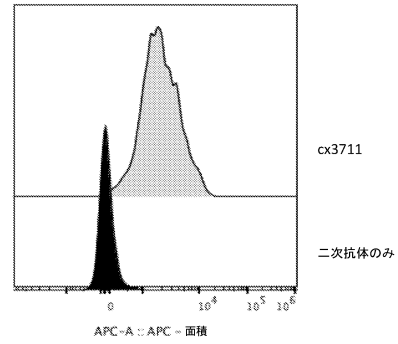
T細胞への結合



【図 1 5】

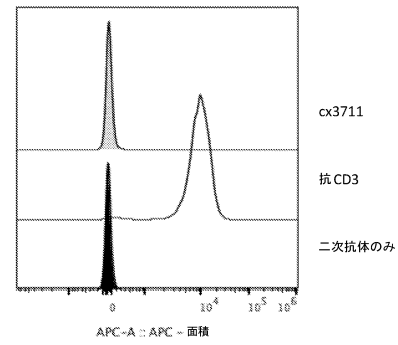
A

SHP-77細胞への結合



B

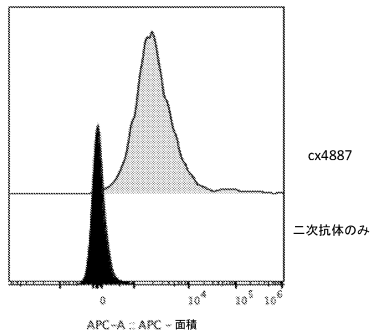
T細胞への結合



【図 1 6】

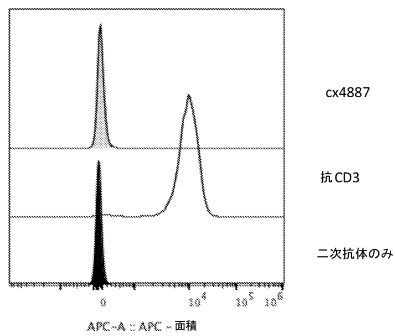
A

SHP-77細胞への結合



B

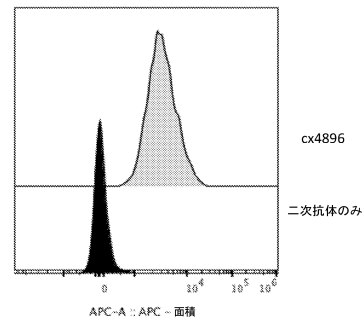
T細胞への結合



【図 1 7】

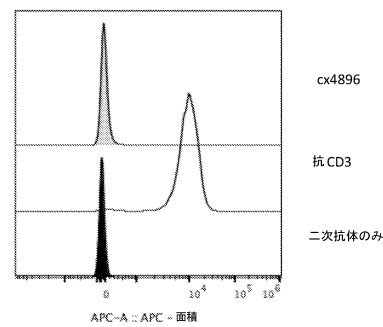
A

SHP-77細胞への結合



B

T細胞への結合



10

20

30

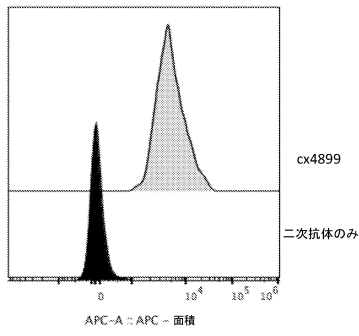
40

50

【図 18】

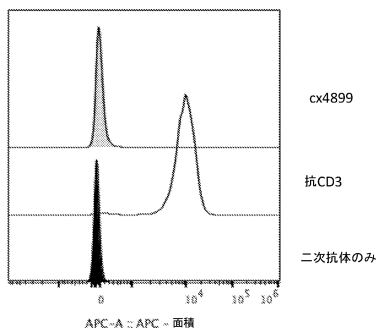
A

SHP-77細胞への結合



B

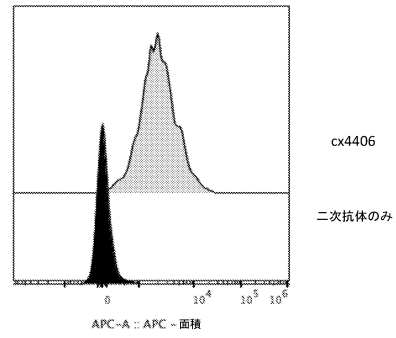
T細胞への結合



【図 19】

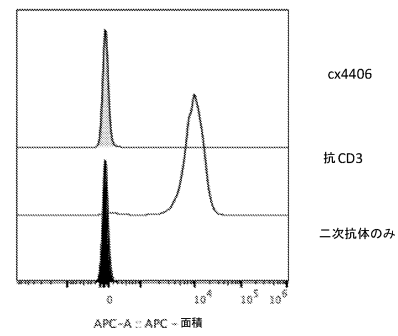
A

SHP-77細胞への結合



B

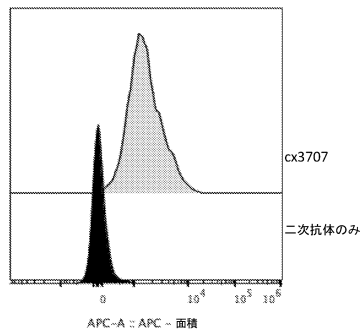
T細胞への結合



【図 20】

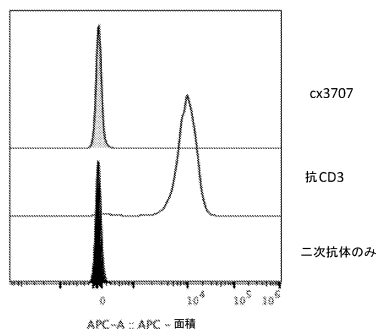
A

SHP-77細胞への結合



B

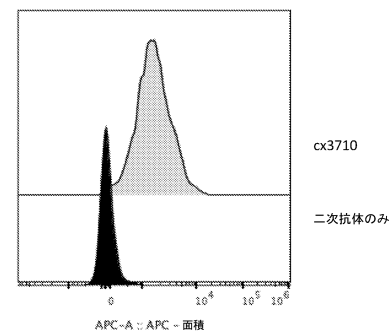
T細胞への結合



【図 21】

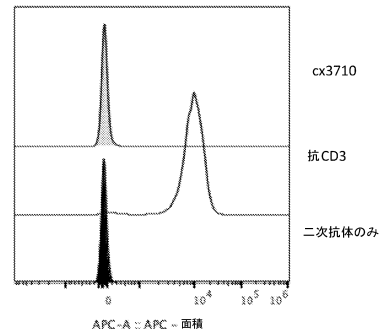
A

SHP-77細胞への結合



B

T細胞への結合



10

20

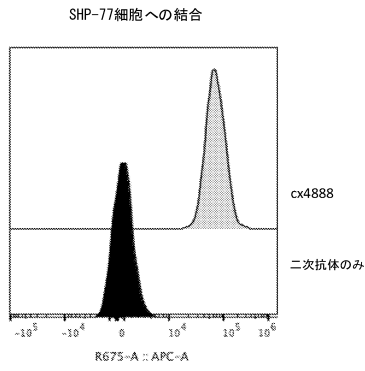
30

40

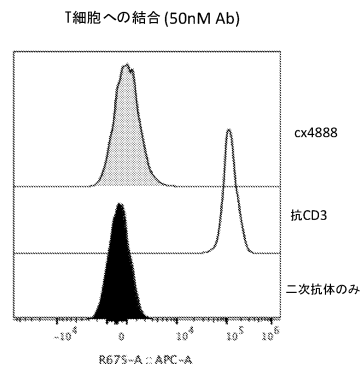
50

【図 2 2】

A

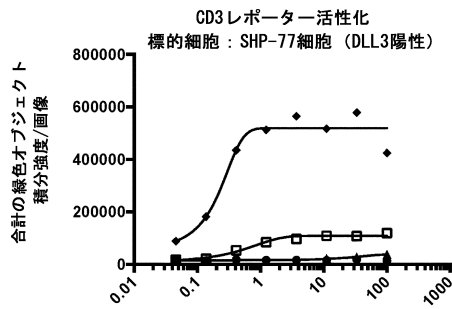


B

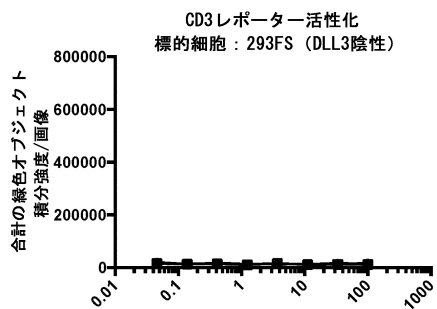


【図 2 4】

A

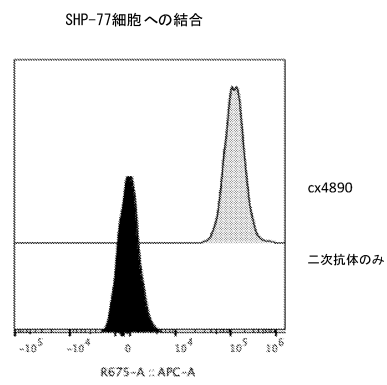


B

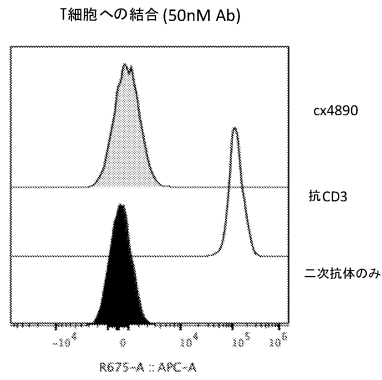


【図 2 3】

A

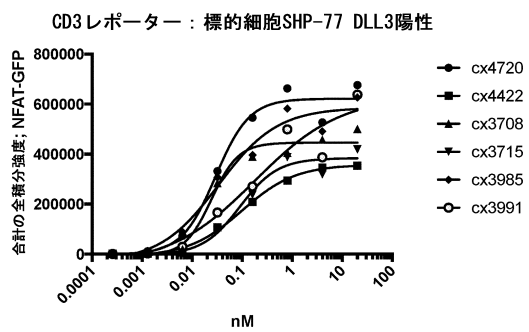


B

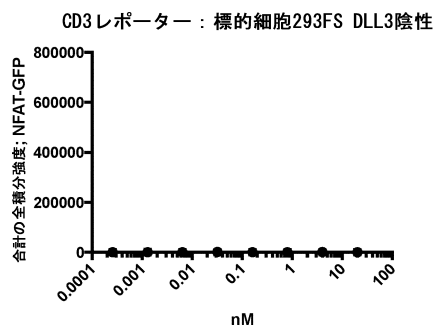


【図 2 5 - 1】

A



B



10

20

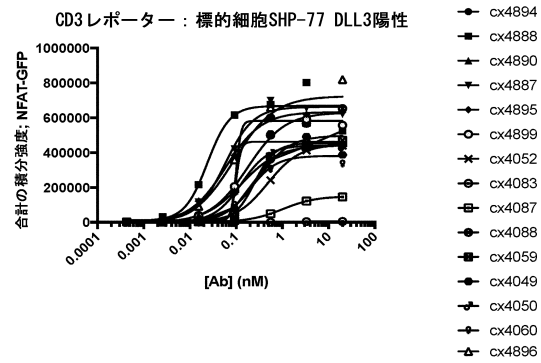
30

40

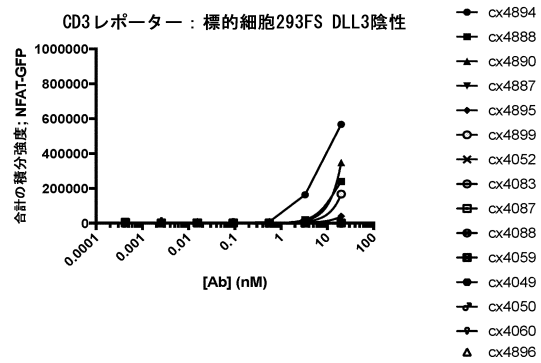
50

【図 25 - 2】

C

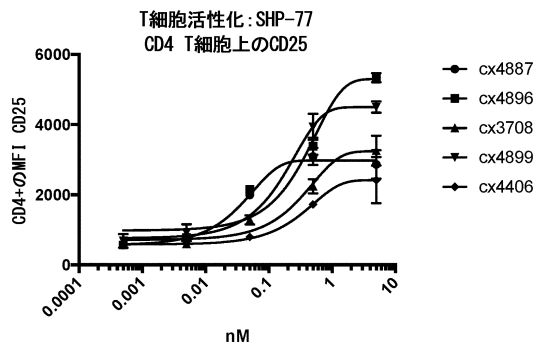


D

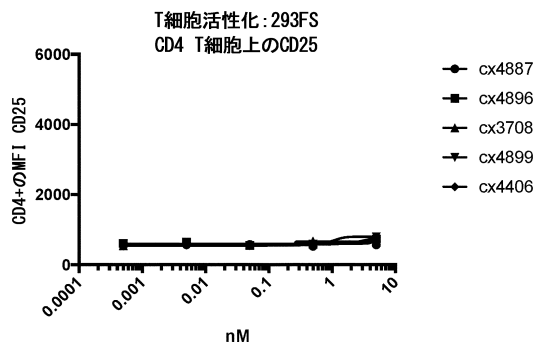


【図 27 - 1】

A

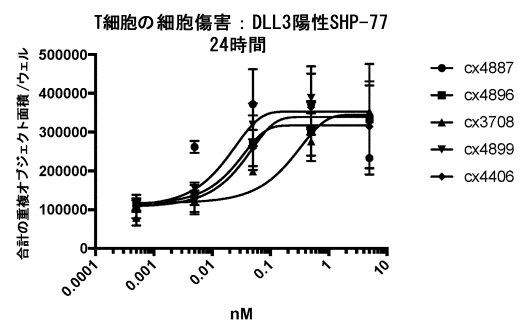


B

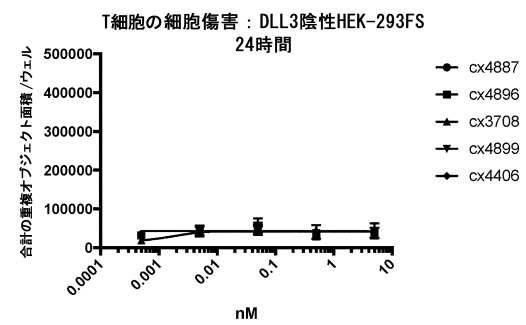


【図 26】

A

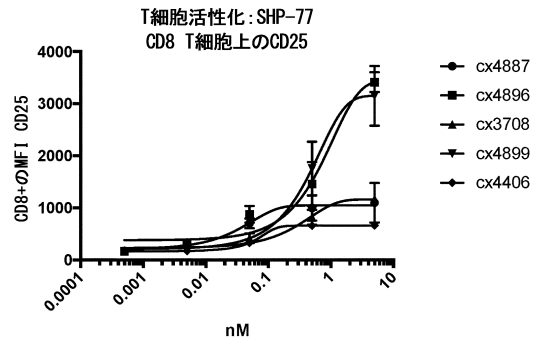


B

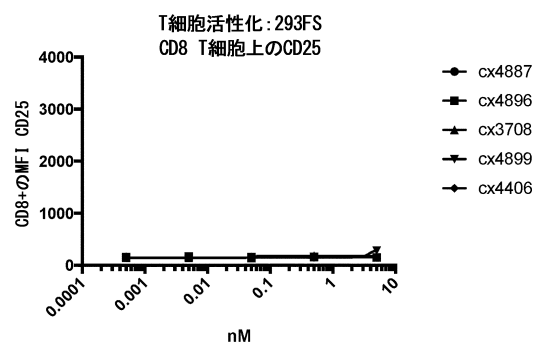


【図 27 - 2】

C



D



10

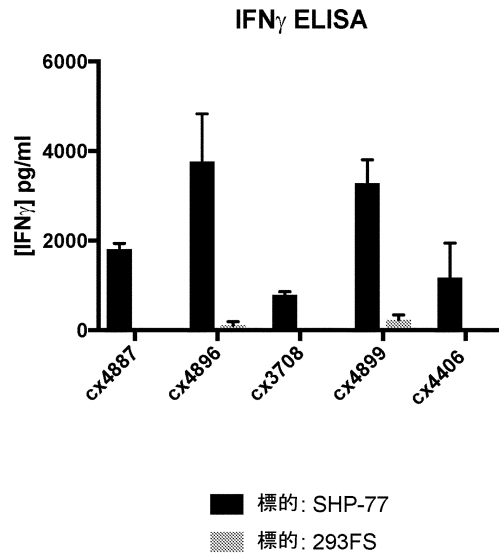
20

30

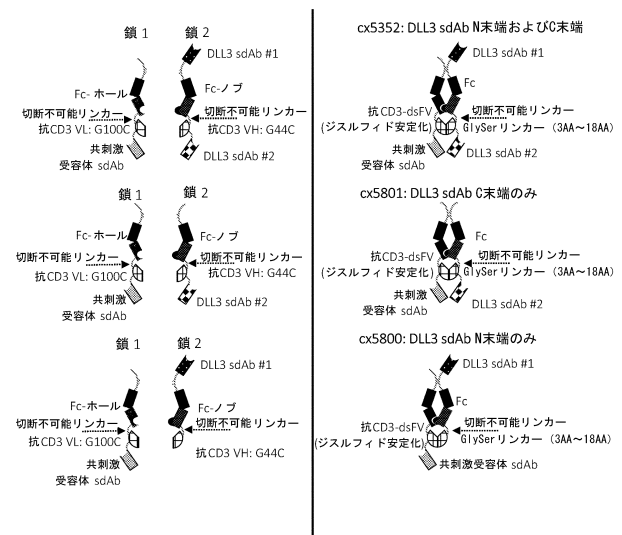
40

50

【図 28】

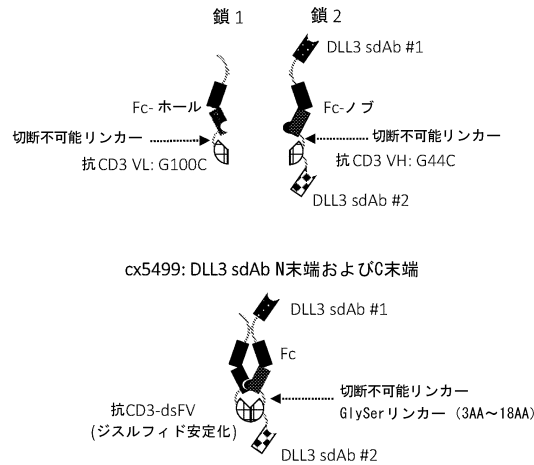


【図 29 A】

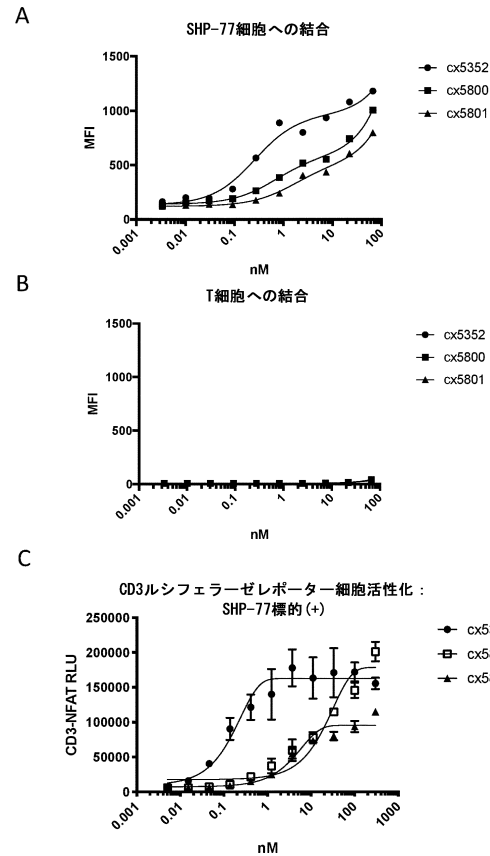


10

【図 29 B】



【図 30】



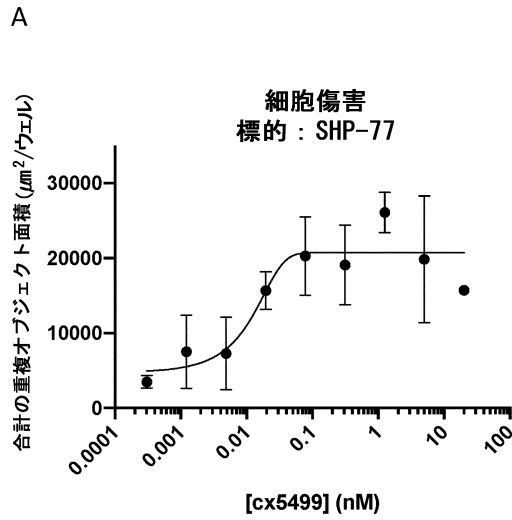
20

30

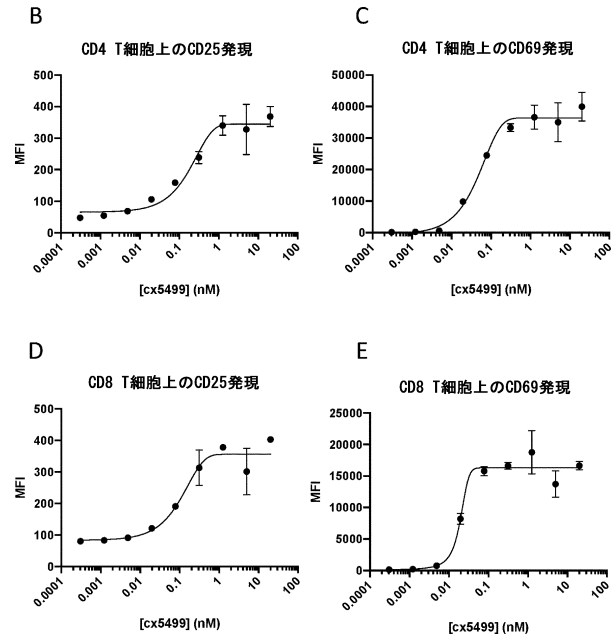
40

50

【図 3 1 - 1】

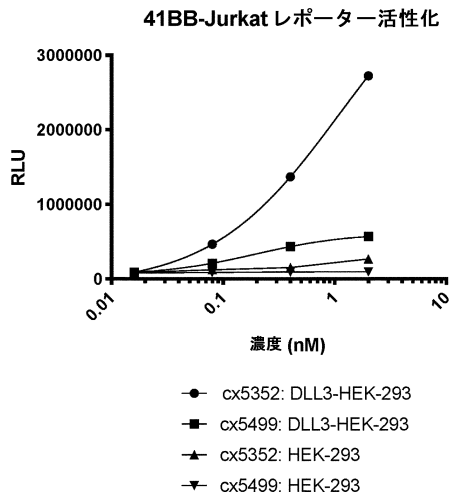


【図 3 1 - 2】

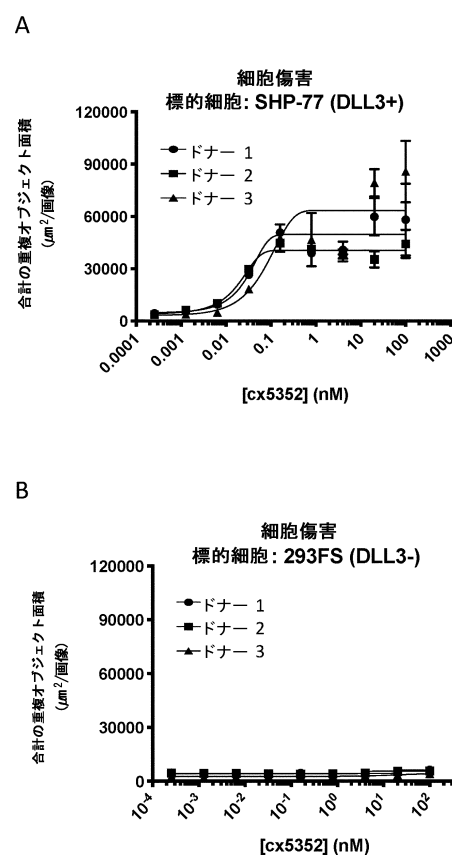


10

【図 3 2】



【図 3 3】

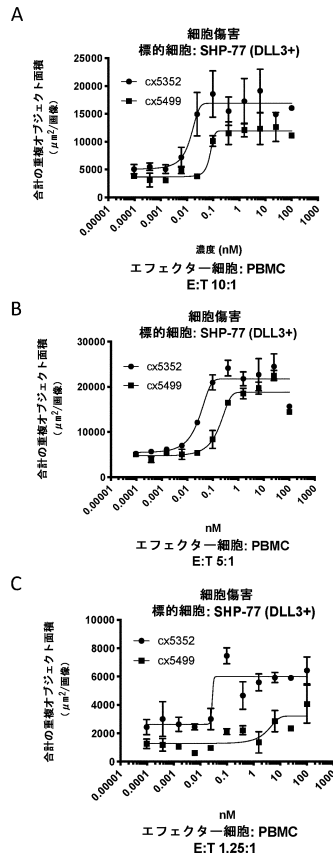


30

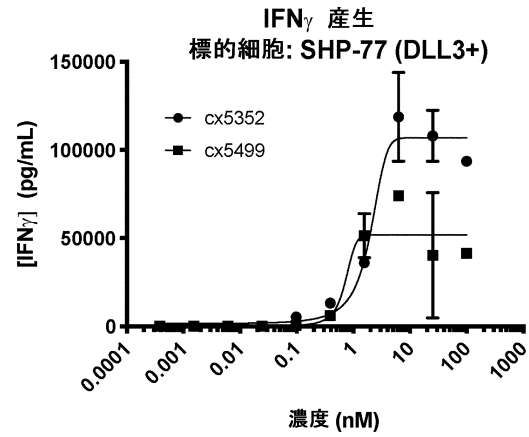
40

50

【図 3 4】



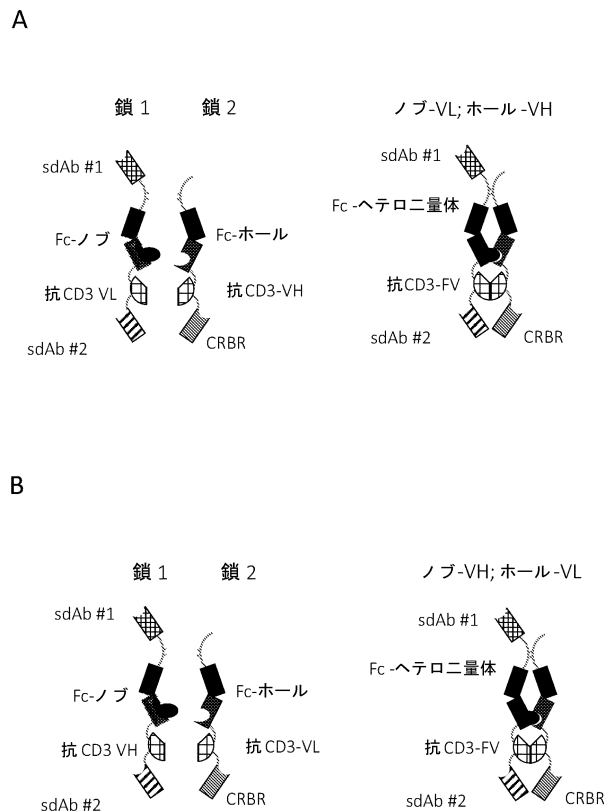
【図 3 5】



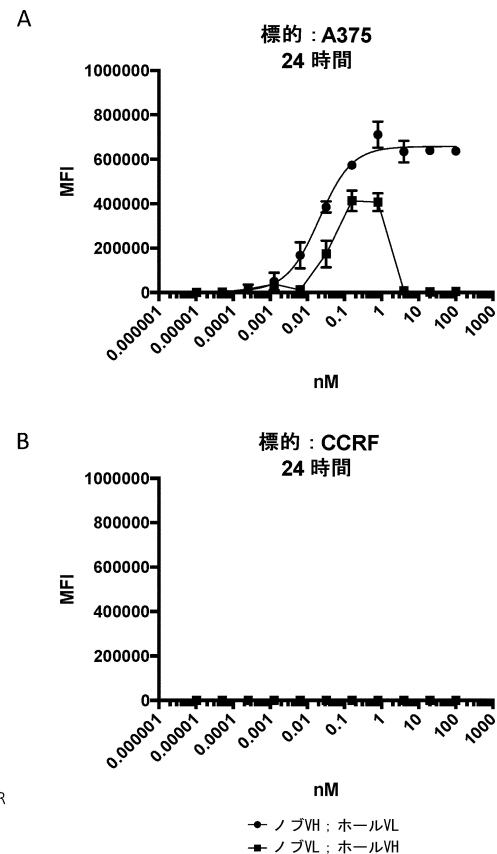
10

20

【図 3 6】



【図 3 7 - 1】



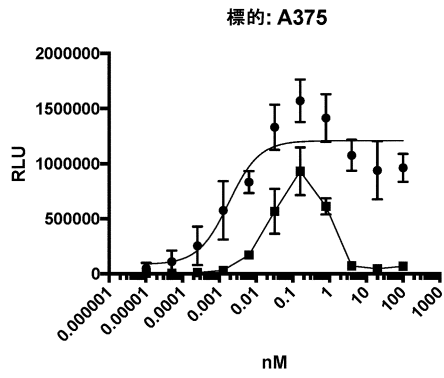
30

40

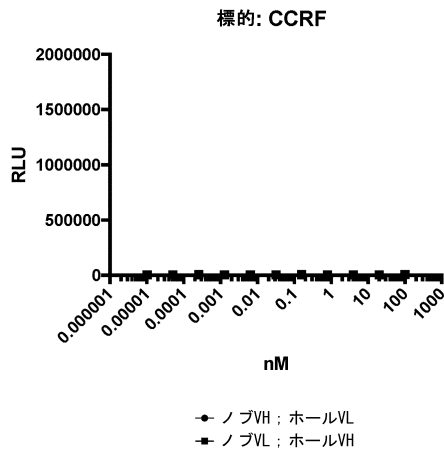
50

【 図 3 7 - 2 】

C

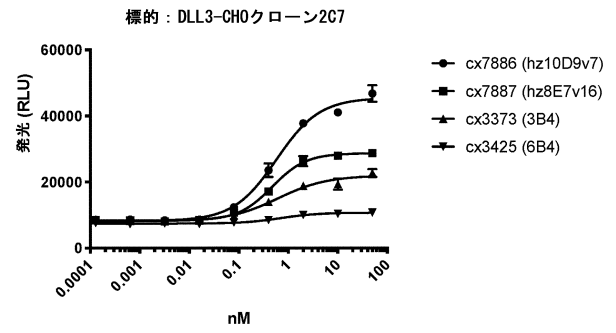


D



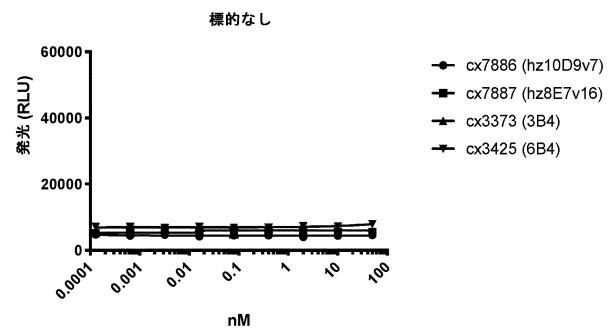
【 図 3 8 】

A



10

B



20

【 配列表 】

[0007611820000001.app](#)

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
		C 1 2 N	1/21	

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/877,815

(32)優先日 令和1年7月23日(2019.7.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 エッケルマン ブレンダン ピー .

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1
0 2 5 スイート 2 0 0 インヒブルクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 カプラン マイケル ディー .

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1
0 2 5 スイート 2 0 0 インヒブルクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 ウィリス ケイトリン エム .

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1
0 2 5 スイート 2 0 0 インヒブルクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 バンディット ラジャイ エイ .

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1
0 2 5 スイート 2 0 0 インヒブルクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 サナブリア アンジェリカ エヌ .

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1
0 2 5 スイート 2 0 0 インヒブルクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 バーンズ シドニー エイ .

- アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1
0 2 5 スイート 2 0 0 インヒブルクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ヘア マーガレット イー .
- アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1
0 2 5 スイート 2 0 0 インヒブルクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ティマー ジョーン シー .
- アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1
0 2 5 スイート 2 0 0 インヒブルクス インコーポレイテッド内
- 審査官 大西 隆史
- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 1 7 2 9 8 1 (W O , A 1)
特表 2 0 1 8 - 5 0 6 9 8 1 (J P , A)
特表 2 0 1 8 - 5 2 7 9 0 8 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 6 / 1 9 2 6 1 3 (W O , A 1)
特開 2 0 1 7 - 1 6 3 9 7 3 (J P , A)
特表 2 0 1 6 - 5 1 3 0 9 4 (J P , A)
宮崎 誠生, 産業応用を目指したアルカバ由来 V H H 抗体に関する研究, 鹿児島大学リポジ
トリ, 2015年06月01日, <https://ir.kagoshima-u.ac.jp/records/9025>
- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)
- C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0
A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 5 1 / 1 2
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)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)