

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2022-512684
(P2022-512684A)

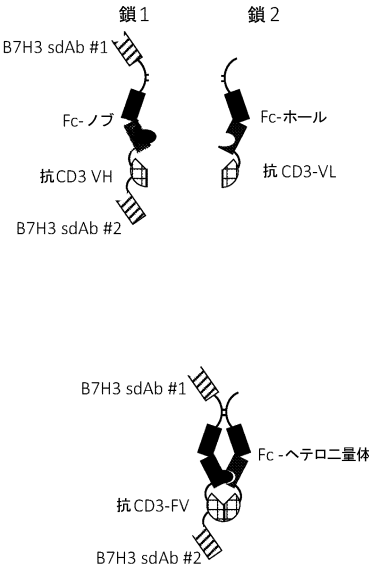
(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/86 (2006.01)	C 1 2 N	15/86	Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85	Z	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全267頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-520197(P2021-520197)	(71)出願人	514199744		
(86)(22)出願日	令和1年10月9日(2019.10.9)		インヒブルクス インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和3年6月8日(2021.6.8)		アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォル		
(86)国際出願番号	PCT/US2019/055427		ニア ラ ホーヤ ノース トーリー パイ		
(87)国際公開番号	WO2020/076970		ンズ ロード 1 1 0 2 5 スイート 2 0 0		
(87)国際公開日	令和2年4月16日(2020.4.16)	(74)代理人	100102978		
(31)優先権主張番号	62/744,640		弁理士 清水 初志		
(32)優先日	平成30年10月11日(2018.10.11)	(74)代理人	100102118		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 春名 雅夫		
(31)優先権主張番号	62/832,274	(74)代理人	100160923		
(32)優先日	平成31年4月10日(2019.4.10)		弁理士 山口 裕孝		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100119507		
(31)優先権主張番号	62/877,812		弁理士 刑部 俊		
		(74)代理人	100142929		
			弁理士 井上 隆一		
		最終頁に続く	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 B 7 H 3 シングルドメイン抗体およびその治療用組成物

(57)【要約】

B7H3に特異的に結合する結合ポリペプチドが、本明細書において提供される。より具体的には、B7H3に結合する、多価および/または多重特異性の構築物およびキメラ抗原受容体を含む融合タンパク質が、本明細書において提供される。また、これらのポリペプチド、該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を含有する薬学的組成物、ならびに、がんなどの疾患および状態を処置するための、提供されるB7H3結合ポリペプチドの使用法およびその使用も提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B7H3に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（B7H3 VHHドメイン）と、B7H3以外の標的に結合する1つまたは複数の追加の結合ドメインとを含む、B7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 2】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、

SEQ ID NO：115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、および145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）；

10

SEQ ID NO：146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、および167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：168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および483～488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、請求項1記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 3】

SEQ ID NO：115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、および145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）；

20

SEQ ID NO：146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、および167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：168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および483～488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）

を含む少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン（B7H3 VHHドメイン）

30

を含む、B7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 4】

前記B7H3がヒトB7H3である、請求項1～3のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 5】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインがヒト化されている、請求項1～4のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 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に結合する、請求項1、2、4、および5のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

40

【請求項 7】

前記免疫細胞がT細胞である、請求項6記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 8】

前記活性化受容体がCD3（CD3）である、請求項6または請求項7記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 9】

B7H3およびCD3に対して二重特異性である、請求項8記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 10】

前記免疫細胞がナチュラルキラー（NK）細胞である、請求項9記載のB7H3結合ポリペ

50

プチド構築物。

【請求項 1 1】

前記活性化受容体がCD16 (CD16a) である、請求項6または請求項10記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 1 2】

B7H3およびCD16aに対して二重特異性である、請求項11記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 1 3】

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に結合する、請求項1、2、4、および5のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

10

【請求項 1 4】

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、請求項1、2、および4～13のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 1 5】

前記1つまたは複数の追加の結合ドメインが一価である、請求項1、2、および4～14のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 1 6】

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、請求項14または請求項15記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

20

【請求項 1 7】

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に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13記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 1 8】

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、請求項17記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 1 9】

前記インターフェロンが、I型インターフェロン、II型インターフェロン、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、またはII型インターフェロンの切断型断片のバリエーションである、請求項18記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

30

【請求項 2 0】

前記インターフェロンが、IFN- γ もしくはIFN- γ 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、I型インターフェロン；あるいは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、II型インターフェロンから選択される、請求項19記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 2 1】

免疫グロブリンFc領域を含む、請求項1～20のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

40

【請求項 2 2】

前記少なくとも1つのB7H3 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、請求項1、2、および4～21のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 2 3】

二量体である、請求項1～22のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 2 4】

前記Fc領域がホモ二量体Fc領域である、請求項21～23のいずれか一項記載のB7H3結

50

合ポリペプチド構築物。

【請求項 25】

前記Fc領域が、SEQ ID NO：198、200、201、202、もしくは203のいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO：198、200、201、202、もしくは203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、請求項21～24のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 26】

前記Fc領域がヒトIgG1である、請求項21～24のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

10

【請求項 27】

前記Fc領域が、SEQ ID NO：198に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO：198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、請求項26記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 28】

前記Fc領域がヘテロ二量体Fc領域である、請求項21～23のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 29】

前記Fc領域がエフェクター機能を示す、請求項21～28のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

20

【請求項 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から選択されるエフェクター分子に対する結合を低減させる、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、請求項21～29のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 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、請求項30記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

30

【請求項 32】

前記Fc領域が、SEQ ID NO：199に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO：199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、請求項30または請求項31記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 33】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO：1、8～35、40、41、44、56～110、466、467、489、490、もしくは492～518のいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO：1、8～35、40、41、44、56～110、466、467、489、490、もしくは492～518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B7H3に結合する、請求項1～32のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

40

【請求項 34】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO：1に示される配列、(ii) SEQ ID NO：1のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO：1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B7H3に結合する、請求項1～33のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

50

【請求項 35】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、
 SEQ ID NO：115、116、117、118、119、120、および121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：146、147、148、149、150、および151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：168および169からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項1～34のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 36】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO：115、146、および168；それぞれSEQ ID NO：115、147、および168；それぞれSEQ ID NO：115、148、および168；それぞれSEQ ID NO：115、149、および168；それぞれSEQ ID NO：115、150、および168；それぞれSEQ ID NO：116、146、および168；それぞれSEQ ID NO：117、146、および168；それぞれSEQ ID NO：118、146、および168；それぞれSEQ ID NO：115、146、および169；それぞれSEQ ID NO：119、146、および168；それぞれSEQ ID NO：120、146、および168；それぞれSEQ ID NO：115、151、および168；それぞれSEQ ID NO：116、147、および168；それぞれSEQ ID NO：118、147、および168；それぞれSEQ ID NO：119、147、および168；それぞれSEQ ID NO：116、151、および168；それぞれSEQ ID NO：115、146、および168；それぞれSEQ ID NO：121、147、および168；それぞれSEQ ID NO：115、146、および168；それぞれSEQ ID NO：119、149、および168；またはそれぞれSEQ ID NO：122、151、および168に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項1～35のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 37】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO：8～34、467、489～490、および492～497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：8～34、467、489～490、および492～497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B7H3に結合する、請求項1～36のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 38】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO：8～34、467、489～490、および492～497のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項1～37記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 39】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO：35に示される配列、(ii) SEQ ID NO：35のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO：35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B7H3に結合する、請求項1～33のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項 40】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、
 SEQ ID NO：123に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；
 SEQ ID NO：152および153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：170および171からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項1～33および39のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド。

【請求項 41】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO: 123、152、および170；それぞれSEQ ID NO: 123、152、および171；それぞれSEQ ID NO: 123、153、および170；またはそれぞれSEQ ID NO: 123、153、および171に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項1～33、39、および40のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項42】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO: 40、41、もしくは498～503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: 40、41、もしくは498～503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B7H3に結合する、請求項1～33および39～41のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

10

【請求項43】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO: 40、41、または498～503のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項1～33および39～42記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項44】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 44に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 44のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 44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B7H3に結合する、請求項1～33のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

20

【請求項45】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO: 124、125、126、127、128、129、130、131、132、または133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: 154に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO: 172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、および183からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項1～33および44のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

30

【請求項46】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO: 124、154、および172；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および173；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および174；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および175；それぞれSEQ ID NO: 125、154、および173；それぞれSEQ ID NO: 126、154、および173；それぞれSEQ ID NO: 127、154、および173；それぞれSEQ ID NO: 128、154、および173；それぞれSEQ ID NO: 129、154、および173；それぞれSEQ ID NO: 130、154、および173；それぞれSEQ ID NO: 131、154、および173；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および176；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および177；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および178；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および179；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および180；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および181；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および182；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および183；それぞれSEQ ID NO: 126、154、および176；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および179；それぞれSEQ ID NO: 124、154、および182；それぞれSEQ ID NO: 132、154、および176；またはそれぞれSEQ ID NO: 133、154、および173に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項1～33、44、および45のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

40

【請求項47】

50

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 56 ~ 91、466、および504 ~ 514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 : 56 ~ 91、466、および504 ~ 514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B7H3に結合する、請求項1 ~ 33および44 ~ 46のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項48】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 56 ~ 91、466、および504 ~ 514のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項1 ~ 33および44 ~ 47記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

10

【請求項49】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO : 105に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 105のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 105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B7H3に結合する、請求項1 ~ 33のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項50】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、
SEQ ID NO : 145に示されるアミノ酸配列を含むCDR1 ;
SEQ ID NO : 167に示されるアミノ酸配列を含むCDR2 ; ならびに
SEQ ID NO : 488に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、請求項1 ~ 33および49のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

20

【請求項51】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 106 ~ 109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 : 106 ~ 109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B7H3に結合する、請求項1 ~ 33、49、および50のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

30

【請求項52】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 106 ~ 109のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項1 ~ 33および49 ~ 51記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項53】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO : 110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 : 110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B7H3に結合する、請求項1 ~ 33のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

40

【請求項54】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、
SEQ ID NO : 139に示されるアミノ酸配列を含むCDR1 ;
SEQ ID NO : 161に示されるアミノ酸配列を含むCDR2 ; ならびに
SEQ ID NO : 189に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、請求項1 ~ 33および53のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド。

【請求項55】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 515 ~ 518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 : 515 ~ 518のいずれか1つに対して少

50

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B7H3に結合する、請求項1～33、53、および54のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項56】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO: 515～518のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項1～33および53～55記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

【請求項57】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104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B7H3に結合する、請求項1～33のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

10

【請求項58】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO: 134、155、および184；それぞれSEQ ID NO: 135、156、および168；それぞれSEQ ID NO: 136、157、および185；それぞれSEQ ID NO: 137、158、および186；それぞれSEQ ID NO: 138、159、および187；それぞれSEQ ID NO: 138、160、および188；それぞれSEQ ID NO: 139、161、および189；それぞれSEQ ID NO: 140、162、および483；それぞれSEQ ID NO: 141、163、および484；それぞれSEQ ID NO: 139、161、および189；それぞれSEQ ID NO: 142、164、および485；それぞれSEQ ID NO: 143、165、および486；それぞれSEQ ID NO: 144、166、および487に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項1～33および57のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

20

【請求項59】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、または104に示される、請求項1～33、57、および58のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

30

【請求項60】

(a) 第1のFcポリペプチドと第2のFcポリペプチドとを含むヘテロ二量体Fc領域を含む、第1の構成要素、および(b) 可変重鎖領域(VH)と可変軽鎖領域(VL)とを含む抗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、ヘテロ二量体Fc領域が、抗CD3抗体のN末端に位置づけられ；かつ

40

第1および第2の構成要素の一方または両方が、B7H3に特異的に結合するシングルドメイン抗体を含む少なくとも1つの抗原結合ドメイン(B7H3 VHHドメイン)を含む、前記多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項61】

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のポリペプチド中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

50

を含み、

第1および第2のポリペプチドの一方または両方が、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインを含む、

請求項60記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項62】

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: 198に示されるFcポリペプチドまたはその免疫学的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60または請求項61記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【請求項63】

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、請求項62記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項64】

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、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63記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項65】

前記アミノ酸改変がノブイントゥホール改変である、請求項64記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【請求項66】

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から選択される改変を含み、かつ前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、改変Thr366Trpを含む、請求項60～65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67】

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、かつ該第2のFcポリペプチドの改変が、位置Ser354およびTyr349のうちのもう一方にある、請求項66記載の多重特異性ポリペプチド。

30

【請求項68】

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、請求項62～64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69】

前記第1および/もしくは前記第2のFcポリペプチド、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、請求項60～64および68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70】

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の一方が、残基Ile253に改変をさらに含む、請求項60～69のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【請求項71】

前記改変がIle253Argである、請求項70記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項72】

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の一方が、残基His435に改変をさらに含む、請求項60～71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73】

50

前記改変がHis435Argである、請求項72記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項74】

前記Fc領域が、Lys447を欠如しているポリペプチドを含む、請求項60～73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75】

前記Fc領域が、FcRn結合を増強する少なくとも1つの改変を含むポリペプチドを含む、請求項60～74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76】

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1つまたは複数の位置にある、請求項75記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【請求項77】

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、請求項76記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項78】

前記改変が、位置Met252および位置Met428にある、請求項75または請求項76記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項79】

前記改変が、Met252YおよびMet428Lである、請求項78記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【請求項80】

前記改変が、Met252YおよびMet428Vである、請求項78記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項81】

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: 293、297、305、または307のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつ前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 294、298、301、303、309、または311のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項60～80のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

【請求項82】

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から選択されるエフェクター分子に対する結合を低減させる、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、請求項21～81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83】

前記少なくとも1つのアミノ酸改変が、Glu233、Leu234、またはLeu235のうちの1つまたは複数の欠失である、請求項82記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項84】

40

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: 295、299、306、または308のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつ前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 296、300、302、304、310、または312のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項60～83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85】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が一価である、請求項60～84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86】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、一本鎖抗体ではなく、任意で、一本鎖可変断片

50

(scFv)ではない、請求項60～85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87】

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60～86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88】

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87記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項89】

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: 219)を含むVH CDR1 ;
アミノ酸配列
RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 220)

10

を含むVH CDR2 ;
アミノ酸配列
HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 221)

を含むVH CDR3、
アミノ酸配列
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 222)

20

を含むVL CDR1 ;
アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 223)を含むVL CDR2 ; および
アミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 224)を含むVL CDR3
を含む、請求項60～88記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項90】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、
SEQ ID NO: 225～255、480、460、もしくは462のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 225～255、460、もしくは462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し、かつCD3に結合するVH ; および
SEQ ID NO: 256～274、417、459、もしくは461のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 256～274、417、459、もしくは461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し、かつCD3に結合するVL
を含む、請求項60～89のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

【請求項91】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、SEQ ID NO: 237のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 265のアミノ酸配列を含む、請求項60～90のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【請求項92】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、SEQ ID NO: 237のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 417のアミノ酸配列を含む、請求項60～90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93】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、SEQ ID NO: 460のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 461のアミノ酸配列を含む、請求項60～90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94】

50

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、SEQ ID NO : 480のアミノ酸配列およびSEQ ID NO : 459のアミノ酸配列を含む、請求項60～90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95】

前記少なくとも1つのB7H3シングルドメイン抗体が、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、かつ/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づけられた、請求項60～94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96】

B7H3に特異的に結合する第1のB7H3 VHHドメインと、B7H3に特異的に結合する第2のB7H3 VHHドメインとを含む、請求項60～95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97】

前記第1または前記第2のB7H3 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づけられ、かつ該第1または該第2のB7H3 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づけられた、請求項96記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項98】

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、B7H3に結合する第1のB7H3 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B7H3に結合する第2のB7H3 VHHドメインを含み；かつ

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の構成要素中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、

請求項96または請求項97記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項99】

前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインが同じである、請求項96～98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100】

前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインが異なっている、請求項96～98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101】

前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインが、B7H3の別個のもしくは重複しないエピトープに結合し、かつ/またはB7H3に対する結合について競合しない、請求項100記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項102】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 1、8～35、40、41、44、56～110、466、467、489、490、もしくは492～518のいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO : 1、8～35、40、41、44、56～110、466、467、489、490、もしくは492～518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B7H3に結合する、請求項60～101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103】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO : 1に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 1のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 1に対して少なくとも85%、8

6 %、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B7H3に結合する、請求項60～102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104】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO : 115、116、117、118、119、120、および121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 : 146、147、148、149、150、および151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 : 168および169からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項60～103のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【請求項105】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO : 115、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、148、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、149、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、150、および168；それぞれSEQ ID NO : 116、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 117、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 118、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、146、および169；それぞれSEQ ID NO : 119、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 120、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、151、および168；それぞれSEQ ID NO : 116、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 118、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 119、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 116、151、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 121、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 119、149、および168；またはそれぞれSEQ ID NO : 122、151、および168に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項60～104のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【請求項106】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 8～34、467、489～490、および492～497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 : 8～34、467、489～490、および492～497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B7H3に結合する、請求項60～105のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

【請求項107】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 8～34、467、489～490、および492～497のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項60～106のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【請求項108】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO : 35に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 35のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 35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B7H3に結合する、請求項60～102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109】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VH

50

Hドメインの各々が、独立して、
 SEQ ID NO : 123に示されるアミノ酸配列を含むCDR1 ;
 SEQ ID NO : 152および153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 : 170および171からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3
 を含む、請求項60～102および108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110】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VH
 Hドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO : 123、152、および170 ; それ
 ぞれSEQ ID NO : 123、152、および171 ; それぞれSEQ ID NO : 123、153、およ
 び170 ; またはそれぞれSEQ ID NO : 123、153、および171に示されるCDR1、CDR
 2、およびCDR3を含む、請求項60～102、108、および109のいずれか一項記載の多
 重特異性ポリペプチド構築物。 10

【請求項111】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VH
 Hドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 40、41、もしくは498～503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 : 40、41、もしくは498～503
 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B7H3に結合する、請求項60～102および108～110のい
 ずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 20

【請求項112】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VH
 Hドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 40、41、または498～503のいずれか
 1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項60～102および108～111記載の多重特
 異性ポリペプチド構築物。

【請求項113】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VH
 Hドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO : 44に示される配列、(ii) SEQ ID
 NO : 44のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 44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B7H3に結合
 する、請求項60～102のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 30

【請求項114】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VH
 Hドメインの各々が、独立して、
 SEQ ID NO : 124、125、126、127、128、129、130、131、132、または133
 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 : 154に示されるアミノ酸配列を含むCDR2 ; ならびに 40
 SEQ ID NO : 172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182
 、および183からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3
 を含む、請求項60～102および113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115】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VH
 Hドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および172 ; それ
 ぞれSEQ ID NO : 124、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、およ
 び174 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および175 ; それぞれSEQ ID NO : 125
 、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 126、154、および173 ; それぞれSEQ 50

ID NO : 127、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 128、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 129、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 130、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 131、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および176 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および177 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および178 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および179 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および180 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および181 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および182 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および183 ; それぞれSEQ ID NO : 126、154、および176 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および179 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および182 ; それぞれSEQ ID NO : 132、154、および176 ; またはそれぞれSEQ ID NO : 133、154、および173に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項60～102、113、および114のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【請求項116】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 56～91、466、および504～514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 : 56～91、466、および504～514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B7H3に結合する、請求項60～102および113～115のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【請求項117】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 56～91、466、および504～514のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項60～102および113～116記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項118】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO : 105に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 105のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 105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B7H3に結合する、請求項60～102のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

【請求項119】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO : 145に示されるアミノ酸配列を含むCDR1 ;

SEQ ID NO : 167に示されるアミノ酸配列を含むCDR2 ; および

SEQ ID NO : 488に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項60～102および118のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【請求項120】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 106～109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 : 106～109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B7H3に結合する、請求項60～102、118、および119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121】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHH

50

Hドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 106 ~ 109のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項60 ~ 102および118 ~ 120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122】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO : 110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 : 110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B7H3に結合する、請求項60 ~ 102のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【請求項123】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、
SEQ ID NO : 139に示されるアミノ酸配列を含むCDR1 ;
SEQ ID NO : 161に示されるアミノ酸配列を含むCDR2 ; および
SEQ ID NO : 189に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、請求項60 ~ 102および122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124】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 515 ~ 518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 : 515 ~ 518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B7H3に結合する、請求項60 ~ 102、122、および123のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【請求項125】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 515 ~ 518のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項60 ~ 102および122 ~ 124のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

【請求項126】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104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B7H3に結合する、請求項60 ~ 102のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【請求項127】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO : 134、155、および184 ; それぞれSEQ ID NO : 135、156、および168 ; それぞれSEQ ID NO : 136、157、および185 ; それぞれSEQ ID NO : 137、158、および186 ; それぞれSEQ ID NO : 138、159、および187 ; それぞれSEQ ID NO : 138、160、および188 ; それぞれSEQ ID NO : 139、161、および189 ; それぞれSEQ ID NO : 140、162、および483 ; それぞれSEQ ID NO : 141、163、および484 ; それぞれSEQ ID NO : 139、161、および189 ; それぞれSEQ ID NO : 142、164、および485 ; それぞれSEQ ID NO :

50

143、165、および486；それぞれSEQ ID NO：144、166、および487に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項60～102および126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128】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO：92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、または104に示される、請求項60～102、126、および127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129】

前記第1および前記第2の構成要素の一方または両方が、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）を含む、請求項60～128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130】

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、かつ/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づけられた、請求項129記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項131】

共刺激受容体結合領域（CRBR）を1つだけ含む、請求項129または請求項130記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項132】

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、B7H3に結合する第1のB7H3 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B7H3に結合する第2のB7H3 VHHドメインを含み；かつ

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、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の構成要素中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、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づけられた、請求項129～131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133】

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にする結合活性を示すそのバリエーションである、またはそれを含む、請求項129～132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134】

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、請求項129～132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135】

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（sdAb）、VNAR、またはVHHである、請求項134記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項136】

前記抗体または抗原結合断片がsdAbである、請求項134または請求項135記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項137】

前記sdAbが、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、請求項136記載の多重特異性ポリペ

10

20

30

40

50

プチド構築物。

【請求項 138】

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NKG2Dの中から選択される共刺激受容体に結合する、請求項129～137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 139】

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) のの中から選択される共刺激受容体に結合する、請求項129～138のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 10

【請求項 140】

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: 400に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 400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に結合する、請求項129～139のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 20

【請求項 141】

前記第1および前記第2の構成要素の一方または両方が、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、請求項60～140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 142】

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、かつ/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づけられた、請求項141記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 143】

抑制性受容体結合領域 (IRBR) を1つだけ含む、請求項141または請求項142記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 30

【請求項 144】

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、B7H3に結合する第1のB7H3 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B7H3に結合する第2のB7H3 VHHドメインを含み；かつ

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の構成要素中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、 40

該IRBRが、該第2の構成要素の該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づけられた、請求項141～143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 145】

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に対する結合活性を示すそのバリエーション

である、またはそれを含む、請求項141～144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 146】

50

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、請求項141～144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147】

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(sdAb)、VNAR、またはVHHである、請求項146記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項148】

前記抗体または抗原結合断片がsdAbである、請求項146または請求項147記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項149】

前記sdAbが、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、請求項146～148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150】

前記少なくとも1つのIRBRが、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、およびTIM3の中から選択される抑制性受容体に結合する、請求項141～149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151】

前記少なくとも1つのIRBRが、PD-1に結合する、請求項141～149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152】

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、B7H3に結合する第1のB7H3 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B7H3に結合する第2のB7H3 VHHドメインを含み；かつ

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の一方、前記ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、前記リンカー、任意で、前記第1の構成要素中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、請求項141～151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153】

前記リンカーが、ペプチドリinkerまたはポリペプチドリinker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アミノ酸の長さである、請求項60～152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154】

前記リンカーが、切断不可能なリンカーである、請求項60～153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155】

前記切断不可能なリンカーが、GS, GGS, GGGGS (SEQ ID NO:315), GGGGS (SEQ ID NO:316)

およびそれらの組み合わせを含む、請求項153記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項156】

前記リンカーが、配列GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:317)

である、またはそれを含む、請求項60～155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157】

前記リンカーが、切断可能なリンカーである、請求項60～153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158】

前記切断可能なリンカーが、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、請求項157記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項159】

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中に存在する細胞によって産生される、請求項158記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項160】

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、請求項158または請求項159記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項161】

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から選択される、請求項158～160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162】

前記プロテアーゼがグランザイムBである、請求項161記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項163】

前記切断可能なリンカーが、アミノ酸配列
GGSGGGGIEPDI GGSGGS (SEQ ID NO:361)

を含む、請求項158～162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164】

SEQ ID NO：115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、および145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：146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、および167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：168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および483～488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、B7H3に結合する単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項165】

SEQ ID NO：1、8～35、40、41、44、56～110、466、467、489、490、もしくは492～518のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO：1、8～35、40、41、44、56～110、466、467、489、490、もしくは492～518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B7H3に結合する、請求項164記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項166】

前記シングルドメイン抗体が、(i) SEQ ID NO：1に示される配列、(ii) SEQ ID NO：1のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO：1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B7H3に結合する、請求項164または請求項165記載の単離されたシングルドメイン抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 167】

前記sdAbが、

SEQ ID NO : 115、116、117、118、119、120、および121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 : 146、147、148、149、150、および151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 : 168および169からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項164～166のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 168】

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO : 115、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、148、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、149、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、150、および168；それぞれSEQ ID NO : 116、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 117、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 118、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、146、および169；それぞれSEQ ID NO : 119、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 120、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、151、および168；それぞれSEQ ID NO : 116、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 118、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 119、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 116、151、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 121、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 119、149、および168；またはそれぞれSEQ ID NO : 122、151、および168に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項164～167のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 169】

前記sdAbが、SEQ ID NO : 8～34、467、489～490、および492～497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 : 8～34、467、489～490、および492～497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B7H3に結合する、請求項164～168のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 170】

前記sdAbが、SEQ ID NO : 8～34、467、489～490、および492～497のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項164～169のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 171】

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO : 35に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 35のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 35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B7H3に結合する、請求項164または請求項165記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 172】

前記sdAbが、

SEQ ID NO : 123に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；

SEQ ID NO : 152および153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 : 170および171からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項164、165、および171のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 173】

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO : 123、152、および170；それぞれSEQ ID NO

10

20

30

40

50

：123、152、および171；それぞれSEQ ID NO：123、153、および170；またはそれぞれSEQ ID NO：123、153、および171に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項164、165、171、および172のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項174】

前記sdAbが、SEQ ID NO：40、41、または498～503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：40、41、または498～503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B7H3に結合する、請求項164、165、および171～173のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

10

【請求項175】

前記sdAbが、SEQ ID NO：40、41、または498～503のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項164、165、および171～174のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項176】

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO：44に示される配列、(ii) SEQ ID NO：44のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO：44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B7H3に結合する、請求項164または請求項165記載の単離されたシングルドメイン抗体。

20

【請求項177】

前記sdAbが、SEQ ID NO：124、125、126、127、128、129、130、131、132、または133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：154に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびにSEQ ID NO：172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、および183からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項164、請求項165、または請求項176記載の単離されたシングルドメイン抗体。

30

【請求項178】

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO：124、154、および172；それぞれSEQ ID NO：124、154、および173；それぞれSEQ ID NO：124、154、および174；それぞれSEQ ID NO：124、154、および175；それぞれSEQ ID NO：125、154、および173；それぞれSEQ ID NO：126、154、および173；それぞれSEQ ID NO：127、154、および173；それぞれSEQ ID NO：128、154、および173；それぞれSEQ ID NO：129、154、および173；それぞれSEQ ID NO：130、154、および173；それぞれSEQ ID NO：131、154、および173；それぞれSEQ ID NO：124、154、および176；それぞれSEQ ID NO：124、154、および177；それぞれSEQ ID NO：124、154、および178；それぞれSEQ ID NO：124、154、および179；それぞれSEQ ID NO：124、154、および180；それぞれSEQ ID NO：124、154、および181；それぞれSEQ ID NO：124、154、および182；それぞれSEQ ID NO：124、154、および183；それぞれSEQ ID NO：126、154、および176；それぞれSEQ ID NO：124、154、および179；それぞれSEQ ID NO：124、154、および182；それぞれSEQ ID NO：132、154、および176；またはそれぞれSEQ ID NO：133、154、および173に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項164、165、176、および177のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

40

【請求項179】

前記sdAbが、SEQ ID NO：56～91、466、および504～514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：56～91、466、および504～514のいずれか

50

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B7H3に結合する、請求項164、165、および176～178のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項180】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO：56～91、466、および504～514のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項164、165、および176～179のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項181】

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO：105に示される配列、(ii) SEQ ID NO：105のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO：105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B7H3に結合する、請求項164または請求項165記載の単離されたシングルドメイン抗体。

10

【請求項182】

前記sdAbが、

SEQ ID NO：145に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；

SEQ ID NO：167に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；および

SEQ ID NO：488に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項164、165、または181記載の単離されたシングルドメイン抗体。

20

【請求項183】

前記sdAbが、SEQ ID NO：106～109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：106～109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B7H3に結合する、請求項164、165、181、および182のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項184】

前記sdAbが、SEQ ID NO：106～109のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項164、165、および181～183のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

30

【請求項185】

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO：110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：110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B7H3に結合する、請求項164または請求項165記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項186】

前記sdAbが、

SEQ ID NO：139に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；

SEQ ID NO：161に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；および

SEQ ID NO：189に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項164、165、および185のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

40

【請求項187】

前記sdAbが、SEQ ID NO：515～518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：515～518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B7H3に結合する、請求項164、165、185、および186のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項188】

50

前記sdAbが、SEQ ID NO : 515 ~ 518のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項164、165、および185 ~ 187のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項189】

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104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B7H3に結合する、請求項164または請求項165記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項190】

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO : 134、155、および184 ; それぞれSEQ ID NO : 135、156、および168 ; それぞれSEQ ID NO : 136、157、および185 ; それぞれSEQ ID NO : 137、158、および186 ; それぞれSEQ ID NO : 138、159、および187 ; それぞれSEQ ID NO : 138、160、および188 ; それぞれSEQ ID NO : 139、161、および189 ; それぞれSEQ ID NO : 140、162、および483 ; それぞれSEQ ID NO : 141、163、および484 ; それぞれSEQ ID NO : 139、161、および189 ; それぞれSEQ ID NO : 142、164、および485 ; それぞれSEQ ID NO : 143、165、および486 ; それぞれSEQ ID NO : 144、166、および487に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項164、165、および189のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項191】

請求項1 ~ 59のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項192】

請求項60 ~ 163のいずれか一項記載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。

【請求項193】

請求項60 ~ 163のいずれか一項記載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の核酸配列とを含むポリヌクレオチドであって、
該第1の核酸配列と該第2の核酸配列とが、配列内リボソーム進入部位(IRES)、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。

【請求項194】

前記第1の核酸配列および前記第2の核酸配列が、同じプロモーターに機能的に連結されている、請求項193記載のポリヌクレオチド。

【請求項195】

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から選択される、請求項194記載のポリヌクレオチド。

【請求項196】

請求項164 ~ 190のいずれか一項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197】

請求項191 ~ 196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198】

10

20

30

40

50

発現ベクターである、請求項197記載のベクター。

【請求項199】

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類ベクターである、請求項197または請求項198記載のベクター。

【請求項200】

請求項191～196のいずれか一項記載の1つもしくは複数のポリヌクレオチド、または請求項197～199のいずれか一項記載の1つもしくは複数のベクターを含む、細胞。

【請求項201】

組換えであるかまたは単離されている、請求項200記載の細胞。

【請求項202】

哺乳類細胞である、請求項201記載の細胞。

【請求項203】

ポリペプチドを産生する方法であって、

請求項191～196のいずれか一項記載の1つもしくは複数のポリヌクレオチド、または請求項197～199のいずれか一項記載の1つもしくは複数のベクターを細胞中に導入する工程、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、前記方法。

【請求項204】

前記ポリペプチドを前記細胞から単離する工程または精製する工程をさらに含む、請求項203記載の方法。 20

【請求項205】

請求項203または請求項204記載の方法によって産生される、ポリペプチド。

【請求項206】

請求項164～190のいずれか一項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207】

前記細胞が、リンパ球である、請求項206記載の操作された免疫細胞。 30

【請求項208】

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、請求項206または請求項207記載の操作された免疫細胞。

【請求項209】

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、請求項206～208のいずれか一項記載の操作された免疫細胞。

【請求項210】

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、またはそれを含む、請求項206～209のいずれか一項記載の操作された免疫細胞。 40

【請求項211】

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、請求項209または請求項210記載の操作された免疫細胞。

【請求項212】

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、請求項211記載の操作された免疫細胞。

【請求項213】

請求項1～59のいずれか一項記載のB7H3結合ポリペプチド、請求項60～163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164～190のいずれか一項記載のシングルドメイン抗体、または請求項206～212のいずれか一項記載の操作された免疫 50

細胞を含む、薬学的組成物。

【請求項 2 1 4】

薬学的に許容される担体を含む、請求項 2 1 3 記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1 5】

無菌である、請求項 2 1 3 または請求項 2 1 4 記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1 6】

対象において免疫応答を刺激するかまたは誘導する方法であって、

その必要がある対象に、請求項 1 ~ 5 9 のいずれか一項記載の B 7 H 3 結合ポリペプチド、請求項 6 0 ~ 1 6 3 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 1 6 4 ~ 1 9 0 のいずれか一項記載のシングルドメイン抗体、または請求項 2 0 6 ~ 2 1 2 のいずれか一項記載の操作された免疫細胞、または請求項 2 1 3 ~ 2 1 5 記載の薬学的組成物を投与する工程を含む、前記方法。

10

【請求項 2 1 7】

前記免疫応答が、腫瘍またはがんに対して、任意で、B 7 H 3 を発現する腫瘍またはがんに対して、増加する、請求項 2 1 6 記載の方法。

【請求項 2 1 8】

前記対象において疾患または状態を処置する、請求項 2 1 6 または請求項 2 1 7 記載の方法。

【請求項 2 1 9】

対象において疾患または状態を処置する方法であって、

その必要がある対象に、治療的有効量の、請求項 1 ~ 5 9 のいずれか一項記載の B 7 H 3 結合ポリペプチド、請求項 6 0 ~ 1 6 3 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 1 6 4 ~ 1 9 0 のいずれか一項記載のシングルドメイン抗体、もしくは請求項 2 0 6 ~ 2 1 2 のいずれか一項記載の操作された免疫細胞、または請求項 2 1 3 ~ 2 1 5 記載の薬学的組成物を投与する工程を含む、前記方法。

20

【請求項 2 2 0】

前記疾患または状態が、腫瘍またはがんである、請求項 2 1 8 または請求項 2 1 9 記載の方法。

【請求項 2 2 1】

前記対象がヒトである、請求項 2 1 6 ~ 2 2 0 のいずれか一項記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、「B 7 H 3 SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND THERAPEUTIC COMPOSITIONS THEREOF」という名称の 2 0 1 8 年 1 0 月 1 1 日付で出願された米国特許仮出願第 6 2 / 7 4 4 , 6 4 0 号；「B 7 H 3 SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND THERAPEUTIC COMPOSITIONS THEREOF」という名称の 2 0 1 9 年 4 月 1 0 日付で出願された米国特許仮出願第 6 2 / 8 3 2 , 2 7 4 号；および「B 7 H 3 SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND THERAPEUTIC COMPOSITIONS THEREOF」という名称の 2 0 1 9 年 7 月 2 3 日付で出願された米国特許仮出願第 6 2 / 8 7 7 , 8 1 2 号に対する優先権を主張し、それらの内容は、すべての目的でその全体が参照により組み入れられる。

40

【0 0 0 2】

配列表の参照による組み入れ

本出願は、電子形式の配列表と共に提出されている。配列表は、2 0 1 9 年 1 0 月 8 日付で作成された、7 4 4 9 5 2 0 0 0 4 4 0 SeqList.TXT という名称のファイルとして提供されており、これはサイズが 4 7 1 キロバイトである。配列表の電子形式の情報は、その全体が参照により組み入れられる。

【0 0 0 3】

分野

50

本開示は、概して、B7H3に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、少なくともB7H3に結合する、多価および/または多重特異性の構築物およびキメラ抗原受容体を含む、融合タンパク質に関する。本開示はまた、これらの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、がんなどの疾患および状態を処置するための、提供されるB7H3結合ポリペプチドの使用法およびその使用も提供する。

【背景技術】

【0004】

背景

B7H3は、免疫細胞調節分子のB7ファミリーのメンバーである。これは、多種多様の腫瘍細胞および腫瘍血管系の表面上に発現し、その発現は、多様ながんにおける不良な予後に関連している。固形腫瘍を含む、ヒトにおける多様ながん上でのB7H3の発現により、B7H3は、望ましい治療標的になる。B7H3を標的とする改善された治療用分子および治療剤が、必要とされる。そのような必要を満たす態様が、本明細書において提供される。

【発明の概要】

【0005】

概要

B7H3に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（B7H3 VHHドメイン）を含むB7H3結合ポリペプチド構築物が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、B7H3結合ポリペプチド構築物は、B7H3以外の標的に結合する1つまたは複数の追加の結合ドメインをさらに含む。

【0006】

SEQ ID NO：115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、および145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：146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、および167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：168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および483～488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）を含む少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン（B7H3 VHHドメイン）を含むB7H3結合構築物が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、B7H3結合ポリペプチド構築物は、B7H3以外の標的に結合する1つまたは複数の追加の結合ドメインをさらに含む。

【0007】

いくつかの態様において、B7H3結合ポリペプチド構築物は二量体である。

【0008】

いくつかの態様において、B7H3は、SEQ ID NO：190に示される配列、またはシグナル配列を欠如しているその成熟型を有する。いくつかの態様において、B7H3はヒトB7H3である。

【0009】

いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 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、B7H3 VHHはラクダ科VHHである。いくつかの態様において、B7H3 VHHは、ラクダ科VHHのヒト化型である。

【0010】

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、免疫細胞上の活性化受容体に結合する。いくつかの態様において、免疫細胞はT細胞である。いくつかの態様において、活性化受容体はCD3（CD3）である。いくつかの態様において、結合ポリペプチド構築物は、B7H3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

10

20

30

40

50

いて、免疫細胞はナチュラルキラー（NK）細胞である。いくつかの態様において、活性化受容体はCD16（CD16a）である。いくつかの態様において、B7H3結合ポリペプチド構築物は、B7H3およびCD16aに対して二重特異性である。

【0011】

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、サイトカイン受容体に結合する。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に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。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ーションである。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、II型インターフェロン、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、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。いくつかの態様において、インターフェロンは、IFN- α 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I型インターフェロン、または、IFN- γ 、またはその切断型断片もしくはバリエーションであるII型インターフェロンから選択される。

10

【0012】

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、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一価である。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。

20

【0013】

提供される態様のいずれかのうち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、B7H3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。

【0014】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、Fc領域は、SEQ ID NO：198、200、201、202、もしくは203のいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO：198、200、201、202、もしくは203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。

30

【0015】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、B7H3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。

【0016】

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

【0017】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、Fc領域は、SEQ ID NO：198に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO：198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。

40

【0018】

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から選択されるエフェクター分子に対する結合を低減させる、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、

50

【 0 0 1 9 】

【 0 0 2 0 】

【 0 0 2 1 】

【 0 0 2 2 】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、少なくとも1つのB7H3ドメインは、(i) SEQ ID NO: 1に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 1のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 1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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 115、116、117、118、119、120、および121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: 146、147、148、149、150、および151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: 168および169からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、146、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、147、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、148、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、149、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、150、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 116、146、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 117、146、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 118、146、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、146、および169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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 119、146、および168に示

も1つのB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 119、146、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 120、146、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、151、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 116、147、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 118、147、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 119、147、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、146、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 121、147、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、146、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 119、149、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 122、151、および168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B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 2~34および467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: 2~34および467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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 2~34および467のいずれか1つ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、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 8~34、467、489~490、および492~497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: 8~34、467、489~490、および492~497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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 8~34、467、489~490、および492~497のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。

10

20

30

40

50

【0023】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO: 35に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 35のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 35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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 123に示されるアミノ酸配列を含むCDR1; SEQ ID NO: 152および153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: 170および171からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 123、152、および170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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 123、152、および171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B7H3 VHHドメイ

ンは、それぞれSEQ ID NO : 123、153、および170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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 123、153、および171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B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 36 ~ 43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 : 36 ~ 43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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 36 ~ 43のいずれか1つ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、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 40、41、もしくは498 ~ 503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 : 40、41、もしくは498 ~ 503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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 40、41、または498 ~ 503のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。

10

【0024】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO : 44に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 44のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 44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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 124、125、126、127、128、129、130、131、132、または133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 : 154に示されるアミノ酸配列を含むCDR2 ; ならびにSEQ ID NO : 172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、および183からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および172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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および173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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および174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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および175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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 125、154、および173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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 126、154、および173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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 127、154、および173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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 128、154、および173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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 129、154、および173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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 130、154、および173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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 131、154、および173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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および176に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつ

20

30

40

50

かの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および177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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および178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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および179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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および180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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および181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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および182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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および183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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 126、154、および176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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および179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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および182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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 132、154、および176 ; またはそれぞれSEQ ID NO : 133、154、および173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B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 45 ~ 91および466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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 45 ~ 91および466のいずれか1つ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、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 56 ~ 91、466、および504 ~ 514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 : 56 ~ 91、466、および504 ~ 514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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 56 ~ 91、466、および504 ~ 514のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。

10

20

30

40

50

【0025】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO : 105に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 105のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 105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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 145に示されるアミノ酸配列を含むCDR1 ; SEQ ID NO : 167に示されるアミノ酸配列を含むCDR2 ; およびSEQ ID NO : 488に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 106 ~ 109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 : 106 ~ 109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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3

VHHドメインは、SEQ ID NO : 106 ~ 109のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。

【0026】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO : 110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 : 110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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 139に示されるアミノ酸配列を含むCDR1 ; SEQ ID NO : 161に示されるアミノ酸配列を含むCDR2 ; およびSEQ ID NO : 189に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 111 ~ 114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 : 111 ~ 114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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 111 ~ 114のいずれか1つ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、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 515 ~ 518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 : 515 ~ 518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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 515 ~ 518のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。

【0027】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104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B7H3に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 134、155、および184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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 135、156、および168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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 136、157、および185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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 137、158、および186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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 138、159、および187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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 138、160、および188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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 139、161、および189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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 140、162、および483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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 141、163、および484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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 139、161、および189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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 142、164、および485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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 143、165、および486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B7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 144、166、および487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B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、または104に示される。

10

【0028】

いくつかの態様において、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 1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、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 8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、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 43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、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 503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、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 67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、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 85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、B7H3 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。いくつかの態様において、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 456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、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 466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、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 467に示されるVHHドメイン配列を含む。

20

【0029】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、B7H3 VHHドメインは、例えば、別のポリペプチドなどの別のアミノ酸配列への連結のために、そのN末端および/またはC末端に追加のアミノ酸を含んでもよい。提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、B7H3 VHHドメインは、グリシンリンカー、または本明細書においてGSリンカーと表される、主にアミノ酸グリシンおよびセリンから構成されるリンカーなどの、可動性リンカーを含んでもよい。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アミノ酸の長さのものであることができる。いくつかの態様において、リンカーは、GGSGGS、すなわち、

30

(GGG)₂ (SEQ ID NO: 191); GGSGSGGS, すなわち, (GGG)₃ (SEQ ID NO: 192);

GGSGSGSGSGGS, すなわち, (GGG)₄ (SEQ ID NO: 193); および GGSGSGSGSGSGSGGS, すなわち, (GGG)₅ (SEQ ID NO: 194), Gly-Gly (GG), GGG, GGGG (SEQ ID NO: 195), GGGGG (SEQ ID NO: 196), および GGGGGG (SEQ ID NO: 197)

40

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であり、nは1~5であり(SEQ ID NO: 123); (GGGGGG)_nであり、nは1~4であり(SEQ ID NO: 124); GGGGS (SEQ ID NO: 125); GGGGG

(SEQ ID NO: 126); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 317); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 318); GGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 319); または PGGGG (SEQ ID NO: 444)

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、B7H3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、B7H3 VHHドメインは、例えば、別のポリペプチドなど

50

の別のアミノ酸配列への連結のために、そのC末端に追加のリンカーを含んでもよい。提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、B7H3 VHHドメインは、例えば、別のポリペプチドなどの別のアミノ酸配列への連結のために、そのN末端にリンカーを含んでもよい。

【0030】

第1のFcポリペプチドと第2のFcポリペプチドとを含むヘテロ二量体Fc領域を含む、第1の構成要素、および、可変重鎖領域（VH）と可変軽鎖領域（VL）とを含む抗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、該ヘテロ二量体Fc領域が、抗CD3抗体のN末端に位置づけられ；かつ、第1および第2の構成要素の一方または両方が、B7H3に特異的に結合するシングルドメイン抗体を含む少なくとも1つの抗原結合ドメイン（B7H3 VHHドメイン）を含む、前記多重特異性ポリペプチド構築物が、本明細書において提供される。特定の態様において、B7H3 VHHドメインは、上記または本明細書における他所に記載されるようないずれかを含む、提供されるB7H3 VHHドメイン配列のいずれかを含むことができる。

【0031】

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のポリペプチド中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のポリペプチドの一方または両方は、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインを含む。

【0032】

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：198に示されるFcポリペプチドまたはその免疫学的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。

【0033】

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。1つの態様において、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から選択される改変を含み、かつヘテロ二量体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むことができ、該第1のFcポリペプチドの改変は、位置Ser354およびTyr349のうちの一方にあり、かつ該第2のFcポリペプチドの改変は、位置Ser354およびTyr349のうちのもう一方にある。

【0034】

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、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、該改変は、もう一方のポリペプチドの相補的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。

【0035】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、ヘテロ二量体Fc領域の第1または

第2のFcポリペプチドのうちの一方は、さらに、残基Ile253に改変を含む。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領域の第1または第2のFcポリペプチドのうちの一方は、さらに、残基His435に改変を含む。いくつかの態様において、改変はHis435Argである。

【0036】

いくつかの態様において、提供されるポリペプチドまたは構築物のいずれかのFc領域は、Lys447を欠如しているポリペプチドを含む。

【0037】

いくつかの態様において、提供されるポリペプチドまたは構築物のいずれかのFc領域は、FcRn結合を増強する少なくとも1つの改変を含む。いくつかの態様において、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である。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にある。いくつかの態様において、改変は、Met252YおよびMet428Vにある。

10

【0038】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 293、297、305、または307のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 294、298、301、303、309、または311のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

20

【0039】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、提供される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から選択されるエフェクター分子に対する結合を低減させる、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。

【0040】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 295、299、306、または308のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 296、300、302、304、310、または312のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

30

【0041】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、抗CD3抗体または抗原結合断片は一価である。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。

【0042】

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、一本鎖抗体ではなく、例えば、一本鎖可変断片(scFv)ではない。

40

【0043】

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: 219) を含むVH CDR1 ;
アミノ酸配列
RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 220)

を含むVH CDR2 ;

アミノ酸配列

50

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 221)

を含むVH CDR3、
アミノ酸配列

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 222)

を含むVL CDR1；

アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 223) を含むVL CDR2；および

アミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 224) 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: 225 ~ 255、480、460、もしくは462のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 225 ~ 255、480、460、もしくは462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；および、SEQ ID NO: 256 ~ 274、417、459、もしくは461のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 6256 ~ 274、417、459、もしくは461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: 237のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 265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: 237のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 417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: 460のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 461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: 480のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 459のアミノ酸配列を含む。

【0044】

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の第1のFcポリペプチドに連結されており、かつ抗CD3抗体または抗原結合断片のVHは、ヘテロ二量体Fcの第2のFcポリペプチドに連結されている。

【0045】

いくつかの態様において、CD3結合領域は、可変重鎖領域(VH)および可変軽鎖領域(VL)を含み、VLは、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドのC末端であり、かつVHは、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチドのC末端であり、該第1のFcポリペプチドは、ホール変異を含み、かつ該第2のFcポリペプチドは、ノブ変異を含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのB7H3シングルドメイン抗体は、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、かつ/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づけられる。

【0046】

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、B7H3に特異的に結合する第1のB7H3 VHHドメインと、B7H3に特異的に結合する第2のB7H3 VHHドメインとを含む。いくつかの態様において、第1または第2のB7H3 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づけられ、かつ第1または第2のB7H3 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づけられる。

【0047】

提供される多重特異性ポリペプチド構築物のいずれかのうち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、B7H3に結合する第1のB7H3 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B7H3に結合する第2のB7H3 VHHドメインを含み；かつ、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の構成要素中に存在するのと同じ

10

20

30

40

50

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。

【0048】

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、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、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のポリペプチド中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、該第1および該第2のポリペプチドの一方または両方は、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインを含む。

10

【0049】

いくつかの態様において、ポリペプチド構築物は、免疫グロブリンFc領域を含む。いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域は、少なくとも1つのB7H3 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。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。いくつかの態様において、Fc領域は、SEQ ID NO：198、200、201、202、もしくは203のいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO：198、200、201、202、もしくは203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。いくつかの態様において、Fc領域は、SEQ ID NO：198に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO：198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。

20

【0050】

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から選択されるエフェクター分子に対する結合を低減させる、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。いくつかの態様において、Fc領域は、SEQ ID NO：199に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO：199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。

30

【0051】

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：198に示されるFcポリペプチドまたはその免疫学的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改変を含むか、また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を含む。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、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、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、該改変は、もう一方のポリペプチドの相補的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。いくつかの態様において、Fc領域は、FcRn結合を増強する少なくとも1つの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、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から選択されるエフェクター分子に対する結合を低減させる、少なくとも1つのアミノ酸改変を含むポリペプチドを

40

50

含む。

【0052】

いくつかの態様において、第1および第2の構成要素の一方または両方は、41BB (CD137) 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、共刺激受容体結合領域 (CRBR) を1つだけ含む。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、かつ/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づけられる。

【0053】

提供される多重特異性ポリペプチド構築物のいずれかのうち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、B7H3に結合する第1のB7H3 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B7H3に結合する第2のB7H3 VHHドメインを含み；かつ、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の構成要素中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、該CRBRは、第2の構成要素のFc領域に対してアミノ末端に、または第2の構成要素の抗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づけられる。

【0054】

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に対する結合活性を示すそのバリエーションである、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。

【0055】

提供される態様のいずれかのうち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NKG2Dの中から選択される共刺激受容体に結合する。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) のの中から選択される共刺激受容体に結合する。

【0056】

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) に結合する。

【0057】

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: 400に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 400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に結合する。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、SEQ ID NO: 481に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 481に示される配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92

10

20

30

40

50

%、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に結合する。

【0058】

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: 400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、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)は、SEQ ID NO: 481に示されるアミノ酸の配列を含む。

【0059】

いくつかの態様において、第1および第2の構成要素の一方または両方は、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、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、かつ/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、抑制性受容体結合領域(IRBR)を1つだけ含む。

10

【0060】

提供される多重特異性ポリペプチド構築物のいずれかのうち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、B7H3に結合する第1のB7H3 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B7H3に結合する第2のB7H3 VHHドメインを含み；かつ、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の構成要素中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、該IRBRは、第2の構成要素のFc領域に対してアミノ末端に、または第2の構成要素の抗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づけられる。

20

【0061】

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に対する結合活性を示すそのバリエーションである、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、およびTIM3の中から選択される抑制性受容体に結合する。いくつかの態様において、少なくとも1つのIRBRはPD-1に結合する。

30

【0062】

多重特異性ポリペプチド構築物の提供される態様のいずれかのうち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、B7H3に結合する第1のB7H3 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B7H3に結合する第2のB7H3 VHHドメインを含み；かつ、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の構成要素中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。

40

【0063】

提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、リンカーは、ペプチドリinkerまたはポリペプチドリinker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アミノ酸の

50

長さである。

【 0 0 6 4 】

いくつかの態様において、リンカーは、切断不可能なリンカー、例えば、GS, GGS, GGGGS (SEQ ID NO: 315), GGGGGS (SEQ ID NO: 316)

およびそれらの組み合わせを含むリンカーである。いくつかの態様において、リンカーは、配列

GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 317)

である、またはそれを含む。

10

【 0 0 6 5 】

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、例えば、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。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中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、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列

GGSGGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO: 361)

20

を含む。

【 0 0 6 6 】

B7H3に結合する、および、上記または本明細書における他所に記載されるようないずれかを含む、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメイン配列のいずれかを含む、単離されたシングルドメイン抗体が、本明細書において提供される。

【 0 0 6 7 】

SEQ ID NO : 115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、および145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 : 146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、および167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 : 168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および483～488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、B7H3に結合する単離されたシングルドメイン抗体が、本明細書において提供される。

30

【 0 0 6 8 】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fc領域は、FcホールポリペプチドとFcノブポリペプチドとを含み、抗CD3抗体または抗原結合断片のVLは、FcホールのC末端に位置づけられ、かつ抗CD3抗体または抗原結合断片のVHは、FcノブのC末端に位置づけられる。

40

【 0 0 6 9 】

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一価である。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、一本鎖抗体ではなく、任意で、一本鎖可変断片（scFv）ではない。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。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 : 237のアミノ酸配列およびSEQ ID NO : 265のアミノ酸配列を

50

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 : 237のアミノ酸配列およびSEQ ID NO : 417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 : 460のアミノ酸配列およびSEQ ID NO : 461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 : 480のアミノ酸配列およびSEQ ID NO : 459のアミノ酸配列を含む。

【0070】

提供されるB7H3結合ポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。提供される多重特異性ポリペプチド構築物のいずれかをコードするポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。提供される多重特異性構築物のいずれかの第1のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、提供される多重特異性構築物のいずれかの第2のポリペプチドをコードする第2の核酸配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)、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が、本明細書において提供される。

10

【0071】

提供されるシングルドメイン抗体のいずれかをコードするポリヌクレオチドが、本明細書において提供される。提供されるポリヌクレオチドのいずれかを含まれるベクターが、本明細書において提供される。

【0072】

提供される1つもしくは複数のポリヌクレオチドのいずれか、または提供される1つもしくは複数のベクターのいずれかを含まれる細胞が、本明細書において提供される。

20

【0073】

ポリペプチドを生成する方法であって、提供される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いずれかを細胞中に導入する工程、および多重特異性ポリペプチド構築物を生成する条件下で該細胞を培養する工程を含む前記方法が、本明細書において提供される。本明細書で提供される方法のいずれかによって生成されるポリペプチドが、本明細書において提供される。

【0074】

提供されるシングルドメイン抗体のいずれかを含まれる細胞外ドメイン；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、本明細書において提供される。

30

【0075】

提供されるB7H3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のいずれかを含まれる薬学的組成物が、本明細書において提供される。

【0076】

対象において免疫応答を刺激するかまたは誘導する方法であって、その必要がある対象に、提供されるB7H3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、もしくは操作された免疫細胞、または薬学的組成物のいずれかを投与する工程を含む前記方法が、本明細書において提供される。対象において疾患または状態を処置する方法であって、その必要がある対象に、治療的有効量の、提供されるB7H3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、もしくは操作された免疫細胞、または薬学的組成物のいずれかを投与する工程を含む前記方法が、本明細書において提供される。

40

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1 - 1】図1A ~ 1Fは、細胞表面B7H3に結合する様々な抗B7H3シングルドメイン抗体(sdAb)の能力を図示する一連のグラフを示す。結合をフローサイトメトリーによって、B7H3陽性細胞株であるNCI-H460(図1A ~ 1B)もしくはA375(図1C)、ま

50

たはB7H3をトランスフェクトした293細胞（図1D、1E、1F）に対して評価した。

【図1-2】図1-1の説明を参照のこと。

【図1-3】図1-1の説明を参照のこと。

【図2-1】図2A～2Vは、細胞表面B7H3に結合するヒト化sdAbの能力を図示する一連のグラフを示す。図2A～2Cは、NCI-H460に対する57B04およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。図2Dは、NCI-H460に対する57B06およびそのヒト化（hz）バリエーションの結合を示す。図2Eは、B7H3を発現する293FS細胞に対する1H5およびそのヒト化（hz）バリエーションの結合を示す。図2F～2Iおよび2X～Yは、NCI-H460（図2F）またはB7H3を発現する293FS細胞（図2G、2H、2I、2X、2Y）に対するヒト化（hz）1A5バリエーションの結合を示す。図2J～2Wは、HCT-116（図2J、2K、2L）、NCI-H460（図2M、2N、2O、2P、2R、2S、2T、2U）、A549（図2Q）、またはB7H3を発現する293FS細胞（図2Vおよび2W）に対する58E05およびそのヒト化（hz）バリエーションの結合を示す。

【図2-2】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-3】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-4】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-5】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-6】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-7】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-8】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-9】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-10】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-11】図2-1の説明を参照のこと。

【図2-12】図2-1の説明を参照のこと。

【図3A】図3A～3Eは、様々なB7H3を標的とする制約付き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。本開示のB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の基本的な構成要素は、制約付きのCD3結合を有する。抗原結合ドメインは、アミノ末端および/またはカルボキシ末端に位置づけられる。ヘテロ二量体Fc領域などのFc領域は、CD3結合領域のN末端に位置づけられる。CD3結合領域に近接したFcのこの位置づけは、CD3結合を妨げる。

【図3B】図3Aの説明を参照のこと。

【図3C】図3Aの説明を参照のこと。

【図3D】図3Aの説明を参照のこと。

【図3E】図3Aの説明を参照のこと。

【図4】図4A～4Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx3855またはB7H3xCD3 DART-Fcの結合の有無を図示する。図4Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図4Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図4Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

【図5】図5A～5Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx4137の結合の有無を図示する。図5Aは、B7H3陽性A375細胞に対する結合の有無を図示する。図5Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図5Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

【図6】図6A～6Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx3090の結合の有無を図示する。図6Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図6Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図6Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

【図7】図7A～7Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx3243の結合の有無を図示する。図7Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図7Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図7Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

【図 8】図 8A～8Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx4736の結合の有無を図示する。図 8Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図 8Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図 8Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

【図 9】図 9A～9Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx4136の結合の有無を図示する。図 9Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図 9Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図 9Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

【図 10】図 10A～10Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx3072の結合の有無を図示する。図 10Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図 10Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図 10Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

10

【図 11】図 11A～11Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx4641の結合の有無を図示する。図 11Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図 11Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図 11Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

【図 12】図 12A～12Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx4645の結合の有無を図示する。図 12Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図 12Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図 12Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

20

【図 13】図 13A～13Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx4736 (50nM) の結合の有無を図示する。図 13Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図 13Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図 13Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

【図 14】図 14A～14Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx4736 (12.5nM) の結合の有無を図示する。図 14Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図 14Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図 14Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

【図 15】図 15A～15Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx2846の結合の有無を図示する。図 15Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図 15Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図 15Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

30

【図 16】図 16A～16Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx3834の結合の有無を図示する。図 16Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図 16Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図 16Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

【図 17】図 17A～17Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx3960の結合の有無を図示する。図 17Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図 17Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図 17Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

40

【図 18】図 18A～18Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx4904の結合の有無を図示する。図 18Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図 18Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図 18Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

【図 19】図 19A～19Cは、B7H3標的細胞またはT細胞に対するcx4908の結合の有無を図示する。図 19Aは、B7H3陽性細胞であるA375細胞株に対する結合の有無を図示する。図 19Bは、初代ヒトT細胞に対する結合の有無を図示する。図 19Cは、A375および初代ヒトT細胞に対する結合を比較する滴定を図示する。

【図 20】図 20A～20Bは、B7H3依存性T細胞活性化を惹起する、B7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の能力を実証するグラフを図示する。Jurkat CD3

50

NFAT-GFPレポーター細胞株を用いて、T細胞活性化をモニタリングした。A375細胞（図20A）およびCRISPRによってB7H3遺伝子が破壊されたA375細胞（A375 B7H3-/-、図20B）を、それぞれ抗原陽性細胞株および抗原陰性細胞株として用いた。DART-Fc形式で二重特異性のB7H3×CD3を、比較として用いた。

【図21】図21A～21Bは、それぞれ抗原陽性細胞株および抗原陰性細胞株として用いたB7H3陽性細胞株A375（図21A）またはCRISPRによってB7H3遺伝子が破壊されたA375細胞株（A375 B7H3-/-、図21B）に対して、抗原特異的なT細胞細胞傷害活性を媒介する、B7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の能力を実証するグラフを図示する。DART-Fc形式で二重特異性のB7H3×CD3を、比較として用いた。

【図22】図22A～22Bは、T細胞とB7H3陽性細胞（A375；図22A）またはB7H3陰性細胞（A375 B7H3-/-；図22B）のいずれかとの共培養中の、B7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の存在下でのCD4+ T細胞におけるCD25発現を図示する。

10

【図23】図23A～23Bは、T細胞とB7H3陽性細胞（A375；図23A）またはB7H3陰性細胞（A375 B7H3-/-；図23B）のいずれかとの共培養中の、B7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の存在下でのCD4+ T細胞におけるCD69発現を図示する。

【図24】図24A～24Bは、T細胞とB7H3陽性細胞（A375；図24A）またはB7H3陰性細胞（A375 B7H3-/-；図24B）のいずれかとの共培養中の、B7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の存在下でのCD4+ T細胞におけるCD71発現を図示する。

20

【図25】図25A～25Bは、T細胞とB7H3陽性細胞（A375；図25A）またはB7H3陰性細胞（A375 B7H3-/-；図25B）のいずれかとの共培養中の、B7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の存在下でのCD8+ T細胞におけるCD25発現を図示する。

【図26】図26A～26Bは、T細胞とB7H3陽性細胞（A375；図26A）またはB7H3陰性細胞（A375 B7H3-/-；図26B）のいずれかとの共培養中の、B7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の存在下でのCD8+ T細胞におけるCD69発現を図示する。

【図27】図27A～27Bは、T細胞とB7H3陽性細胞（A375；図27A）またはB7H3陰性細胞（A375 B7H3-/-；図27B）のいずれかとの共培養中の、B7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の存在下でのCD8+ T細胞におけるCD71発現を図示する。

30

【図28A】図28A～28Dは、抗原依存性様式でT細胞またはPBMCからのIFN（図28A～28C）またはTNF（図28D）の産生を惹起する、B7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の能力を実証する一連のグラフを図示する。サイトカイン産生は、B7H3陽性細胞株A375の存在下または非存在下でFluoroSpotアッセイを用いてモニタリングした。

【図28B】図28Aの説明を参照のこと。

【図28C】図28Aの説明を参照のこと。

【図28D】図28Aの説明を参照のこと。

40

【図29】図29Aは、NFAT駆動ルシフェラーゼレポーター遺伝子と共にCD16aを安定に発現するように操作されたJurkatレポーターを用いて評価した場合の、A375標的細胞のADCCを誘導する58E05-Fcの能力を図示する。図29Bは、NFAT駆動ルシフェラーゼレポーター遺伝子と共にCD16aを安定に発現するように操作されたJurkatレポーターを用いて評価した場合の、SHP-77標的細胞のADCCを誘導する58E05-Fcおよび1A5-Fcのヒト化バリエーションの能力を図示する。従来の抗B7H3 IgG1抗体を、比較として用いて、それは、低レベルから中間レベルのB7H3を発現する細胞株であるSHP-77の存在下でCD16a発現を媒介する能力を示さなかった。

【図30A】図30Aは、2つのポリペプチドである鎖1および鎖2から構成される、様々

50

なB7H3を標的とする制約付きCD3構築物の模式図である。鎖1は、G100Cで改変された抗CD3 VLドメインに、切断不可能なリンカーを介して連結された、ヘテロ二量体Fc「ホール」(上)；抗CD3 VLドメインに、切断不可能なリンカーを介して連結された、ヘテロ二量体Fc「ホール」に連結されたB7H3を標的とするsdAb(中央)；またはG100Cで改変された抗CD3 VLドメインに、切断不可能なリンカーを介して連結された、ヘテロ二量体Fc「ホール」に連結されたB7H3を標的とするsdAb(下)のいずれかを含有する。鎖2は、第2のB7H3 sdAbに連結されたG44Cで改変された抗CD3 VHドメインに、上記のような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B7H3を標的とするsdAb(上)；抗CD3 VHドメインに、上記のような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B7H3を標的とするsdAb(中央)；またはG44Cによって改変された抗CD3 VHドメインに、上記のような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B7H3を標的とするsdAb(下)のいずれかを含有する。共発現させると、CD3結合ドメインは、それぞれホールおよびノブ上のVL:VHの会合を介して、妥当にアセンブルされる。表された場合、VH:VL相互作用は、改変された残基であるVHドメイン中のG44CとVLドメイン中の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る。

10

【図30B】図30Bは、2つのポリペプチドである鎖1および鎖2から構成される、様々なB7H3を標的とする制約付きCD3構築物の模式図である。鎖1は、共刺激受容体を標的とするsdAbに連結されたG100Cで改変された抗CD3 VLドメインに、切断不可能な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B7H3を標的とするsdAbに連結されたG44Cで改変された抗CD3 VHドメインに、上記のような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B7H3を標的とするsdAb(上)；B7H3を標的とするsdAbに連結されたG44Cで改変された抗CD3 VHドメインに、上記のような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、上記のような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B7H3を標的とするsdAb(下)のいずれかを含有する。共発現させると、CD3結合ドメインは、それぞれホールおよびノブ上のVL:VHの会合を介して、妥当にアセンブルされる。VH:VL相互作用は、改変された残基であるVHドメイン中のG44CとVLドメイン中の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る。結果として生じた構築物は、二価様式(上)または一価様式(中央および下)のいずれかでB7H3をエンゲージする。ここにおける構築物はすべて、共刺激受容体を標的とするsdAbを含有する。

20

30

【図30C】図30Cは、3つのポリペプチドである鎖1、鎖2、および鎖3から構成される、様々なB7H3を標的とする制約付きCD3構築物の模式図であり、ここで、B7H3ターゲティングドメインはFABである。鎖1は、BH73を標的とするVH、G100Cの改変を欠如する(上)かまたは含有する(中央)かいずれかの抗CD3 VLドメインに、上記のようなリンカーを介して連結された、ヘテロ二量体Fcの第1のメンバー(Fc-Het-1)にヒンジを介して連結されたIgG定常重鎖1(CH1)を含有する。鎖2は、BH73を標的とするVH、G44Cの改変を欠如する(上)かまたは含有する(中央)かいずれかの抗CD3 VHドメインに、上記のようなリンカーを介して連結された、ヘテロ二量体Fcの第2のメンバー(Fc-Het-2)にヒンジを介して連結されたIgG定常重鎖1(CH1)を含有する。鎖3は、ヒトIg定常軽鎖(CL)領域に連結された相補的なB7H3を標的とするVLドメインを含有する。共発現させると、CD3結合ドメインは、相補的なヘテロ二量体Fc領域上のVL:VHの会合を介して、妥当にアセンブルされる。表された場合、VH:VL相互作用は、改変された残基であるVHドメイン中のG44CとVLドメイン中の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る。

40

【図31-1】図31A~Fは、代表的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物による細胞結合を図示する。図31A、C、およびEは、A375細胞(B7H3陽性ヒト黒色腫細胞株)に対する結合を示す。図31B、D、およびFは、単離されたT細胞に対する結合の欠如を示す。

50

【図 3 1 - 2】図 31-1 の説明を参照のこと。

【図 3 2】図 32A ~ D は、標的依存性様式で CD3 をアゴナイズする、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力を図示する。図 32A および図 32C は、B7H3 陽性 A375 細胞の存在下で CD3 シグナル伝達を媒介する能力を図示し、他方、図 32B および図 32D は、B7H3 陰性 CCRF-CEM 細胞の存在下で CD3 シグナル伝達を媒介できないことを示す。Jurkat CD3 NFAT-GFP レポーター細胞株を用いて、CD3 アゴニズムを評価した。

【図 3 3】図 33A は、標的依存性様式で T 細胞媒介性細胞傷害活性を誘導する、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物 (cx3072) の能力を図示する。標的細胞を cytoID 赤色標識で標識し、カスパーゼ 3/7 緑色試薬の添加によって、死細胞を可視化した。細胞傷害活性を、赤色の標的細胞と緑色の死細胞との重複面積を測定することによって評価した。CRISPR 技術によって作製された B7H3 陰性 A375 細胞株を用いて、抗原特異的な T 細胞媒介性細胞傷害活性を試験した。cx3072 は、これらの B7H3 欠損 A375 細胞の T 細胞媒介性細胞傷害活性を惹起することができなかった。図 33B は、B7H3 陽性 A375 細胞の存在下では T 細胞媒介性細胞傷害活性を誘導するが、B7H3 陰性 CCRF-CEM 細胞の存在下では T 細胞媒介性細胞傷害活性を誘導しない、cx5952 の能力を示す。

【図 3 4】図 34A および 34B は、標的依存性様式で T 細胞媒介性細胞傷害活性を誘導する、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力を図示する。図 34A は、B7H3 陽性 A375 細胞の存在下で T 細胞媒介性細胞傷害活性を誘導するこれらの構築物の能力を図示し、他方、図 34B は、B7H3 陰性 CCRF-CEM 細胞の存在下で T 細胞媒介性細胞傷害活性を誘導するこれらの構築物の能力を図示する。細胞傷害活性は、赤色の標的細胞と緑色の死細胞との重複面積を測定することによって評価した。図 34C および 34D は、標的依存性様式で T 細胞媒介性細胞傷害活性を誘導する、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力を図示する。図 34C は、B7H3 陽性 A375 細胞の存在下で T 細胞媒介性細胞傷害活性を誘導するこれらの構築物の能力を図示し、他方、図 34D は、B7H3 陰性 CCRF-CEM 細胞の存在下で T 細胞媒介性細胞傷害活性を誘導するこれらの構築物の能力を図示する。細胞傷害活性は、赤色の標的細胞と緑色の死細胞との重複面積を測定することによって評価した。

【図 3 5 - 1】図 35A ~ C は、標的依存性様式で T 細胞媒介性細胞傷害活性および T 細胞活性化を誘導する、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物 (cx5952) の能力を図示する。細胞傷害活性は、赤色の標的細胞と緑色の死細胞との重複面積を測定することによって評価した。図 35A ~ C は、標的依存性様式で CD4+ T 細胞および CD8+ T 細胞を活性化させる cx5952 の能力を示す。T 細胞活性化は、T 細胞活性化マーカーである CD25 (図 35A)、CD69 (図 35B)、および CD71 (図 35C) の発現によって評価した。図 35D ~ 35K は、標的依存性様式で T 細胞活性化を誘導する、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力を図示する。B7H3 標的依存性 CD4+ T 細胞活性化は、T 細胞活性化マーカーである CD25 (図 35D) および CD71 (図 35F) の発現によって示される。B7H3 標的依存性 CD8+ T 細胞活性化は、T 細胞活性化マーカーである CD25 (図 35H) および CD71 (図 35J) の発現によって示される。CD4+ T 細胞 (図 35E) もしくは CD8+ T 細胞 (図 35I) において示されるような T 細胞活性化マーカー CD25 に基づいて、または CD4+ T 細胞 (図 35G) もしくは CD8+ T 細胞 (図 35K) において示されるような T 細胞活性化マーカー CD71 に基づいて、非標的 CD8+ T 細胞活性化は観察されなかった。

【図 3 5 - 2】図 35-1 の説明を参照のこと。

【図 3 5 - 3】図 35-1 の説明を参照のこと。

【図 3 6 A】図 36A は、標的依存性様式で IFN γ 産生を誘導する、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力を図示する。図 36A は、B7H3 を標的とする CD3 エンゲージング構築物の存在下で B7H3 陽性 A375 細胞または B7H3 陰性 CCRF-CEM 細胞と培養した、T 細胞からの IFN γ の産生を示す。

【図 3 6 B】図 3 6 B は、標的依存性様式で IFN 産生を誘導する、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力を図示する。図 3 6 B は、B7H3 を標的とする CD3 エンゲージング構築物の存在下で B7H3 陽性 A375 細胞または B7H3 陰性 CCRF-CEM 細胞と培養した、T 細胞からの IFN の産生を示す。

【図 3 7】図 3 7 A および 3 7 B は、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の細胞結合を図示する。cx5187 および cx5823 は各々、2 つの B7H3 結合ドメインを含有し、他方、構築物 cx5873 および cx5965 は各々、1 つの B7H3 結合ドメインを含有する。図 3 7 A は、B7H3 陽性 A375 細胞に対する結合を示す。図 3 7 B は、B7H3 陰性 CCRF-CEM 細胞および単離された T 細胞に対する結合の欠如を示す。図 3 7 C および図 3 7 D は、標的依存性様式で CD3 をアゴナイズする、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力を図示する。図 3 7 C は、B7H3 に対して二価かつバイエピトープ (bi-epitopic) である分子 (cx5187) での B7H3 陽性 A375 細胞のエンゲージングが、B7H3 に対して一価である構築物 (cx5873 および cx5965) よりも強力な CD3 シグナル伝達を誘導したことを示す。図 3 7 D は、B7H3 陰性 CCRF-CEM 細胞の存在下での T 細胞の活性化の欠如を示す。Jurkat CD3 NFAT-GFP レポーター細胞株を用いて、CD3 アゴニズムを評価した。

10

【図 3 8】図 3 8 A および図 3 8 B は、標的依存性様式で T 細胞媒介性細胞傷害活性を誘導する、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力を図示する。図 3 8 A は、B7H3 に対して二価かつバイエピトープである構築物 (cx5187) での B7H3 陽性 A375 細胞のターゲティングが、B7H3 に対して一価である構築物 (cx5873 および cx5965) よりも強力な T 細胞媒介性細胞傷害活性を誘導したことを示す。図 3 8 B は、B7H3 陰性 CCRF-CEM 細胞に対する T 細胞媒介性細胞傷害活性の欠如を図示する。

20

【図 3 9】図 3 9 A ~ D は、B7H3 陽性 A375 細胞の存在下では T 細胞を活性化するが、B7H3 陰性 CCRF-CEM 細胞の存在下では T 細胞を活性化しない、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力を図示する。図 3 9 A および 3 9 B は、B7H3 に対して二価かつバイエピトープである構築物 (cx5187) での B7H3 陽性 A375 細胞のターゲティングが、B7H3 に対して一価である構築物 (cx5873 および cx5965) よりも強力な、それぞれ CD4+ T 細胞および CD8+ T 細胞上の CD25 発現を誘導したことを示す。図 3 9 C および 3 9 D は、B7H3 陰性 CCRF-CEM 細胞の存在下での、それぞれ CD4+ T 細胞および CD8+ T 細胞上の CD25 発現の欠如を示す。

30

【図 4 0 - 1】図 4 0 A および 4 0 B は、B7H3 陽性 A375 細胞の存在下では T 細胞媒介性細胞傷害活性を惹起する (図 4 0 A) が、CCRF-CEM B7H3 陰性細胞の存在下では T 細胞媒介性細胞傷害活性を惹起しない (図 4 0 B)、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力を実証する。図 4 0 C ~ 4 0 J は、CD4+ T 細胞上の CD25 の発現 (それぞれ図 4 0 C および 4 0 D)、CD8+ T 細胞上の CD25 発現 (それぞれ図 4 0 E および 4 0 F)、CD4+ T 細胞上の CD71 発現 (それぞれ図 4 0 G および 4 0 H)、CD8+ T 細胞上の CD71 発現 (それぞれ図 4 0 I および 4 0 J) によって評価されるような、B7H3 陽性 A375 細胞の存在下では T 細胞活性化を惹起するが、CCRF-CEM B7H3 陰性細胞の存在下では T 細胞活性化を惹起しない、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力を実証する。図 4 0 K および 4 0 L は、B7H3 陽性 A375 細胞の存在下では T 細胞サイトカイン産生を惹起する (図 4 0 K) が、CCRF-CEM B7H3 陰性細胞の存在下では T 細胞サイトカイン産生を惹起しない (図 4 0 L)、代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力を実証する。

40

【図 4 0 - 2】図 4 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 0 - 3】図 4 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 0 - 4】図 4 0 - 1 の説明を参照のこと。

【図 4 1】図 4 1 A ~ 4 1 B は、CRBR として 4-1BB 結合ドメインを有する、様々な代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージャーを図示する。cx5841 および cx5187 は、ヘテロ二量体の一方の鎖である Fc ノブの N 末端および C 末端に位置づけられた、B7H3 を標的とする sdAb を有し、ヘテロ二量体の相対する鎖である Fc ホールの C 末端に位置

50

づけられた、41BBを標的とするsdAbを有するが、互いに対して相対して位置づけられた、CD3結合FvのVHおよびVLを有する。

【図42-1】図42A~Dは、図41A~Bに記載される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42Aおよび42Bは、それぞれB7H3陽性細胞株A375またはB7H3陰性細胞株CCRF-CEMを、Jurkat CD3 NFAT-GFPレポーター細胞と共培養した場合の、GFPレポーターの平均蛍光強度(MFI)を図示する。図42Cおよび42Dは、それぞれB7H3陽性細胞株A375またはB7H3陰性細胞株CCRF-CEMを、Jurkat CD3 NFAT-ルシフェラーゼレポーター細胞と共培養した場合の、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42-2】図42-1の説明を参照のこと。

【発明を実施するための形態】

【0078】

詳細な説明

以下B7H3結合ポリペプチドとも呼ばれる、B7H3に特異的に結合するポリペプチドが、本明細書において提供される。いくつかの態様において、提供される結合ポリペプチドは、B7H3に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、本明細書で提供されるB7H3結合ポリペプチドは、各々が個々にB7H3に結合する1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、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、本明細書で提供されるB7H3結合ポリペプチドは、B7H3に結合する1つ、2つ、3つ、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、B7H3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、B7H3結合ポリペプチドは多重特異性である。例えば、提供されるB7H3結合ポリペプチドは、B7H3に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、B7H3以外の1つまたは複数の標的タンパク質に結合する、1つまたは複数の追加のVHHドメインなどの、1つまたは複数の追加の結合ドメインとを含んでもよい、ポリペプチドを含む。

【0079】

いくつかの態様において、B7H3結合ポリペプチドは、B7H3に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、Fcドメインとを含む。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3結合ポリペプチドは、B7H3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。いくつかの態様において、Fcドメインは、B7H3結合部位の数を二倍にする二量体が形成されるように、生理的条件下でB7H3結合ポリペプチドの二量体化を媒介する。例えば、B7H3に結合する3つのVHHドメインとFc領域とを含むB7H3結合ポリペプチドは、単量体として三価であるが、生理的条件下で、Fc領域は、B7H3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。

【0080】

B7H3(CD276とも呼ばれる)は、免疫細胞調節分子のB7ファミリーのメンバーである。これは、神経芽腫、黒色腫、腎細胞がん、前立腺がん、大腸がん、膵臓がん、胃がん、乳がん、卵巣がん、および小細胞肺癌を含むがそれらに限定されない、多種多様な腫瘍細胞および腫瘍血管系の表面上に発現している。ヒトにおいて、B7H3タンパク質は、2Igおよび4Igの2つの型で発現している。2Ig型は、他のB7ファミリーメンバーと同様に、1つのV様および1つのC様Igドメインのみを含有する細胞外領域を有する(Chapoval et al, 2001, Nat. Immunol. 2:269-274)。4Ig型は、タンデムの二重のV様およびC様Igドメインを含有し(Steinberger et al, 2004, J. Immunol. 172:2352-2359; Sun et al, 2002, J. Immunol. 168:6294-6297)、かつ、ヒトにおいて免疫細胞および腫瘍細胞上で誘導される優勢なアイソフォームであることが示されている(Zhou et al. (2007) Tissue Antigens, 70:96-104)。場合によっては、腫瘍組織上でのB7H3発現のレベルは、臨床的ながんの再発のリスクの増加を伴い、かつがん特異的な死を伴う、腫瘍が転移している程度と強く相関することが示されている(Roth et al, 2007, Cancer Res. 67:7893-7900; Zang et al, 2007, Proc. Natl. Acad

10

20

30

40

50

. Sci. U.S.A. 104: 19458-19463)。同様に、腫瘍組織上での高レベルのB7H3発現は、明細胞腎細胞癌、尿路上皮細胞癌 (Crispen et al, 2008, Clin. Cancer Res. 14:5150-5157; Boorjian et al., 2008, Clin. Cancer Res. 14:4800-4808)、卵巣がん (Zang et al, 2010, Mod. Pathol. 23: 1104-1112)、神経膠芽腫 (Lemke et al, 2012, Clin. Cancer Res. 18: 105-117)、骨肉腫 (Wang et al, 2013, PLoS One 8:e70689)、膵臓がん (Yamato et al, 2009, Br. J. Cancer 101: 1709-1716)、および神経芽腫 (Gregorio et al, 2008, Histopathology 53:73-80)における不良な患者の生存と関連していた。

【0081】

ヒトB7H3 (4ig)の例示的な配列を、以下に示す。

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPGPGFSL
AQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQVRVADEGSF
TCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQD
GQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQ
RSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCFSFSPGPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEG
RDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPY
SKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLF
DVHSLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIAL
LVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSKEDDGQIEA

(SEQ ID NO: 190、シグナル配列に下線を付与)

【0082】

場合によっては、提供されるB7H3結合ポリペプチドは、B7H3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。

【0083】

多様なB7H3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、B7H3結合ポリペプチドには、B7H3 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。

【0084】

いくつかの態様において、提供されるB7H3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、B7H3-Fcなどの本明細書で提供されるB7H3結合ポリペプチドは、B7H3発現腫瘍細胞に結合することができ、B7H3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、B7H3 VHH-Fcなどの本明細書で提供されるB7H3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、B7H3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B7H3 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させるサイトカイン (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、B7H3 VHH-FcなどのB7H3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。

【0085】

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、B7H3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B7H3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、B7H3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。

【0086】

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。

【0087】

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) ANTI BODIES, 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, Humana 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. DeVita 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。

【0088】

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。

【0089】

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、単数形用語は複数を含むものとし、複数形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。

【0090】

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

【0091】

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。

【0092】

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

【0093】

「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。

【0094】

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

【0095】

「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、最小の長さには限定されない。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

【0096】

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

50

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

【0097】

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

【0098】

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。

【0099】

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、B7H3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B7H3エピトープまたは非B7H3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

【0100】

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)

50

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10
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。

【0101】

「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。

【0102】

「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。

【0103】

「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。

【0104】

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、それらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0105】

「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

【0106】

「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分を含む、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。

【0107】

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

【0108】

「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

【0109】

「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

【0110】

本明細書において用いられる場合、B7H3結合ポリペプチドとは、B7H3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B7H3結合ポリペプチドは、B7H3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。B7H3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。B7H3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、B7H3結合ポリペプチドは、各々がB7H3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、B7H3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、B7H3結合ポリペプチドは多重特異性である。場合によっては、B7H3結合ポリペプチドは、B7H3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

【0111】

「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

【0112】

「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

【0113】

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

50

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、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。

【0114】

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。

【0115】

（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

【0116】

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。

【0117】

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。

【0118】

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。

10

【0119】

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、CH1、ヒンジ、CH2、およびCH3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 μ 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、 α 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、 ϵ 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。

20

30

【0120】

本明細書において用いられる「Fc領域」とは、CH2およびCH3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、CH2、およびCH3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。

【0121】

「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。

40

【0122】

「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

50

);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。

【0123】

「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

【0124】

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。

20

【0125】

「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、Fc R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、Fc RI、Fc RII、およびFc RIIISub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。Fc RII受容体には、Fc RIIA(「活性化受容体」)およびFc RIIB(「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Fc RIIA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Fc RIIB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)。

30

40

【0126】

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(VH)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来するアクセプターヒトフレームワークは、そ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

50

、アミノ酸変化の数は、VHH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。

【0127】

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

【0128】

「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

【0129】

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。

【0130】

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

【0131】

「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。

【0132】

「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

【0133】

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

50

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しも表さない。

【0134】

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。 10

【0135】

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。 20

【0136】

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。 30

【0137】

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。

【0138】

(表2)

40

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 3 9 】

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 0 】

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 1 】

「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 4 2 】

「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

50

胞には、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。

【0143】

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

【0144】

「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リ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

【0145】

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

【0146】

「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。

【0147】

「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

40

50

ん；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；巨大腫瘍病変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

【0148】

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。

【0149】

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

【0150】

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

【0151】

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。

【0152】

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」、「処置

50

」、「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つまたは複数が含まれるが、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つまたは複数を図る。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

【0153】

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) の統計的に有意な増加。

【0154】

「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

【0155】

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。

【0156】

「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

【0157】

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

【0158】

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

50

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「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のではなく、測定されている期間にわたるだけである。

【0159】

「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。

10

【0160】

「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。

【0161】

「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。

【0162】

「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。

20

30

【0163】

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。

【0164】

「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。

40

【0165】

「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

50

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、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。

【0166】

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。

【0167】

「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

【0168】

「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。

【0169】

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。

【0170】

「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

【0171】

「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。

【0172】

「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

50

【0173】

II. B7H3に結合するVHHドメイン

B7H3に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B7H3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、VHHドメインは、ヒトB7H3に結合する。提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、VHHドメインは、SEQ ID NO: 190に示される配列、またはシグナル配列を欠如しているその成熟型を有するB7H3に結合する。いくつかの態様において、VHHドメインは、4IgB7H3を結合するかまたは認識する。いくつかの態様において、VHHドメインは、2IgB7H3を結合するかまたは認識する。いくつかの態様において、VHHドメインは、4IgB7H3および2IgB7H3を結合するかまたは認識する。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、B7H3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。

【0174】

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。

【0175】

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ャ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。

【0176】

B7H3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。

【0177】

本明細書で提供される、提供されるVHHドメインの中には、B7H3 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る。

【0178】

いくつかの態様において、B7H3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。

【0179】

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. US A* 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。

【0180】

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。

【0181】

VHHドメインが、SEQ ID NO: 1~114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: 1~114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%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、B7H3に結合するVHHドメインが、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B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 115~145のいずれか1つに示されるCDR1、SEQ ID NO: 146~167のいずれか1つに示されるCDR2、およびSEQ ID NO: 168~189のいずれか1つに示されるCDR3を含有する。提供されるB7H3 VHHドメインの中には、SEQ ID NO: 1~114のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 1~114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%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 1~114のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0182】

10

20

30

40

50

VHHドメインが、SEQ ID NO : 1 ~ 114、466、467、489、もしくは490、492 ~ 518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 : 1 ~ 114、466、467、489、もしくは490、492 ~ 518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%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、B7H3に結合するVHHドメインが、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B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 115 ~ 145のいずれか1つに示されるCDR1、SEQ ID NO : 146 ~ 167のいずれか1つに示されるCDR2、およびSEQ ID NO : 168 ~ 189または483 ~ 488のいずれか1つに示されるCDR3を含有する。提供されるB7H3 VHHドメインの中には、SEQ ID NO : 1 ~ 114、466、467、489、もしくは490、492 ~ 518のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 1 ~ 114、466、467、489、もしくは490、492 ~ 518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%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 1 ~ 114、466、467、489、または490、492 ~ 518のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

10

【0183】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 1に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO : 1に示される、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、CDR3を含有する。いくつかの態様において、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 1に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 1に示される、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%、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、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 1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

【0184】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 115、116、117、118、119、120、121、または122のいずれか1つに示されるCDR1、SEQ ID NO : 146、147、148、149、150、151のいずれか1つに示されるCDR2、およびSEQ ID NO : 168に示されるCDR3を含有する。

30

【0185】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 115、146、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 116、146、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 117、146、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 118、146、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 119、146、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 120、146、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 115、147、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHH

40

50

Hドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、148、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、149、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、150、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 115、151、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 116、147、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 118、147、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 119、147、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 116、151、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 121、147、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 119、149、および168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、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 122、151、および168のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

10

20

30

40

50

【0186】

いくつかの局面において、B7H3に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO: 2~34、467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: 2~34、467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%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

【0187】

いくつかの局面において、B7H3に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO: 2~34、467、489~490、および492~497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: 2~34、467、489~490、および492~497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%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

【0188】

場合によっては、提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 2~34、467のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 2~34、467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、B7H3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO: 2~34、467のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0189】

場合によっては、提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 2~34、467、489~490、および492~497のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 2~34、467、489~490、および492~497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。

ある。いくつかの態様において、B7H3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO : 2 ~ 34、467、489、および490のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0190】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 35に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO : 35に示される、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、CDR3を含有する。いくつかの態様において、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 35に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 35に示される、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%、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、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 35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。

10

【0191】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 123に示されるCDR1、SEQ ID NO : 152または153に示されるCDR2、およびSEQ ID NO : 170または171に示されるCDR3を含有する。

【0192】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 123、152、および170のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 123、153、および170のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 123、153、および171のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

20

【0193】

いくつかの局面において、B7H3に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO : 36 ~ 43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 : 36 ~ 43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%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

30

【0194】

いくつかの局面において、B7H3に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO : 36 ~ 43および498 ~ 503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 : 36 ~ 43および498 ~ 503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%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

【0195】

場合によっては、提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 36 ~ 43のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 36 ~ 43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、B7H3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO : 36 ~ 43のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

40

【0196】

場合によっては、提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 36 ~ 43および498 ~ 503のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 36 ~ 43および498 ~ 503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、B7H3ヒ

50

ト化VHHドメインは、SEQ ID NO : 36 ~ 43および498 ~ 503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、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 44に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO : 44に示される、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、CDR3を含有する。いくつかの態様において、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 44に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 44に示される、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%、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、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 44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。

10

【0198】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 124、125、126、127、128、129、130、131、132、133のいずれか1つに示されるCDR1、SEQ ID NO : 154に示されるCDR2、およびSEQ ID NO : 172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、または183のいずれか1つに示されるCDR3を含有する。

【0199】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、172のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、173のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、174のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、175のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 125、154、173のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 126、154、173のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 127、154、173のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 128、154、173のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 129、154、173のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 130、154、173のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 131、154、173のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、176のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、177のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、178のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本

20

30

40

50

明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、179のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、180のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、181のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、182のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 124、154、183のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 126、154、176のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 126、154、179のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 126、154、182のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 132、154、176のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO : 133、154、173のいずれか1つに示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

10

20

【0200】

いくつかの局面において、B7H3に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO : 45 ~ 91、466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 : 45 ~ 91、466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%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

【0201】

いくつかの局面において、B7H3に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO : 45 ~ 91、466、および504 ~ 514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 : 45 ~ 91、466、および504 ~ 514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%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

30

【0202】

場合によっては、提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 45 ~ 91、466のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 45 ~ 91、466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、B7H3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO : 45 ~ 91、466のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

40

【0203】

場合によっては、提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 45 ~ 91、466、および504 ~ 514のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 45 ~ 91、466、および504 ~ 514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、B7H3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO : 45 ~ 91、466、および504 ~ 514のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0204】

50

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 105に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO : 105に示される、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、CDR3を含有する。いくつかの態様において、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 105に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 105に示される、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%、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、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 105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。

10

【0205】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 145に示されるCDR1、SEQ ID NO : 167に示されるCDR2、およびSEQ ID NO : 195に示されるCDR3を含有する。

【0206】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 145に示されるCDR1、SEQ ID NO : 167に示されるCDR2、およびSEQ ID NO : 488に示されるCDR3を含有する。

【0207】

いくつかの局面において、B7H3に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO : 106~109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 : 106~109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%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

20

【0208】

場合によっては、提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 106~109のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 106~109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、B7H3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO : 106~109のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

30

【0209】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 110に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO : 110に示される、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、CDR3を含有する。いくつかの態様において、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 110に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 110に示される、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%、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、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 110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

【0210】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 131に示されるCDR1、SEQ ID NO : 169に示されるCDR2、およびSEQ ID NO : 189に示されるCDR3を含有する。

【0211】

いくつかの態様において、本明細書で提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO : 131に示されるCDR1、SEQ ID NO : 161に示されるCDR2、およびSEQ ID NO : 189に示されるCDR3を含有する。

50

【0212】

いくつかの局面において、B7H3に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO: 111~114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: 111~114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%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

【0213】

いくつかの局面において、B7H3に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO: 111~114および515~528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: 111~114および515~518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%の配列同一性を有するアミノ酸配列に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

【0214】

場合によっては、提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 111~114のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 111~114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、B7H3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO: 111~114のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0215】

場合によっては、提供されるB7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 111~114および515~518のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 111~114および515~518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、B7H3ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO: 111~114および515~518のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0216】

III. B7H3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に直接または間接的に連結された、B7H3に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、B7H3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、本明細書において提供される。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、1つよりも多い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B7H3結合ポリペプチドは、B7H3に特異的に結合する少なくとも1つのVHHドメインを組み込む。いくつかの局面において、B7H3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、B7H3結合ポリペプチドは、B7H3に特異的に結合するVHHドメインの2つ以上のコピー、例えば、B7H3に特異的に結合するVHHドメインの3つ以上、4つ以上、5つ以上、または6つ以上のコピーを含む。ある特定の局面において、B7H3結合ポリペプチドは多重特異性である。例えば、場合によっては、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に結合する、1つまたは複数の追加の結合ドメインであってもよい。

【0217】

いくつかの態様において、本開示のB7H3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ている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、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。いくつかの態様において、GSリンカーは、GGSGGS、すなわち、
(GGG)₂ (SEQ ID NO:191); GGSGGSGGS,すなわち,(GGG)₃ (SEQ ID NO:192);
GGSGGSGGSGGS,すなわち,(GGG)₄ (SEQ ID NO:193); および GGSGGSGGSGGSGGS,すなわち,(GGG)₅ (SEQ ID
NO:194)

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:195), GGGGG (SEQ ID NO:196), および GGGGGG (SEQ ID NO: 197)

10

などの、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、(GGGGG)_nであり、nは1～5であり (SEQ ID NO: 313) ; (GGGGG)_nであり、
nは1～4であり (SEQ ID NO: 314) ;
GGGGG (SEQ ID NO:315); GGGGG
(SEQ ID NO:316); GGGGGSGGGGSGGGGG (SEQ ID NO:317); GGGGGSGGGGSGGGGG (SEQ
ID NO:318);または GGSGGGGSGGGGSGGGGG (SEQ ID NO:319)

である。いくつかの態様において、B7H3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。

20

【0218】

A. Fc融合物

本明細書で提供されるB7H3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B7H3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B7H3結合ポリペプチドは、B7
H3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。

【0219】

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、B7H3結合部位の数を二倍にする二量体が形成
されるように、生理的条件下で、例えば、細胞から発現した時に、B7H3結合ポリペプチド
の二量体化を媒介する。例えば、B7H3に結合する3つのVHHドメインとFc領域とを含
むB7H3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、B7H3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、B7H3 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B7H3 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B7H3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B7H3 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B7H3 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B7H3 VHHドメインを有する六価である。

30

40

【0220】

いくつかの態様において、多価B7H3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B7H3結合ポリペプチドは、2コピーの、以下の構造：(B7H3 VHH)-
リンカー-Fcを有するB7H3結合ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、多
価B7H3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B7H3
結合ポリペプチドは、2コピーの、以下の構造：(B7H3 VHH)-リンカー-(B7H3 VHH)-
リンカー-Fcを有するB7H3-ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、多価B7H
3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B7H3結合ポ
リペプチドは、2コピーの、以下の構造：(B7H3 VHH)-リンカー-(B7H3 VHH)-リン
カー-(B7H3 VHH)-リンカー-Fcを有するB7H3結合ポリペプチドを含む。

50

【0221】

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。

【0222】

提供される態様のいずれかにおいて、B7H3 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、B7H3 VHHドメインは、B7H3に結合するヒト化VHHドメインである。

10

【0223】

様々な態様において、B7H3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。

【0224】

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。

20

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT
KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 198)

【0225】

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: 198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

30

【0226】

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 ImMunoGeneTics 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。

40

【0227】

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、B7H3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

50

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 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ACTI（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）。

【0228】

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。

【0229】

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、Lys326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。

【0230】

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、L

eu234Ala (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。

【0231】

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

【0232】

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)。例えば、B7H3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

10

20

30

40

50

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 PREPQVYTLF
PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV
DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 199)

10

【0233】

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: 199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。

【0234】

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）。

20

【0235】

いくつかの態様において、B7H3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。

30

【0236】

いくつかの態様において、B7H3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

40

50

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。 10

【0237】

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。

【0238】

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。 20

PAPPVAGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT
 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 200)

【0239】

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: 200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。 30

【0240】

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EUインデックス）。

【0241】

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。 40

PAPELLGGPS VFLFPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHED PEVQFKWYV DGVEVHNAKT
 KPREEQYNST FRVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKTK KGQPREPQVY
 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPPMLD SDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQ GNIFSCSVME EALHNRFQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 201)

【0242】

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: 201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 50

ヒトIgG3ポリペプチド配列を含む。

【0243】

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)。

【0244】

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。

PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT

KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY

TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR

LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 202)

10

【0245】

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: 202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。

20

【0246】

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 SSIEKTISKA KGQPREPQVY

TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR

LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 203)

30

【0247】

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: 203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。

【0248】

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 (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)。

40

【0249】

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: 204)

50

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: 205)を有する切断型ヒンジを含有する。

【0250】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、配列ESKYGPPCPPC (SEQ ID NO: 206)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。

10

【0251】

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、例えばカスチ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。

【0252】

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: 207)またはGQGTLVTVPEPGG (SEQ ID NO: 208)

20

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「GG」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。

【0253】

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。

30

【0254】

いくつかの態様において、GSリンカーは、GGSGGS、すなわち、(GGS)₂ (SEQ ID NO: 191); GGSGSGGS,すなわち,(GGG)₃ (SEQ ID NO: 192); GGSGSGSGGS,すなわち,(GGG)₄ (SEQ ID NO: 193);およびGGSGSGSGSGGS,すなわち,(GGG)₅ (SEQ ID NO: 194)

40

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: 195), GGGGG (SEQ ID NO: 196), および GGGGGG (SEQ ID NO: 197)

などの、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、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。

【0255】

B. コンジュゲート

本明細書において提供されるB7H3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

50

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。

【0256】

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B7H3 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。

【0257】

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B7H3 VHHドメインを含むB7H3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、B7H3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）、サポリン、リシン、リシンA鎖、ブリオジン（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、B7H3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。

【0258】

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B7H3 VHHドメインを含むB7H3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。

【0259】

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B7H3 VHHドメインを含むB7H3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

10

20

30

40

50

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 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I ；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、 ^{99}Tc もしくは ^{123}I 、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）。

10

【0260】

B7H3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。

【0261】

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、B7H3 VHHドメインにコンジュゲート、連結または融合され、B7H3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。

20

【0262】

いくつかの態様において、B7H3 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、B7H3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B7H3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以上であり；結果として生じるB7H3結合コンジュゲートはB7H3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。

30

【0263】

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）。

40

【0264】

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

50

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。

【0265】

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。

10

【0266】

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。

20

【0267】

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。

【0268】

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)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。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。

30

40

【0269】

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

50

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しすることができる。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。

【0270】

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、およびアリールヒドラジド基が含まれる。

【0271】

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。

【0272】

C. 多重特異性形式

本明細書において、B7H3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B7H3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、B7H3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。

【0273】

いくつかの態様において、多重特異性B7H3結合ポリペプチドは、B7H3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強めるまたは弱めるのに関与する。

【0274】

いくつかの場合において、多重特異性B7H3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B7H3結合ポリペプチドは、B7H3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、B7H3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B7H3結合ポリペプチドの二量体化を媒介する。

【0275】

非限定的で例示的な多重特異性B7H3結合ポリペプチドを以下に説明する。

【0276】

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、B7H3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B7H3 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

10

20

30

40

50

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B7H3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B7H3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。

【0277】

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B7H3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、B7H3結合ポリペプチドは、B7H3に特異的に結合する少なくとも1つのB7H3 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。

【0278】

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體（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、本明細書において提供されるB7H3 VHHドメインのいずれかを用いて作製することができる。

【0279】

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。

【0280】

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 、 δ 、および ϵ （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、C

D3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。

【0281】

いくつかの場合において、CD3結合ドメインはCD3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への結合について一価である。

10

【0282】

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。

20

30

【0283】

いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO: 209に記載の可変重(VH)鎖および/もしくはSEQ ID NO: 210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: 209に記載の可変重(VH)鎖のCDRH1、CDRH2、およびCDRH3、ならびにSEQ ID NO: 210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: 209に記載のVH配列のヒト化バージョンおよびSEQ ID NO: 210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: 211; 212; 213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: 214、215、216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

40

50

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: 211、212、または213のいずれかに記載のVH配列とSEQ ID NO: 214、215、または216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。

【0284】

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: 219) を含むVH CDR1配列；
少なくともアミノ酸配列
RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 220)

10

を含むVH CDR2配列；
少なくともアミノ酸配列
HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 221)

を含むVH CDR3配列；
少なくともアミノ酸配列
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 222)

を含むVL CDR1配列；
少なくともアミノ酸配列 GTNKRAP (SEQ ID NO: 223) を含むVL CDR2配列；および 20
少なくともアミノ酸配列 ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 224) 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: 219) を含むVH CDR1配列；
少なくともアミノ酸配列
RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 220)

を含むVH CDR2配列；
少なくともアミノ酸配列
HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 221)

30

を含むVH CDR3配列；
少なくともアミノ酸配列
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 222)

を含むVL CDR1配列；
少なくともアミノ酸配列 GTNKRAP (SEQ ID NO: 223) 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: 224) 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。

【0285】

いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO: 217に記載の可変重(VH)鎖および/もしくはSEQ ID NO: 218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: 217に記載の可変重(VH)鎖のCDRH1、CDRH2、およびCDRH3、ならびにSEQ ID NO: 218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: 219、220、および221それぞれに記載のCDRH1、CDRH2、およびCDRH3、ならびにSEQ ID NO: 222、223、および224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: 217に記載のVH配列のヒト化バージョンおよびSEQ ID NO: 218に記載のVL配列の 40 50

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: 225 ~ 255、460、462、もしくは480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: 256 ~ 274、417、459、もしくは461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: 237のアミノ酸配列を含む可変重鎖(Hv)およびSEQ ID NO: 265のアミノ酸配列を含む可変軽鎖(Lv)を含む。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: 225 ~ 255、460、462、または480のいずれかに記載のVH配列とSEQ ID NO: 256 ~ 274、417、459、または461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: 237のアミノ酸配列を含む可変重鎖(Hv)およびSEQ ID NO: 265のアミノ酸配列を含む可変軽鎖(Lv)がその中に含まれている、Fab、scFv、Fv、またはdsFvである。

【0286】

いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO: 537、538、541、または542のいずれか1つに記載の可変重(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: 539、540、543、または544のいずれか1つに記載の可変軽(VL)鎖を含む。

【0287】

提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つのB7H3 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。

【0288】

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B7H3 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、B7H3 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)。

【0289】

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B7H3 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み得る。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、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、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領域またはそのパリアント、例えば、ヒトIgG1 Fc領域またはそのパリアントであり得る。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。

【0290】

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: 275に記載の抗CD3 VHH、またはSEQ ID NO: 275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B7H3 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。

10

【0291】

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、ペプチドリリンカー）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、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。

【0292】

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: 293、297、305、307、445、または451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: 294、298、301、303、309、311、446、449、または453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: 295、299、306、308、447、または452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: 296、300、302、304、310、312、448、450、または454のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含む。

20

30

【0293】

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、B7H3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B7H3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B7H3 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。

40

【0294】

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）B7H3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

50

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。

【0295】

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。

10

【0296】

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。

20

30

【0297】

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B7H3 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B7H3 VHHドメインは、多重特異性ポリペプチド構築物のカルボキシ末端（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B7H3 VHHドメインを含む。

40

【0298】

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

50

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。

【0299】

特定の態様において、Fvは、VH-VL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および/またはVL鎖のフレームワーク位置中の位置の変異によって操作される。いくつかの態様において、VH鎖は変異G44Cを含み、VL鎖は変異G100Cを含み、これらはそれぞれkabatナンバリングによる。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ナンバリングによる、105位でCysへの変異を有する抗CD3 VHおよび43位でCysへの変異を有する抗CD3 VLを含む。

10

【0300】

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、B7H3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、B7H3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B7H3 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B7H3 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B7H3 VHHドメインは、CD3結合領域の鎖のC末端に位置する。

20

【0301】

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

【0302】

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、B7H3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B7H3 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B7H3 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

【0303】

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。

【0304】

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、B7H3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B7H3 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B7H3 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。

【0305】

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。

【0306】

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、B7H3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B7H3 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B7H3 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。

【0307】

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。

【0308】

a. B7H3 VHH抗原結合ドメイン

本開示の制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、本明細書において提供されるいずれかの中から少なくとも1つのB7H3 VHHドメインを含む。いくつかの態様において、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 1~114、466、467のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含む。

【0309】

本開示の制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、本明細書において提供されるいずれかの中から少なくとも1つのB7H3 VHHドメインを含む。いくつかの態様において、B7H3 VHHドメインは、SEQ ID NO: 1~114、466、467、489、490、または492~518のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含む。

10

20

30

40

50

【0310】

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少なくとも2つのB7H3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B7H3 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づけられ、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインは、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られる。

【0311】

少なくとも2つのB7H3 VHHドメインを含むかまたは2つのB7H3 VHHドメインを含む制約付き多重特異性ポリペプチド構築物の局面において、B7H3 VHHドメインのそれぞれは、B7H3上の同じまたは重複するエピトープに結合することができる。

10

【0312】

少なくとも2つのB7H3 VHHドメインを含むかまたは2つのB7H3 VHHドメインを含む制約付き多重特異性ポリペプチド構築物の局面において、B7H3 VHHドメインのそれぞれは、B7H3上の異なるまたは重複しないエピトープに結合することができる。

【0313】

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: 67およびSEQ ID NO: 43に記載の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: 67およびSEQ ID NO: 503に記載の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: 67およびSEQ ID NO: 67に記載の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: 67およびSEQ ID NO: 1に記載の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: 67およびSEQ ID NO: 8に記載の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: 467およびSEQ ID NO: 466に記載の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: 467およびSEQ ID NO: 85に記載のアミノ酸配列を含む。

20

【0314】

いくつかの態様において、抗原結合ドメイン、例えばB7H3 VHHドメインは、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、連結ペプチド(LP)であり、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。いくつかの態様において、リンカーは、GGSGGS、すなわち、(GGG)₂ (SEQ ID NO: 191); GGSGSGGS,すなわち、(GGG)₃ (SEQ ID NO: 192); GGSGSGSGGS,すなわち、(GGG)₄ (SEQ ID NO: 193); および GGSGSGSGSGSGGS,すなわち、(GGG)₅ (SEQ ID NO: 194)

30

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、グリシン残基、例えば、非限定的例として、GG, GGG, GGGG (SEQ ID NO: 195), GGGGG (SEQ ID NO: 196), および GGGGGG (SEQ ID NO: 197)

40

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、GSリンカーとグリシンリンカーとの組み合わせを含む。

【0315】

b. Fc領域

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

50

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。

【0316】

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。

【0317】

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, 3:54 6-57; 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 (Gunasekaran 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。

【0318】

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。

【0319】

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。

【0320】

(表3) ヘテロ二量体Fcの対を形成するアミノ酸

10

20

30

40

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

10

【0321】

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。

【0322】

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。

20

30

【0323】

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。

40

【0324】

ヒトIgG1のCH3界面は、例えば、各表面から1090 Åを埋める4つの逆平行 β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

50

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。

【0325】

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)。

10

【0326】

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: 445または451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: 446、449、または453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: 293、297、305、または307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: 294、298、301、303、309、または311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。

20

【0327】

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: 445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: 446または449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: 293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: 294または301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: 297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: 298または303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。

30

【0328】

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: 447または452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: 448、450、または454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: 295、299、306、または308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: 296、300、302、304、310、または312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。

40

50

【0329】

特定の例において、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：448または450であるかまたはそれを含み。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：295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：296または302に記載の配列であるかまたはそれを含み。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：299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：300または304に記載の配列であるかまたはそれを含み。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。

10

【0330】

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：451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：453に記載の配列であるかまたはそれを含み。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：305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：309に記載の配列であるかまたはそれを含み。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：307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：311に記載の配列であるかまたはそれを含み。他の例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO：452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：454に記載の配列であるかまたはそれを含み。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：306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：310に記載の配列であるかまたはそれを含み。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：308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：312に記載の配列であるかまたはそれを含み。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。

20

【0331】

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。

30

【0332】

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

40

50

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。

【0333】

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、一方がより塩基性に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。

【0334】

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。

【0335】

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：457および458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。

【0336】

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。

【0337】

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。

【0338】

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、T336W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。

10

【0339】

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。

20

【0340】

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。

【0341】

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/L235A/G236del/S239K/A327G、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G、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。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: 445(例えば、SEQ ID NO: 293または297)、451(例えば、SEQ ID NO: 305または307)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: 446(例えば、SEQ ID NO: 294または298)、449(例えば、SEQ ID NO: 301または303)、453(例えば、SEQ ID NO: 309または311)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: 447(例えば、SEQ ID NO: 295または299)、452(例えば、SEQ ID NO: 306または308)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: 448(例えば、SEQ ID NO: 296または300)、450(例えば、SEQ ID NO: 302または304)、454(例えば、SEQ ID NO: 310または312)のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含む。

30

40

【0342】

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

50

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 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；ならびに標的特定のエフェクター機能を示し得るB7H3 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。

10

【0343】

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。

【0344】

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：198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：457および458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。

20

30

【0345】

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。

40

【0346】

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

50

ンは、CD3への結合について一価である。

【0347】

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。

【0348】

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（WO2015001085）である。

【0349】

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または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：219）を含むVH CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列

RIRSKYNNYATYYADSVKD（SEQ ID NO: 220）

10

20

を含むVH CDR2配列；

少なくともアミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY（SEQ ID NO: 221）

を含むVH CDR3配列；

少なくともアミノ酸配列

RSSTGAVTTSNYAN（SEQ ID NO: 222）

を含むVL CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列GTNKRAP（SEQ ID NO：223）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：224）を含むVL CDR3配列

が含まれる、FvまたはdsFv断片である。

【0350】

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：219）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

RIRSKYNNYATYYADSVKD（SEQ ID NO: 220）

30

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VH CDR2配列；

アミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY（SEQ ID NO: 221）

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: 222）

50

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: 223) 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: 224) 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。

【0351】

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: 471) を含むVH CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 472) を含むVH CDR2配列；

少なくともアミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 221)

を含むVH CDR3配列；

少なくともアミノ酸配列

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 19)

を含むVL CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 20) 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: 21) を含むVL CDR3配列

を含む。

【0352】

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: 471) を含むVH CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 472) を含むVH CDR2配列；

少なくともアミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 221)

を含むVH CDR3配列；

少なくともアミノ酸配列

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 222)

を含むVL CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 223) 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: 224) を含むVL CDR3配列

を含む。

【0353】

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: 471) 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: 472) 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: 221)

10

20

30

40

50

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: 222)

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: 223) 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: 224) 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。

【0354】

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: 471) を含むVH CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 472) を含むVH CDR2配列；

少なくともアミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 221)

を含むVH CDR3配列；

少なくともアミノ酸配列

GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 478)

を含むVL CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 479) を含むVL CDR2配列；および

少なくともアミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 474) を含むVL CDR3配列

を含む。

【0355】

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: 471) を含むVH CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 472) を含むVH CDR2配列；

少なくともアミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 221)

を含むVH CDR3配列；

少なくともアミノ酸配列

GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 478)

を含むVL CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 223) を含むVL CDR2配列；および

少なくともアミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 474) を含むVL CDR3配列

を含む。

【0356】

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: 471) 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: 472) に対して少なくとも90%、91%

10

20

30

40

50

、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: 221)

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: 478)

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: 223) 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: 474) 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。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: 471) 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；

20

アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 472) 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: 221)

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；

30

アミノ酸配列

GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 478)

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: 479) 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: 474) 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

40

を含む。

【0357】

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GFTFSTYAMN (SEQ ID NO: 476) を含むVH CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 477) を含むVH CDR2配列；

少なくともアミノ酸配列

HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 473)

を含むVH CDR3配列；

50

少なくともアミノ酸配列
GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 478)

を含むVL CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 223) を含むVL CDR2配列；および
少なくともアミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 474) を含むVL CDR3配列
を含む。

【0358】

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: 476) 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: 477) 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: 473)

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: 478)

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: 223) 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；

アミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 474) 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。

【0359】

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VLWYSNRW
V (SEQ ID NO: 475) 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: 475) 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。

【0360】

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。

【0361】

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。

【0362】

10

20

30

40

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。

【0363】

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: 225~274、417、および459~462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: 225~255、460、および462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: 256~274、417、459、および461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

【0364】

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: 217、218、225~274、417、459~462、および480の群から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: 217、225~255、460、462、および480の群から選択される重鎖可変領域アミノ酸配列とSEQ ID NO: 218、256~274、417、459、および461の群から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。

20

【0365】

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: 225~274、417、および459~462の群から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: 225~274、417、および459~462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。

30

【0366】

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: 217、218、225~274、417、459~462、および480の群から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: 217、218、225~274、417、459~462、および480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。

40

【0367】

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: 225~255、460、および462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およびSEQ ID NO: 256~274、417、459、および461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%、9

50

3%、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を含むFv、例えば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: 225~255、460、および462の群から選択される重鎖可変領域アミノ酸配列とSEQ ID NO: 256~274、417、459、および461の群から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。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: 225~255、460、および462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: 256~274、417、459、および461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。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインは、SEQ ID NO: 237のアミノ酸配列を含む可変重鎖(VH)およびSEQ ID NO: 265のアミノ酸配列を含む可変軽鎖(VL)がその中に含まれるFv、例えば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: 237のアミノ酸配列を含む可変重鎖(VH)およびSEQ ID NO: 417のアミノ酸配列を含む可変軽鎖(VL)がその中に含まれるFv、例えばdsFvである。

10

【0368】

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: 217、225~255、460、462、および480の群から選択される重鎖可変アミノ酸配列とSEQ ID NO: 218、256~274、417、459、および461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: 217、225~255、460、462、および480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: 218、256~274、417、459、および461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

【0369】

いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO: 217、225~236、238~240、460、および241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: 218、256、258~264、266、268、270、および461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: 217、225~236、238~240、460、および241の群から選択される重鎖可変アミノ酸配列とSEQ ID NO: 218、256、258~264、266、268、270、459、および461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。

30

【0370】

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: 217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: 218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: 217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: 218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

40

50

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：217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：218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：217のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO：218のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

【0371】

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：461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：461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：461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：461のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

【0372】

特定の態様において、Fvは、VH-VL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および/またはVL鎖のフレームワーク位置中の位置の変異によって操作される。いくつかの態様において、ジスルフィド安定化抗CD3 Fvは、Kab atナンバリングによる、44でCysへの変異を有する抗CD3 VHおよび100でCysへの変異を有する抗CD3 VLを含む。例えば、いくつかの態様において、VH鎖は変異G44Cを含み、VL鎖は変異G100Cを含み、それぞれはkab atナンバリングによる。いくつかの態様において、ジスルフィド安定化抗CD3 Fvは、Kab atナンバリングによる、105位でCysへの変異を有する抗CD3 VHおよび43位でCysへの変異を有する抗CD3 VLを含む。

【0373】

いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO：237および242～255、および462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可変重鎖アミノ酸配列とSEQ ID NO：257、265、267、269、271～274、417、および459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可変軽鎖アミノ酸配列との組み合わせを含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、それぞれがkab atナンバリングによる、変異G44Cを含むVH鎖および変異G100Cを含む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：237および242～255、および462の群から選択される可変重鎖アミノ酸配列とSEQ ID NO：257、265、267、269、271～274、417、および459からなる群より選択される可変軽鎖アミノ酸配列の組み合わせを含む。

【0374】

いくつかの態様において、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO：237および242～255、462、および480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可変重鎖アミノ酸配列とSEQ ID NO：257、265、267、269、271～274、417、および459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可変軽鎖アミノ酸配列との組み合わせを含む。任意のそのような態様のいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、それぞれがkabatナンバリングによる、変異G44Cを含むVH鎖および変異G100Cを含む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：237および242～255、462、および480の群から選択される可変重鎖アミノ酸配列とSEQ ID NO：257、265、267、269、271～274、417、および459からなる群より選択される可変軽鎖アミノ酸配列との組み合わせを含む。

10

【0375】

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：237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：265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：237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：265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。任意のそのような態様のいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、それぞれがkabatナンバリングによる、変異G44Cを含むVH鎖および変異G100Cを含む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：237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：265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：237のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO：265のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

20

30

【0376】

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：462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：459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：462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：459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。任意のそのような態様のいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、それぞれがkabatナンバリングによる、変異G44Cを含むVH鎖および変異G100Cを含む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：462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：459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：462のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO：459のアミノ酸配列

40

50

を含む可変軽鎖（VL）を含む。

【0377】

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：480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：459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：480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：459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。任意のそのような態様のいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、それぞれがkabatナンバリングによる、変異G44Cを含むVH鎖および変異G100Cを含む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：480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：459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：480のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO：459のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

【0378】

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。

【0379】

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）。

【0380】

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され、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。

10

20

30

40

50

【0381】

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。

【0382】

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%(ペプチドリンカー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、適切なペプチドリンカーは典型的には、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、ペプチドリンカーはグリシン残基のみを含む。いくつかの態様において、ペプチドリンカーはグリシンおよびセリン残基のみを含む。

【0383】

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: 491)である。特定の態様において、リンカーは配列(GGGGS)_n(SEQ ID NO: 313)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: 314)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、GGGS、および/またはGGGGGSリンカーの繰り返しが含まれてもよい。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。

10

【0384】

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、GGGS(SEQ ID NO: 315)、またはGGGGGS(SEQ ID NO: 316)である。いくつかの態様において、GSリンカーは、GSGSGSのアミノ酸配列、すなわち、(GGS)₂(SEQ ID NO: 191); GSGSGSGS, すなわち、(GGS)₃(SEQ ID NO: 192); GSGSGSGSGS, すなわち、(GGS)₄(SEQ ID NO: 193); GSGSGSGSGSGS, すなわち、(GGS)₅(SEQ ID NO: 194); GGGGSGSGGGSGSGSGS, すなわち、(G5S)₃(SEQ ID NO: 317), GSGGGSGSGGGSGSGSGS(SEQ ID NO: 319)およびGGGGSGGGSGGGSGS(SEQ ID NO: 318)

20

を含む。いくつかの態様において、リンカーはGGGGG(SEQ ID NO: 196)である。いくつかの態様において、リンカーはPGGGG(SEQ ID NO: 444)である。いくつかの態様において、リンカーはGGGG(SEQ ID NO: 195)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))。

30

【0385】

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: 320)を有するペプチドリンカーを含み、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。特定の变化形において、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Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly(SEQ ID NO: 321)

40

を有するペプチドリンカーがもたらされ、各Xaaは上記のように選択される)。

【0386】

いくつかの態様において、リンカーは、(SSSSG)_n(SEQ ID NO: 322)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、n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。

【0387】

50

いくつかの場合において、ペプチドリンカー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、ペプチドリンカー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、ペプチドリンカー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、ペプチドリンカーは、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、ペプチドリンカーはプロリン残基のみを含む。

【0388】

いくつかの局面において、ペプチドリンカーは、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。典型的には、ペプチドリンカー当たり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ンカーが挙げられ、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ンカーは、アミノ酸配列GGGG-C-GGGGG（SEQ ID NO:323）を有する。

【0389】

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:545、ここでnは2~20である）、（ADAAP）_n-G（SEQ ID NO:546、ここでnは2~20である）、（GEPQG）_n（SEQ ID NO:547、ここでnは2~20である）、（GEPQG）_n-G（SEQ ID NO:548、ここでnは2~20である）、（AGGEP）_n（SEQ ID NO:549、ここでnは2~20である）、（AGGEP）_n-G（SEQ ID NO:550、ここでnは2~20である）、（AGSEP）_n（SEQ ID NO:551、ここでnは2~20である）、（AGSEP）_n-G（SEQ ID NO:552、ここでnは2~20である）、（GGGEQ）_n（SEQ ID NO:553、ここでnは2~20である）、（GGGEQ）_n-G（SEQ ID NO:554、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:555）、GEPQGGEPQGG（SEQ ID NO:556）、AGGEPAGGEPG（SEQ ID NO:557）、AGSEPAGSEPG（SEQ ID NO:558）、またはGGGEQGGGEQG（SEQ ID NO:559）

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、インピ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。

【0390】

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。

10

【0391】

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。

20

【0392】

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。

30

【0393】

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。

40

【0394】

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

50

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。

【0395】

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。

【0396】

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。

【0397】

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；ネプリライシン；PSMA；BMP-1；MMP、例えば、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MM

10

20

30

40

50

P14、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、トロンピン、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。

【0398】

10

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。

【0399】

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。

【0400】

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。

20

30

【0401】

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: 334) 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: 335) 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。

40

【0402】

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: 336)、LEPD (SEQ ID NO: 337)、またはLEAE (SEQ ID NO: 338)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

50

IEPDI (SEQ ID NO:339), LEPDG (SEQ ID NO:340), LEADT (SEQ ID NO:341), IEPDG (SEQ ID NO:342), IEPDV (SEQ ID NO:343), IEPDS (SEQ ID NO:344), IEPDT (SEQ ID NO:345), IEPDP (SEQ ID NO:482), LEPDG (SEQ ID NO:340)またはLEADG (SEQ ID NO:334)を含む。

【 0 4 0 3 】

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: 346) 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: 347) 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: 348) 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: 349) を含む。

10

【 0 4 0 4 】

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: 350) 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: 351) 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: 352) を含む。

20

【 0 4 0 5 】

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: 336) とアミノ酸配列 RQAR (SEQ ID NO: 348) との組み合わせを含む。

【 0 4 0 6 】

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: 336) とアミノ酸配列 PAGL (SEQ ID NO: 352) との組み合わせを含む。

30

【 0 4 0 7 】

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: 348) とアミノ酸配列 PAGL (SEQ ID NO: 352) との組み合わせを含む。

【 0 4 0 8 】

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: 336) と、アミノ酸配列 RQAR (SEQ ID NO: 348) と、アミノ酸配列 PAGL (SEQ ID NO: 352) との組み合わせを含む。

40

【 0 4 0 9 】

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US20160194399号；同第US20150079088号；同第US20170204139号；同第US201602893

50

24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。

【0410】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、
TGLEADGSPAGLGRQARVG (SEQ ID NO: 353);

TGLEADGSRQARVG PAGLG (SEQ ID NO: 354); TGSPAGLEADGSRQARVGS (SEQ ID NO: 355);
TGPAGLGLEADGSRQARVG (SEQ ID NO: 356); TGRQARVGLEADGSPAGLG (SEQ ID NO: 357);
TGSRQARVG PAGLEADGS (SEQ ID NO: 358); および TGPAGLGSRQARVGLEADGS (SEQ ID NO:
359); GPAGLGLEPDGSRQARVG (SEQ ID NO: 360); GGS GGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO: 361);
GGS GGGGLEADTGGSGGS (SEQ ID NO: 362); GSIEPDIGS (SEQ ID NO: 363); GSLEADTGS (SEQ
ID NO: 364); GGS GGGGIEPDGGSGGS (SEQ ID NO: 365); GGS GGGGIEPDVGGSGGS (SEQ ID
NO: 366); GGS GGGGIEPDGGSGGS (SEQ ID NO: 367); GGS GGGGIEPDTGGSGGS (SEQ ID NO:
368); GGS SLEPDGSGS (SEQ ID NO: 369); GPAGLGLEADGSRQARVG (SEQ ID NO: 370),
GGEGGGSGSGSGGS (SEQ ID NO: 371); GSSAGSEAGGSGQAGVGS (SEQ ID NO: 372);
GGS GGGGLEAEGSGSGGS (SEQ ID NO: 373); GGS GGGGIEPDGGSGGS (SEQ ID NO: 374);
TGGSGGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO: 375)

10

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0411】

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CRBR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) (操作されたりポカリン)、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。

30

【0412】

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。

40

【0413】

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、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。

【0414】

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

50

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。

【0415】

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。

【0416】

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）。

【0417】

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。

【0418】

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抗原結合ドメインまたはCRBR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

10

20

30

40

50

特異性ポリペプチド構築物は、共刺激受容体に結合する、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。

【0419】

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、B7H3 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

【0420】

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。

20

【0421】

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。

30

【0422】

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。

【0423】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、TAAに対する一価、二価、三価、または四価の結合をもたらす。いくつかの態様において、TAAに対する二価結合は、同じ抗原の同じエピトープに結合する2つの抗原結合ドメインを含む（例えば、モノエピトープ（mono-epitopic））。いくつかの態様において、TAAに対する二価結合は、同じ抗原の異なるエピトープに結合する2つの抗原結合ドメインを含む（例えば、バイエピトープ（bi-epitopic））。いくつかの態様において、TAAに対する一価結合は、抗原の1つのエピトープに結合する1つの抗原結合ドメインを含む（例えば、モノエピトープ）。

40

【0424】

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。

【0425】

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

50

体のB7ファミリーのメンバーである。

【0426】

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)、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。

【0427】

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。

【0428】

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。

【0429】

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。

【0430】

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。

【0431】

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

10

20

30

40

50

ン抗体である。いくつかの態様において、sdAbは、CDR1 GFSFSINAMG (SEQ ID NO: 468に記載される)、CDR2 AIESGRNTV (SEQ ID NO: 469に記載される)、およびCDR3 LKGNRVVSPSVAY (SEQ ID NO: 470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。

【0432】

CRBRの例示的な配列は表4に記載される。

【0433】

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: 376~400および481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: 376に記載の部分、またはSEQ ID NO: 392~399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: 383~391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: 468、469、および470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: 400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: 481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、41BB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: 377、379、および381のいずれかに記載のVH、ならびにSEQ ID NO: 378、380、または382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。

【0434】

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: 401~410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: 406および408のいずれかに記載のVH、ならびにSEQ ID NO: 407および409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。

【0435】

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 : 411 ~ 416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 : 412、414、289、および291のいずれかに記載のVH、ならびにSEQ ID NO : 413、415、290、292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。

10

【0436】

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 : 276 ~ 278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 : 277に記載のVHおよびSEQ ID NO : 278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。

20

【0437】

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 : 279に記載される。

30

【0438】

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 : 280に記載される。

40

【0439】

（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	376
PF-05082566	VH	US 2012/0237498 (SEQ ID NO: 43)	377
	VL	US 2012/0237498 (SEQ ID NO: 45)	378
BMS663513	VH	WO 2005/035584 (SEQ ID NO: 9)	379
	VL	WO 2005/035584 (SEQ ID NO: 6)	380
MSB7	VH	US 2017/0226215 (SEQ ID NO: 138)	381
	VL	US 2017/0226215 (SEQ ID NO: 28)	382
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 12)	383
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 13)	384
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 14)	385
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 15)	386
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 16)	387
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 17)	388
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 18)	389
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 19)	390
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 20)	391
ヒト41BBL の 71~254	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 3)	392

10

20

30

40

50

ヒト41BBL の 85-254	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 4)	393
ヒト41BBL の 80-254	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 5)	394
ヒト41BBL の 52-254	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 6)	395
ヒト41BBL の 71-248	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 7)	396
ヒト41BBL の 85-248	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 8)	397
ヒト41BBL の 80-248	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 9)	398
ヒト41BBL の 52-248	41BBリガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 10)	399
41BB sdAb	sdAb	US 2017/0198050	400
41BB sdAb	sdAb		481
OX40 結合 CRBR 配列			
OX40リガンド	天然リガンド	UniProt アクセション番号 P23510	401
OX40リガンド	天然リガンド	US 7,959,925 (SEQ ID NO: 2)	402
ヒトOX40L: 51-183	天然リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 11)	403
ヒトOx40L: 51-183 N90D	天然リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 12)	404
ヒトOx40L: 52-183	天然リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 13)	405
1A07	VH	US 2015/0307617 (SEQ ID NO: 56)	406
	VL	US 2015/0307617 (SEQ ID NO: 59)	407
1949	VH	WO 2016/179517 (SEQ ID NO: 16)	408
	VL	WO 2016/179517	409
1D10v1	sdAb	US 9,006,399	410
GITR 結合 CRBR 配列			
GITRリガンド	天然リガンド	UniProt 番号 Q9UNG2	411
36E5	VH	US 2014/0348841 (SEQ ID NO: 104)	412
	VL	US 2014/0348841 (SEQ ID NO: 105)	413
TRX-518	VH	US 2013/0183321 (SEQ ID NO: 54)	414
	VL	US 2013/0183321 (SEQ ID NO: 44)	415
5H7v2	VH	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 282)	289
	VL	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 134)	290
41G5v2	VH	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 312)	291
	VL	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 124)	292
C06v3	sdAb	US 2017/0022284 (SEQ ID NO: 59)	416
CD27 結合 CRBR 配列			
CD70-ECD	天然リガンド	UniProt番号P32970	276
1F5	VH	US 2011/0274685	277
	VL	US 2011/0274685	278
CD28 結合 CRBR 配列			
CD28 sdAb	sdAb		280
ICOS 結合 CRBR 配列			
ICOS sdAb	sdAb		279

10

20

30

40

50

【 0 4 4 0 】

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 4 1 】

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、CD3結合領域とCRBRとの間に連結ペプチド(LP)を含む。

【0442】

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、共刺激受容体の天然同族結合パートナー、Anticalin(操作されたリポカリン)、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

【0443】

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

【0444】

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。

【0445】

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

【0446】

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

【0447】

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

50

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）。

10

【0448】

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。

20

30

【0449】

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。

40

【0450】

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

50

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VH-CH1 (Fd) およびVL-CLを含む2つのFab抗体断片を含む。

【0451】

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

20

【0452】

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。

【0453】

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

【0454】

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。

【0455】

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。

40

【0456】

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。

【0457】

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

50

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、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。

【0458】

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。

【0459】

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WO 2018068695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。

【0460】

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。

【0461】

いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO : 421 ~ 426、443、もしくは519 ~ 536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 : 421 ~ 426、443、もしくは519 ~ 536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。

【0462】

いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO : 443に記載のVHHドメイン、またはSEQ ID NO : 443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 : 443に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 443もしくは519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 : 443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。

【0463】

いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO : 438、439、または440のいずれか1つに記載のCDR1、SEQ ID NO : 441に記載のCDR2、およびSEQ ID NO : 442に記載のCDR3を含むVHHドメインを有する。

【0464】

いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO : 439、441、および442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 : 438、441、および442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 : 440、441、および442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。

【0465】

10

20

30

40

50

いくつかの局面において、IRBRは、SEQ ID NO : 421 ~ 437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 : 421 ~ 437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VHHドメインであるかまたはそれを含む。

【0466】

いくつかの場合において、IRBRは、SEQ ID NO : 421 ~ 437のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 421 ~ 437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 : 421 ~ 437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。

【0467】

いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO : 519に記載のVHHドメイン、またはSEQ ID NO : 519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 : 519に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 519もしくは519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 : 519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。

【0468】

いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO : 438、439、または440のいずれか1つに記載のCDR1、SEQ ID NO : 441に記載のCDR2、およびSEQ ID NO : 442に記載のCDR3を含むVHHドメインを有する。

【0469】

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 : 439、441、および442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 : 438、441、および442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 : 440、441、および442に記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。

【0470】

いくつかの局面において、IRBRは、SEQ ID NO : 520 ~ 536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 : 520 ~ 536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。

【0471】

いくつかの場合において、IRBRは、SEQ ID NO : 520 ~ 536のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 520 ~ 536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 : 520 ~ 536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。

【0472】

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11.3など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。

【0473】

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。

10

【0474】

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CRBR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。

20

【0475】

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: 191~194、313~319、332、465に記載のような任意のGly-Serリンカー、またはGGSであるかまたはそれを含む、ペプチドである。

【0476】

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。

30

【0477】

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

40

50

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。

【0478】

3. NK動員

10

いくつかの態様において、B7H3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B7H3 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/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、B7H3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B7H3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。

【0479】

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 RIIA）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

【0480】

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; Ackery 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

40

【0481】

特定の例において、B7H3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、B7H3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B7H3に特異的に結合する結合分子は、NK細胞を腫瘍細胞に標

50

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。

【0482】

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。

【0483】

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

【0484】

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

【0485】

提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つのB7H3 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。

30

【0486】

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B7H3 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、B7H3 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)。

40

【0487】

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B7H3 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

50

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。

【0488】

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B7H3 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、ペプチドリンカー）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。

【0489】

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: 293、297、305、307、445、または451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: 294、298、301、303、309、311、446、449、または453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: 295、299、306、308、447、または452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: 296、300、302、304、310、312、448、450、または454のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含む。

【0490】

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、B7H3結合ポリペプチドは、サイトカイン-抗体融合タンパク質（B7H3 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B7H3 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B7H3 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、B7H3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。

10

20

30

40

50

【0491】

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- γ （IFN- γ ；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- 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、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、B7H3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。

10

【0492】

いくつかの態様において、B7H3 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。

20

【0493】

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- γ 、IFN- α 、またはIFN- β ）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。

【0494】

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。

30

40

【0495】

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.

50

(2000) J. Biol. Chem., 275:22995-3004を参照のこと。

【0496】

いくつかの態様において、インターフェロンは、全長IFN-（例えば、ヒトIFN-）、全長IFN-（例えば、ヒトIFN-）、または全長IFN-（例えば、ヒトIFN-）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-（例えば、ヒトIFN-）、生物学的に活性な切断型IFN-（例えば、ヒトIFN-）、または生物学的に活性な切断型IFN-（例えば、ヒトIFN-）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)alphabetakits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。

【0497】

いくつかの態様において、提供されるB7H3 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）。

【0498】

いくつかの態様において、提供されるB7H3 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)。

【0499】

いくつかの態様において、提供されるB7H3 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- γ 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- γ 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- γ 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。

10

【0500】

いくつかの態様において、提供されるB7H3 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B7H3 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 Neg., 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。

【0501】

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。

20

【0502】

提供されるB7H3 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、またはペプチドリンカ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B7H3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、例えばペプチドリンカ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,すなわち,(GGG)₂ (SEQ ID NO: 191); GGSGSGSGGS,すなわち,(GGG)₃ (SEQ ID NO: 192); GGSGSGSGSGGS,すなわち,(GGG)₄ (SEQ ID NO: 193); およびGGSGSGSGSGSGGS,すなわち,(GGG)₅ (SEQ ID NO: 194)

30

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: 195), GGGGG (SEQ ID NO: 196), およびGGGGGG (SEQ ID NO: 197)

40

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。

【0503】

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B7H3 VHHドメイン、例えば本明細書において提供されるB7H3 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B7H3 VHHを含む細胞外ドメイン、膜貫通

50

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B7H3 VHHドメインは、十分な親和性でB7H3、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、B7H3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。

【0504】

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Fcγ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)。

10

【0505】

いくつかの態様において、提供されるCARは、B7H3を標的とするかまたはB7H3に特異的に結合することができるB7H3 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B7H3 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、B7H3に特異的な2つのまたは少なくとも2つのB7H3 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、B7H3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B7H3 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、B7H3の第1のエピトープに結合する第1のB7H3 VHHドメインおよびB7H3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してもよい。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トピック (biparatopic) であり、CARはバイパトピックCARである。さらに別の態様において、抗原結合ドメインは、B7H3に特異的でありかつB7H3上の同じエピトープに結合する、2つのB7H3 VHHドメインを含む。

20

30

【0506】

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。

40

【0507】

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

50

、FcεR1γ および 鎖、MB 1 (Igα) 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。

【0508】

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: 281に記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 281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。

【0509】

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。

【0510】

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: 282~285のいずれかに記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 282~285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。

【0511】

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。

【0512】

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: 286~288に記載の例示的な配列またはSEQ ID NO: 286~288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。

【0513】

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、哺乳類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。

【0514】

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）。

【0515】

例示的な例において、初代T細胞は、エキスビボで精製され（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ー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。

【0516】

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、インビ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- γ 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- γ 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。

【0517】

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。

【0518】

IV. ポリペプチド発現および生成

提供されるsdAbおよびB7H3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

10

20

30

40

50

ずれかにおいて、核酸分子は、B7H3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。

【0519】

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。

【0520】

本明細書に記載されるB7H3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 (2004)において記載される。

【0521】

特に、所望のB7H3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B7H3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）に感染させた哺乳類細胞系；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、またはバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、もしくはコスミドDNAで形質転換した細菌などが挙げられる。利用される宿主-ベクター系に応じて、複数の適切な転写エレメントおよび翻訳エレメントのいずれか1つが用いられ得る。

【0522】

本開示はまた、細胞が、本明細書に記載されるB7H3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る、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B7H3結合ポリペプチドを生成する方法も提供する。

【0523】

いくつかの態様において、B7H3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、および哺乳類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、B7H3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アリル化レベルを有するポリペプチドを産生する。

【0524】

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、

10

20

30

40

50

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。

【0525】

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B7H3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B7H3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B7H3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。

10

20

【0526】

いくつかの態様において、B7H3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。

【0527】

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B7H3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、B7H3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、B7H3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、B7H3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、B7H3結合ポリペプチドを含む細胞培養培地が提供される。

30

【0528】

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B7H3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B7H3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B7H3結合ポリペプチドを含む。

【0529】

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B7H3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、B7H3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B7H3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。

【0530】

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

40

50

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まることが意図される。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。補足の活性化合物もまた、組成物内に組み入れることができる。

10

【0531】

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。

20

【0532】

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）、CREMOPHOR EL(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。

30

40

【0533】

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たらし真空乾燥法および凍結乾燥法である。

50

【0534】

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)、かつ喀出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Sterote；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。

10

【0535】

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。

【0536】

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。

20

【0537】

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。

【0538】

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。

30

【0539】

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。

40

【0540】

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。

50

【0541】

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。

10

【0542】

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。

【0543】

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。

20

【0544】

VI. 処置および使用の方法

本明細書に記載されるB7H3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、B7H3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、B7H3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B7H3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。

30

40

【0545】

1つの態様において、本開示のB7H3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、B7H3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

50

はそれが特定されている、対象が選択される。B7H3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。B7H3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。

【0546】

いくつかの態様において、提供されるB7-H3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効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。

10

【0547】

いくつかの態様において、B7H3結合ポリペプチド、例えば、Fc領域を含有するB7H3-Fc融合タンパク質または多重特異性構築の投与は、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域による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B7H3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。

20

【0548】

いくつかの態様において、提供される方法は、提供されるB7H3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つまたは複数がある程度まで軽減。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。

30

40

【0549】

いくつかの態様において、B7H3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、哺乳類がん細胞(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

50

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。

【0550】

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。いくつかの態様において、がんは肺扁平上皮がんである。

10

【0551】

いくつかの態様において、B7H3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、膵臓がん、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。

20

【0552】

いくつかの態様において、本開示のB7H3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効量は概して、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。

30

【0553】

いくつかの態様において、治療的有効用量は、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、治療的有効用量は、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。

【0554】

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。

40

【0555】

50

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B7H3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B7H3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。

【0556】

提供されるB7H3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、B7H3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。

【0557】

本開示の別の態様において、B7H3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。

【0558】

組み合わせ療法

本開示のB7H3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。

【0559】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるB7H3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、VISTA、gpNMB、B7H4、HHLA2、CD73、CTLA4、TIGIT等を標的とする剤と同時に与えられる。

10

【0560】

いくつかの態様において、本開示のB7H3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）、インターフェロン、CTLA4阻害剤（例えば、抗CTLA抗体イピリムマブ（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。

20

【0561】

いくつかの態様において、本明細書において提供されるB7H3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（Tesarco/AnaptysBio、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。

30

【0562】

いくつかの態様において、本開示のB7H3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（特にプラタシンおよびプラタシノン）；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

40

50

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 (ranimnustine) 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 11 およびカリケアミシン 11 (例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 18 3-186 (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ナート ; 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 (authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン (carabycin)、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) ドキソルピシン (モルホリノ-ドキソルピシン、シアノモルホリノ-ドキソルピシン、2-ピロリノ-ドキソルピシン、およびデオキシドキソルピシンを含む)、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、アンシタビン、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、エノシタビン、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 ; ビサントレン ; 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) ; 酢酸エリブチニウム ; 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 ; ビンデシン ; 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 ; ピボプロマン ; ガシトシン (gacytosine) ; アラビノシド (「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.)、ABRAXANE (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 Ror

er, 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 ; ビンブラスチン ; 白金 ; エトボシド (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 ; テニボシド ; 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。

【0563】

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、酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、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 (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、異常な細胞増殖に関与するシグナル伝達経路における遺伝子、例えば、PKC-、Raf、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。

【0564】

いくつかの態様において、B7H3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、B7H3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、B7H3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、B7H3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B7H3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、B7H3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、B7H3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B7H3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。B7H3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。

【0565】

いくつかの態様において、B7H3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、B7H3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、B7H3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B7H3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。

【0566】

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 .

B7H3に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（B7H3 VHHドメイン）と、B7H3以外の標的に結合する1つまたは複数の追加の結合ドメインとを含む、B7H3結合ポリペプチド構築物。

10

2 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、

SEQ ID NO : 115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、および145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 : 146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、および167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

20

SEQ ID NO : 168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および483～488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、態様1記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

3 .

SEQ ID NO : 115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、および145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 : 146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、および167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

30

SEQ ID NO : 168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および483～488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）

を含む少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン（B7H3 VHHドメイン）

を含む、B7H3結合ポリペプチド構築物。

4 .

前記B7H3がヒトB7H3である、態様1～3のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

40

5 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインがヒト化されている、態様1～4のいずれかに記載のB7H3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に結合する、態様1、2、4、および5のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

7 .

前記免疫細胞がT細胞である、態様6記載のB7H3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記載のB7H3結合ポリペ

50

プチド構築物。

9 .

B7H3およびCD3に対して二重特異性である、態様8記載のB7H3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記載のB7H3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記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

12 .

B7H3およびCD16aに対して二重特異性である、態様11記載のB7H3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に結合する、態様1、2、4、および5のいずれかに記載のB7H3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のいずれかに記載のB7H3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一価である、態様1、2、および4～14のいずれかに記載のB7H3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記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

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に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記載のB7H3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記載のB7H3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、II型インターフェロン、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、またはII型インターフェロンの切断型断片のバリエーションである、態様18記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

20 .

前記インターフェロンが、

IFN- γ もしくはIFN- γ 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、I型インターフェロン；あるいは

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、II型インターフェロン

から選択される、態様19記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

21 .

免疫グロブリンFc領域を含む、態様1～20のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

22 .

前記少なくとも1つのB7H3 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

10

20

30

40

50

を含む、態様1、2、および4～21のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

23.

二量体である、態様1～22のいずれかに記載のB7H3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のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

25.

前記Fc領域が、SEQ ID NO: 198、200、201、202、もしくは203のいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 198、200、201、202、もしくは203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のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

10

26.

前記Fc領域がヒトIgG1である、態様21～24のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

27.

前記Fc領域が、SEQ ID NO: 198に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 198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記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

20

28.

前記Fc領域がヘテロ二量体Fc領域である、態様21～23のいずれかに記載のB7H3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のいずれかに記載のB7H3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から選択されるエフェクター分子に対する結合を低減させる、1つまたは複数のアミノ酸改変を含むポリペプチド

30

を含む、態様21～29のいずれかに記載のB7H3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記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

32.

前記Fc領域が、SEQ ID NO: 199に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 199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記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

40

33.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO: 1、8～35、40、41、44、56～110、466、467、489、490、もしくは492～518のいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO: 1、8～35、40、41、44、56～110、466、467、489、490、もしくは492～518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B7H3に結合する、態様1～32のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

34.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 1に示される配列、

50

(ii) SEQ ID NO : 1のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 1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B7H3に結合する、態様1~33のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

35.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、

SEQ ID NO : 115、116、117、118、119、120、および121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 : 146、147、148、149、150、および151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 : 168および169からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、態様1~34のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

36.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO : 115、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、148、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、149、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、150、および168；それぞれSEQ ID NO : 116、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 117、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 118、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、146、および169；それぞれSEQ ID NO : 119、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 120、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、151、および168；それぞれSEQ ID NO : 116、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 118、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 119、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 116、151、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 121、147、および168；それぞれSEQ ID NO : 115、146、および168；それぞれSEQ ID NO : 119、149、および168；またはそれぞれSEQ ID NO : 122、151、および168に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様1~35のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

37.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 8~34、467、489~490、および492~497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 : 8~34、467、489~490、および492~497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B7H3に結合する、態様1~36のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

38.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 8~34、467、489~490、および492~497のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様1~37記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

39.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO : 35に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 35のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 35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B7H3に結合する、態様1~33のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

40.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、

SEQ ID NO : 123に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；

SEQ ID NO : 152および153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 : 170および171からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、態様1～33および39のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド。

4 1 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO : 123、152、および170 ; それぞれSEQ ID NO : 123、152、および171 ; それぞれSEQ ID NO : 123、153、および170 ; またはそれぞれSEQ ID NO : 123、153、および171に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様1～33、39、および40のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

4 2 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 40、41、もしくは498～503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 : 40、41、もしくは498～503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B7H3に結合する、態様1～33および39～41のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

4 3 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 40、41、または498～503のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様1～33および39～42記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

4 4 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO : 44に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 44のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 44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B7H3に結合する、態様1～33のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

4 5 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 124、125、126、127、128、129、130、131、132、または133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 : 154に示されるアミノ酸配列を含むCDR2 ; ならびに

SEQ ID NO : 172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、および183からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、態様1～33および44のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

4 6 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および172 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および174 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および175 ; それぞれSEQ ID NO : 125、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 126、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 127、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 128、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 129、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 130、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 131、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および176 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および177 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および178 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および179 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および180 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および181 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および182 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および183 ; それぞれSEQ ID NO : 126、154、および176 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および179 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および182 ; それぞれSEQ ID NO : 132、154、および176 ; またはそれぞれSEQ ID NO : 133、154、および173に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様1～33、44、および45のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

10

20

30

40

50

47.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO: 56~91、466、および504~514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: 56~91、466、および504~514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B7H3に結合する、態様1~33および44~46のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

48.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO: 56~91、466、および504~514のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様1~33および44~47記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

10

49.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 105に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 105のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 105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B7H3に結合する、態様1~33のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

50.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、
SEQ ID NO: 145に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；
SEQ ID NO: 167に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびに
SEQ ID NO: 488に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、態様1~33および49のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

20

51.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO: 106~109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: 106~109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B7H3に結合する、態様1~33、49、および50のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

30

52.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO: 106~109のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様1~33および49~51記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

53.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 110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: 110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B7H3に結合する、態様1~33のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

40

54.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、
SEQ ID NO: 139に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；
SEQ ID NO: 161に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびに
SEQ ID NO: 189に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、態様1~33および53のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド。

55.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO: 515~518のいずれか1つ

50

に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO : 515 ~ 518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B7H3に結合する、態様1 ~ 33、53、および54のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

56 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 515 ~ 518のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様1 ~ 33および53 ~ 55記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

57 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104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B7H3に結合する、態様1 ~ 33のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

58 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO : 134、155、および184 ; それぞれSEQ ID NO : 135、156、および168 ; それぞれSEQ ID NO : 136、157、および185 ; それぞれSEQ ID NO : 137、158、および186 ; それぞれSEQ ID NO : 138、159、および187 ; それぞれSEQ ID NO : 138、160、および188 ; それぞれSEQ ID NO : 139、161、および189 ; それぞれSEQ ID NO : 140、162、および483 ; それぞれSEQ ID NO : 141、163、および484 ; それぞれSEQ ID NO : 139、161、および189 ; それぞれSEQ ID NO : 142、164、および485 ; それぞれSEQ ID NO : 143、165、および486 ; それぞれSEQ ID NO : 144、166、および487に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様1 ~ 33および57のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

59 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、または104に示される、態様1 ~ 33、57、および58のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド構築物。

60 .

(a) 第1のFcポリペプチドと第2のFcポリペプチドとを含むヘテロ二量体Fc領域を含む、第1の構成要素、および(b) 可変重鎖領域(VH)と可変軽鎖領域(VL)とを含む抗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、ヘテロ二量体Fc領域が、抗CD3抗体のN末端に位置づけられ ; かつ

第1および第2の構成要素の一方または両方が、B7H3に特異的に結合するシングルドメイン抗体を含む少なくとも1つの抗原結合ドメイン(B7H3 VHHドメイン)を含む、前記多重特異性ポリペプチド構築物。

61 .

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のポリペプチド中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

10

20

30

40

50

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のポリペプチドの一方または両方が、少なくとも1つのB7H3 VHHドメインを含む、

態様60記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

62.

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: 198に示されるFcポリペプチドまたはその免疫学的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60または態様61記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

63.

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62記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

64.

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、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63記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

65.

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64記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

66.

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から選択される改変を含み、かつ前記ヘテロ二量体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60~65のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

67.

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、かつ該第2のFcポリペプチドの改変が、位置Ser354およびTyr349のうちの

30

68.

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62~64のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

69.

前記第1および/もしくは前記第2のFcポリペプチド、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60~64および68のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

70.

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の一方が、残基Ile253に改変をさらに含む、態様60~69のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

71.

前記改変がIle253Argである、態様70記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

72.

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の一方が、残基His435に改変をさらに含む、態様60~71のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

73.

50

前記改変がHis435Argである、態様72記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

74.

前記Fc領域が、Lys447を欠如しているポリペプチドを含む、態様60～73のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

75.

前記Fc領域が、FcRn結合を増強する少なくとも1つの改変を含むポリペプチドを含む、態様60～74のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

76.

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1つまたは複数の位置にある、態様75記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

77.

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76記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

78.

前記改変が、位置Met252および位置Met428にある、態様75または態様76記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

79.

前記改変が、Met252YおよびMet428Lである、態様78記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

80.

前記改変が、Met252YおよびMet428Vである、態様78記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

81.

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: 293、297、305、または307のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつ前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 294、298、301、303、309、または311のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、態様60～80のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

82.

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から選択されるエフェクター分子に対する結合を低減させる、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21～81のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

83.

前記少なくとも1つのアミノ酸改変が、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82記載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のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 295、299、306、または308のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつ前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 296、300、302、304、310、または312のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、態様60～83のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

85.

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が一価である、態様60～84のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

86.

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、一本鎖抗体ではなく、任意で、一本鎖可変断片

50

(scFv)ではない、態様60～85のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

87.

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60～86のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

88.

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87記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

89.

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: 219)を含むVH CDR1 ;
アミノ酸配列
RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 220)

10

を含むVH CDR2 ;
アミノ酸配列
HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 221)

を含むVH CDR3、
アミノ酸配列
RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 222)

20

を含むVL CDR1 ;
アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 223)を含むVL CDR2 ; および
アミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 224)を含むVL CDR3
を含む、態様60～88記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

90.

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、
SEQ ID NO: 225～255、480、460、もしくは462のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 225～255、460、もしくは462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し、かつCD3に結合するVH ; および
SEQ ID NO: 256～274、417、459、もしくは461のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 256～274、417、459、もしくは461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し、かつCD3に結合するVL
を含む、態様60～89のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

91.

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、SEQ ID NO: 237のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 265のアミノ酸配列を含む、態様60～90のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

92.

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、SEQ ID NO: 237のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 417のアミノ酸配列を含む、態様60～90のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

93.

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、SEQ ID NO: 460のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 461のアミノ酸配列を含む、態様60～90のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

94.

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、SEQ ID NO: 480のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 461のアミノ酸配列を含む、態様60～90のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

50

D NO : 459 のアミノ酸配列を含む、態様60～90のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

95 .

前記少なくとも1つのB7H3シングルドメイン抗体が、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、かつ/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づけられた、態様60～94のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

96 .

B7H3に特異的に結合する第1のB7H3 VHHドメインと、B7H3に特異的に結合する第2のB7H3 VHHドメインとを含む、態様60～95のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

97 .

前記第1または前記第2のB7H3 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づけられ、かつ該第1または該第2のB7H3 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づけられた、態様96記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

98 .

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、B7H3に結合する第1のB7H3 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B7H3に結合する第2のB7H3 VHHドメインを含み；かつ

20

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の構成要素中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、

態様96または態様97記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

99 .

前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインが同じである、態様96～98のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

100 .

30

前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインが異なっている、態様96～98のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

101 .

前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインが、B7H3の別個のもしくは重複しないエピトープに結合し、かつ/またはB7H3に対する結合について競合しない、態様100記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

102 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 1、8～35、40、41、44、56～110、466、467、489、490、もしくは492～518のいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO : 1、8～35、40、41、44、56～110、466、467、489、490、もしくは492～518のいずれかに示されるVHHドメイン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B7H3に結合する、態様60～101のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

103 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO : 1に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 1のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 1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B7H3に結合する、態様60～102のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

104.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO: 115、116、117、118、119、120、および121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: 146、147、148、149、150、および151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: 168および169からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、態様60～103のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

105.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO: 115、146、および168；それぞれSEQ ID NO: 115、147、および168；それぞれSEQ ID NO: 115、148、および168；それぞれSEQ ID NO: 115、149、および168；それぞれSEQ ID NO: 115、150、および168；それぞれSEQ ID NO: 116、146、および168；それぞれSEQ ID NO: 117、146、および168；それぞれSEQ ID NO: 118、146、および168；それぞれSEQ ID NO: 115、146、および169；それぞれSEQ ID NO: 119、146、および168；それぞれSEQ ID NO: 120、146、および168；それぞれSEQ ID NO: 115、151、および168；それぞれSEQ ID NO: 116、147、および168；それぞれSEQ ID NO: 118、147、および168；それぞれSEQ ID NO: 119、147、および168；それぞれSEQ ID NO: 116、151、および168；それぞれSEQ ID NO: 115、146、および168；それぞれSEQ ID NO: 121、147、および168；それぞれSEQ ID NO: 115、146、および168；それぞれSEQ ID NO: 119、149、および168；またはそれぞれSEQ ID NO: 122、151、および168に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様60～104のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

106.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 8～34、467、489～490、および492～497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: 8～34、467、489～490、および492～497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B7H3に結合する、態様60～105のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

107.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 8～34、467、489～490、および492～497のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様60～106のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

108.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 35に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 35のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 35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B7H3に結合する、態様60～102のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

109.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、

50

SEQ ID NO : 123に示されるアミノ酸配列を含むCDR1 ;

SEQ ID NO : 152および153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 : 170および171からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、態様60~102および108のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

110 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO : 123、152、および170 ; それぞれSEQ ID NO : 123、152、および171 ; それぞれSEQ ID NO : 123、153、および170 ; またはそれぞれSEQ ID NO : 123、153、および171に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様60~102、108、および109のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

111 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 40、41、もしくは498~503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 : 40、41、もしくは498~503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B7H3に結合する、態様60~102および108~110のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

112 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO : 40、41、または498~503のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様60~102および108~111記載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B7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO : 44に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 44のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 44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B7H3に結合する、態様60~102のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

114 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO : 124、125、126、127、128、129、130、131、132、または133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 : 154に示されるアミノ酸配列を含むCDR2 ; ならびに

SEQ ID NO : 172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、および183からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様60~102および113のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

115 .

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および172 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および174 ; それぞれSEQ ID NO : 124、154、および175 ; それぞれSEQ ID NO : 125、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 126、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 127、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 128、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 129、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 130、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO : 131、154、および173 ; それぞれSEQ ID NO :

124、154、および176；それぞれSEQ ID NO：124、154、および177；それぞれSEQ ID NO：124、154、および178；それぞれSEQ ID NO：124、154、および179；それぞれSEQ ID NO：124、154、および180；それぞれSEQ ID NO：124、154、および181；それぞれSEQ ID NO：124、154、および182；それぞれSEQ ID NO：124、154、および183；それぞれSEQ ID NO：126、154、および176；それぞれSEQ ID NO：124、154、および179；それぞれSEQ ID NO：124、154、および182；それぞれSEQ ID NO：132、154、および176；またはそれぞれSEQ ID NO：133、154、および173に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様60～102、113、および114のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

116.

10

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO：56～91、466、および504～514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：56～91、466、および504～514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B7H3に結合する、態様60～102および113～115のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

117.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO：56～91、466、および504～514のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様60～102および113～116記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

118.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO：105に示される配列、(ii) SEQ ID NO：105のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO：105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B7H3に結合する、態様60～102のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

119.

30

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO：145に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；SEQ ID NO：167に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；およびSEQ ID NO：488に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、態様60～102および118のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

120.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO：106～109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：106～109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B7H3に結合する、態様60～102、118、および119のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

121.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO：106～109のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様60～102および118～120のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

122.

50

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 110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: 110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B7H3に結合する、態様60~102のいずれかに記載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B7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO: 139に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；

10

SEQ ID NO: 161に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；および

SEQ ID NO: 189に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様60~102および122のいずれかに記載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B7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 515~518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: 515~518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B7H3に結合する、態様60~102、122、および123のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

125.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 515~518のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様60~102および122~124のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

126.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104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B7H3に結合する、態様60~102のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

127.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO: 134、155、および184；それぞれSEQ ID NO: 135、156、および168；それぞれSEQ ID NO: 136、157、および185；それぞれSEQ ID NO: 137、158、および186；それぞれSEQ ID NO: 138、159、および187；それぞれSEQ ID NO: 138、160、および188；それぞれSEQ ID NO: 139、161、および189；それぞれSEQ ID NO: 140、162、および483；それぞれSEQ ID NO: 141、163、および484；それぞれSEQ ID NO: 139、161、および189；それぞれSEQ ID NO: 142、164、および485；それぞれSEQ ID NO: 143、165、および486；それぞれSEQ ID NO: 144、166、および487に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様60~102および126のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

128.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメイン、または前記第1および前記第2のB7H3 VH

50

Hドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、または104に示される、態様60～102、126、および127のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

129.

前記第1および前記第2の構成要素の一方または両方が、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) を含む、態様60～128のいずれかに記載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、かつ/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づけられた、態様129記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

131.

共刺激受容体結合領域 (CRBR) を1つだけ含む、態様129または態様130記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

132.

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、B7H3に結合する第1のB7H3 VH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B7H3に結合する第2のB7H3 VHHドメインを含み；かつ

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、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の構成要素中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、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づけられた、態様129～131のいずれかに記載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にする結合活性を示すそのバリエーションである、またはそれを含む、態様129～132のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

134.

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129～132のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

135.

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 (sdAb)、VNAR、またはVHHである、態様134記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

136.

前記抗体または抗原結合断片がsdAbである、態様134または態様135記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

137.

前記sdAbが、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、態様136記載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

10

20

30

40

50

貫通アクチベーターおよびCAMLインタラクタ (Transmembrane activator and C AML interactor) (TACI)、およびNKG2Dの中から選択される共刺激受容体に結合する、態様129～137のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

139.

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) のの中から選択される共刺激受容体に結合する、態様129～138のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

140.

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域 (CRBR) が、SEQ ID NO: 400に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 400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に結合する、態様129～139のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

141.

前記第1および前記第2の構成要素の一方または両方が、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、態様60～140のいずれかに記載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、かつ/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づけられた、態様141記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

143.

抑制性受容体結合領域 (IRBR) を1つだけ含む、態様141または態様142記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

144.

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、B7H3に結合する第1のB7H3 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B7H3に結合する第2のB7H3 VHHドメインを含み；かつ

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の構成要素中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の構成要素の該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づけられた、態様141～143のいずれかに記載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に対する結合活性を示すそのバリエーション

である、またはそれを含む、態様141～144のいずれかに記載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141～144のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

147.

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 (sdAb)、VNAR、またはVHHである、態様146記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

148.

前記抗体または抗原結合断片がsdAbである、態様146または態様147記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

149.

前記sdAbが、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、態様146～148のいずれかに記載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IRBRが、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、およびTIM3の中から選択される抑制性受容体に結合する、態様141～149のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

151.

前記少なくとも1つのIRBRが、PD-1に結合する、態様141～149のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

152.

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、B7H3に結合する第1のB7H3 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B7H3に結合する第2のB7H3 VHHドメインを含み；かつ

20

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の一方、前記ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、前記リンカー、任意で、前記第1の構成要素中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141～151のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

153.

前記リンカーが、ペプチドリinkerまたはポリペプチドリinker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アミノ酸の長さである、態様60～152のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

154.

前記リンカーが、切断不可能なリンカーである、態様60～153のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

155.

前記切断不可能なリンカーが、GS, GGS, GGGGS (SEQ ID NO:315), GGGGGS (SEQ ID NO:316)

およびそれらの組み合わせを含む、態様153記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

156.

前記リンカーが、配列GGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:317)

40

である、またはそれを含む、態様60～155のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

157.

前記リンカーが、切断可能なリンカーである、態様60～153のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

158.

前記切断可能なリンカーが、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157記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

50

159.

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中に存在する細胞によって産生される、態様158記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

160.

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158または態様159記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

161.

前記プロテアーゼが、マトリブターゼ、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から選択される、態様158～160のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 10

162.

前記プロテアーゼがグランザイムBである、態様161記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

163.

前記切断可能なリンカーが、アミノ酸配列
GGSGGGIEPDIGGSGGS (SEQ ID NO:361)

を含む、態様158～162のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 20

164.

SEQ ID NO: 115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、および145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: 146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、および167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: 168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、および483～488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） 30

を含む、B7H3に結合する単離されたシングルドメイン抗体。

165.

SEQ ID NO: 1、8～35、40、41、44、56～110、466、467、489、490、もしくは492～518のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 1、8～35、40、41、44、56～110、466、467、489、490、もしくは492～518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B7H3に結合する、態様164記載の単離されたシングルドメイン抗体。

166.

前記シングルドメイン抗体が、(i) SEQ ID NO: 1に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 1のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 1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B7H3に結合する、態様164または態様165記載の単離されたシングルドメイン抗体。 40

167.

前記sdAbが、

SEQ ID NO: 115、116、117、118、119、120、および121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: 146、147、148、149、150、および151からなる群より選択される 50

アミノ酸配列を含むCDR2；ならびに

SEQ ID NO：168および169からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、態様164～166のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

168.

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO：115、146、および168；それぞれSEQ ID NO：115、147、および168；それぞれSEQ ID NO：115、148、および168；それぞれSEQ ID NO：115、149、および168；それぞれSEQ ID NO：115、150、および168；それぞれSEQ ID NO：116、146、および168；それぞれSEQ ID NO：117、146、および168；それぞれSEQ ID NO：118、146、および168；それぞれSEQ ID NO：115、146、および169；それぞれSEQ ID NO：119、146、および168；それぞれSEQ ID NO：120、146、および168；それぞれSEQ ID NO：115、151、および168；それぞれSEQ ID NO：116、147、および168；それぞれSEQ ID NO：118、147、および168；それぞれSEQ ID NO：119、147、および168；それぞれSEQ ID NO：116、151、および168；それぞれSEQ ID NO：115、146、および168；それぞれSEQ ID NO：121、147、および168；それぞれSEQ ID NO：115、146、および168；それぞれSEQ ID NO：119、149、および168；またはそれぞれSEQ ID NO：122、151、および168に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3

10

を含む、態様164～167のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

169.

前記sdAbが、SEQ ID NO：8～34、467、489～490、および492～497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：8～34、467、489～490、および492～497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B7H3に結合する、態様164～168のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

20

160.

前記sdAbが、SEQ ID NO：8～34、467、489～490、および492～497のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様164～169のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

171.

30

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO：35に示される配列、(ii) SEQ ID NO：35のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO：35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B7H3に結合する、態様164または態様165記載の単離されたシングルドメイン抗体。

172.

前記sdAbが、

SEQ ID NO：123に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；

SEQ ID NO：152および153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

40

SEQ ID NO：170および171からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、態様164、165、および171のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

173.

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO：123、152、および170；それぞれSEQ ID NO：123、152、および171；それぞれSEQ ID NO：123、153、および170；またはそれぞれSEQ ID NO：123、153、および171に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様164、165、171、および172のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

174.

50

前記sdAbが、SEQ ID NO : 40、41、または498～503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 : 40、41、または498～503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B7H3に結合する、態様164、165、および171～173のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

175.

前記sdAbが、SEQ ID NO : 40、41、または498～503のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様164、165、および171～174のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

10

176.

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO : 44に示される配列、(ii) SEQ ID NO : 44のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO : 44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B7H3に結合する、態様164または態様165記載の単離されたシングルドメイン抗体。

177.

前記sdAbが、

SEQ ID NO : 124、125、126、127、128、129、130、131、132、または133からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；

20

SEQ ID NO : 154に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；ならびに

SEQ ID NO : 172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、および183からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様164、態様165、または態様176記載の単離されたシングルドメイン抗体。

178.

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO : 124、154、および172；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および173；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および174；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および175；それぞれSEQ ID NO : 125、154、および173；それぞれSEQ ID NO : 126、154、および173；それぞれSEQ ID NO : 127、154、および173；それぞれSEQ ID NO : 128、154、および173；それぞれSEQ ID NO : 129、154、および173；それぞれSEQ ID NO : 130、154、および173；それぞれSEQ ID NO : 131、154、および173；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および176；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および177；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および178；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および179；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および180；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および181；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および182；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および183；それぞれSEQ ID NO : 126、154、および176；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および179；それぞれSEQ ID NO : 124、154、および182；それぞれSEQ ID NO : 132、154、および176；またはそれぞれSEQ ID NO : 133、154、および173に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様164、165、176、および177のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

30

40

179.

前記sdAbが、SEQ ID NO : 56～91、466、および504～514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 : 56～91、466、および504～514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B7H3に結合する、態様164、165、および176～178のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

180.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、SEQ ID NO : 56～91、466、および5

50

04～514のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様164、165、および176～179のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

181.

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 105に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 105のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 105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B7H3に結合する、態様164または態様165記載の単離されたシングルドメイン抗体。

182.

前記sdAbが、
SEQ ID NO: 145に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；
SEQ ID NO: 167に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；および
SEQ ID NO: 488に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、態様164、165、または181記載の単離されたシングルドメイン抗体。

183.

前記sdAbが、SEQ ID NO: 106～109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: 106～109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B7H3に結合する、態様164、165、181、および182のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

184.

前記sdAbが、SEQ ID NO: 106～109のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様164、165、および181～183のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

185.

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 110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: 110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B7H3に結合する、態様164または態様165記載の単離されたシングルドメイン抗体。

186.

前記sdAbが、
SEQ ID NO: 139に示されるアミノ酸配列を含むCDR1；
SEQ ID NO: 161に示されるアミノ酸配列を含むCDR2；および
SEQ ID NO: 189に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、態様164、165、および185のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

187.

前記sdAbが、SEQ ID NO: 515～518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: 515～518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B7H3に結合する、態様164、165、185、および186のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

188.

前記sdAbが、SEQ ID NO: 515～518のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様164、165、および185～187のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

189.

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 92、93、94、95

10

20

30

40

50

、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104のヒト化バリエーション、または(iii)SEQ ID NO: 92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、もしくは104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B7H3に結合する、態様164または態様165記載の単離されたシングルドメイン抗体。

190.

前記少なくとも1つのB7H3 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO: 134、155、および184;それぞれSEQ ID NO: 135、156、および168;それぞれSEQ ID NO: 136、157、および185;それぞれSEQ ID NO: 137、158、および186;それぞれSEQ ID NO: 138、159、および187;それぞれSEQ ID NO: 138、160、および188;それぞれSEQ ID NO: 139、161、および189;それぞれSEQ ID NO: 140、162、および483;それぞれSEQ ID NO: 141、163、および484;それぞれSEQ ID NO: 139、161、および189;それぞれSEQ ID NO: 142、164、および485;それぞれSEQ ID NO: 143、165、および486;それぞれSEQ ID NO: 144、166、および487に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様164、165、および189のいずれかに記載の単離されたシングルドメイン抗体。

191.

態様1~59のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

192.

態様60~163のいずれかに記載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。

193.

態様60~163のいずれかに記載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の核酸配列とを含むポリヌクレオチドであって、

該第1の核酸配列と該第2の核酸配列とが、配列内リボソーム進入部位(IRES)、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。

194.

前記第1の核酸配列および前記第2の核酸配列が、同じプロモーターに機能的に連結されている、態様193記載のポリヌクレオチド。

195.

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から選択される、態様194記載のポリヌクレオチド。

196.

態様164~190のいずれかに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。

197.

態様191~196のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

198.

発現ベクターである、態様197記載のベクター。

199.

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類ベクターである、態様197または態様198記載のベクター。

200.

態様191~196のいずれかに記載の1つもしくは複数のポリヌクレオチド、または態様1

10

20

30

40

50

97～199のいずれかに記載の1つもしくは複数のベクターを含む、細胞。

201.

組換えであるかまたは単離されている、態様200記載の細胞。

202.

哺乳類細胞である、態様201記載の細胞。

203.

ポリペプチドを産生する方法であって、

態様191～196のいずれかに記載の1つもしくは複数のポリヌクレオチド、または態様197～199のいずれかに記載の1つもしくは複数のベクターを細胞中に導入する工程、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、前記方法。

204.

前記ポリペプチドを前記細胞から単離する工程または精製する工程をさらに含む、態様203記載の方法。

205.

態様203または態様204記載の方法によって産生される、ポリペプチド。

206.

態様164～190のいずれかに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。

207.

前記細胞が、リンパ球である、態様206記載の操作された免疫細胞。

208.

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206または態様207記載の操作された免疫細胞。

209.

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206～208のいずれかに記載の操作された免疫細胞。

210.

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、またはそれを含む、態様206～209のいずれかに記載の操作された免疫細胞。

211.

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209または態様210記載の操作された免疫細胞。

212.

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211記載の操作された免疫細胞。

213.

態様1～59のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド、態様60～163のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物、態様164～190のいずれかに記載のシングルドメイン抗体、または態様206～212のいずれかに記載の操作された免疫細胞を含む、薬学的組成物。

214.

薬学的に許容される担体を含む、態様213記載の薬学的組成物。

215.

無菌である、態様213または態様214記載の薬学的組成物。

216.

10

20

30

40

50

対象において免疫応答を刺激するかまたは誘導する方法であって、その必要がある対象に、態様1～59のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド、態様60～163のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物、態様164～190のいずれかに記載のシングルドメイン抗体、または態様206～212のいずれかに記載の操作された免疫細胞、または態様213～215記載の薬学的組成物を投与する工程を含む、前記方法。

217.

前記免疫応答が、腫瘍またはがんに対して、任意で、B7H3を発現する腫瘍またはがんに対して、増加する、態様216記載の方法。

218.

前記対象において疾患または状態を処置する、態様216または態様217記載の方法。

219.

対象において疾患または状態を処置する方法であって、

その必要がある対象に、治療的有効量の、態様1～59のいずれかに記載のB7H3結合ポリペプチド、態様60～163のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物、態様164～190のいずれかに記載のシングルドメイン抗体、もしくは態様206～212のいずれかに記載の操作された免疫細胞、または態様213～215記載の薬学的組成物を投与する工程を含む、前記方法。

220.

前記疾患または状態が、腫瘍またはがんである、態様218または態様219記載の方法。

221.

前記対象がヒトである、態様216～220のいずれかに記載の方法。

【実施例】

【0567】

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。

【0568】

実施例1：B7H3 sdAbの作製

ヒトB7H3を標的とするシングルドメイン抗体を、ラマおよびアルパカの免疫化を介して作製した。ラマおよびアルパカを、以下に示される組換えバージョンのヒトB7H3細胞外ドメイン（ECD：SEQ ID NO：190、例えばUniProt番号Q5ZPR3に示されるヒトB7H3のアミノ酸29～466）で免疫した。

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYA
NRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPN
KDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLG
ANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPPEPGF
SLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGS
FTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQ
GVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPM
FPPEA

【0569】

特異的な抗B7H3抗体力価（titer）の発生後に、ラマ/アルパカの末梢血単核細胞（PBMC）を、免疫した動物由来の500 mLの血液から単離し、Qiagen RNeasy Maxi Kitを用いて全mRNAを単離して、その後、Thermo Superscript IV Reverse TranscriptaseおよびオリゴdTプライミングを用いてファーストストランドcDNAに変換した。このcDNAを鋳型として用いたPCRを介して、シングルドメイン抗体（sdAb；VHHとも呼ばれる）の配列を特異的に増幅し、sdAb-Fc-AGA2融合タンパク質として酵母表面提

10

20

30

40

50

示ベクター中にクローニングした。Fcは、ヒトIgG1 Fc (SEQ ID NO: 198に示される)、または場合によっては、エフェクター機能が低減したそのバリエーション (Fc xELL; SEQ ID NO: 199) であった。

【0570】

これらのsdAbを提示する酵母ライブラリーを、組換え型のB7H3 ECDを用いて、磁気ビーズ単離およびその後の蛍光活性化細胞選別 (FACS) を介して濃縮した。選別された酵母をプレーティングし、単離されたコロニーを、96ウェルブロック中に採取して、培地において増殖させ、sdAb-Fcの発現を表面提示から培地中への分泌に切り換えた。96ウェル酵母分泌培養物からの上清を、A375細胞 (B7H3陽性) またはCCRF-CEM細胞 (B7H3陰性) に適用し、洗浄し、蛍光体標識抗ヒトFc二次抗体で処理して、96ウェルフローサイトメトリーにより解析した。

10

【0571】

B7H3陽性細胞に結合したがB7H3陰性細胞には結合しなかったsdAbをコードする核酸配列を、ヒトFcコード領域とインフレーションで哺乳動物発現ベクター中にクローニングして、ポリエチレンイミンを用いてHEK293 freestyle細胞 (293F細胞) またはCHO細胞において一過性トランスフェクションにより発現させた。3~7日後に上清を収集して、分泌された組換えタンパク質をプロテインAクロマトグラフィーにより精製し、280nmでの吸光度および吸光係数から濃度を算出した。

【0572】

例示的な特定されたsdAbを、表E1に示す。場合によっては、sdAbは、Fcまたは別のsdAbなどの別のポリペプチドへの連結のための可動性リンカー (例えばGG) を含むことができる。

20

【0573】

(表E1) B7H3 sdAb

30

40

50

クローン名	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
L1A5	GFSEFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	1
L57B04	ERTFSTYTMG	123	VVNWSGGSKY	152	GGAYSGPYDTRQYTY	170	35
L58E05	GSTFSMYHMS	124	TSHHGTTN	154	DHGYNGRGY	172	44
1A10	GLTFDEHHMG	134	AITWHTGTTW	155	GRRPFFIREVGVEPDY	184	92
1E4	GSSFGSNVMM	135	TINSSGTGTF	156	SGPVRGWGP	168	93
D9	GFTFASTGMS	136	SINSGDSTM	157	WALSCSGYGCDLDPQD	185	94
A3	GFTFASYGMS	137	SINSGDSTM	158	WALSCSQYGCDLPRP	186	95
E9	GRTFSSYAMS	138	TITSSGSTTY	159	YTSRTVRDY	187	96
B4	GRTFSSYAMS	138	TITTGGGTTY	160	YTSRFPRDY	188	97
57B06	GGTFSSYAMG	139	AISSEGGSTY	161	KGVGWPQEQASYDY	189	98
57B10	GSIPSIDHMG	140	SIDLNGRTN	162	RWGSPDYHDDVDY	190 483	99
58B06	GRSFSTYAMG	141	AVGWRGTNTY	163	GEPIRVGEKSGYDY	191 484	100
57A12	GGTFSSYAMG	139	AISSEGGSTY	161	KGVGWPQEQASYDY	189	101
57B08	GLTFSSYAMG	142	AISWSGGNTL	164	GPRDYFSDLEVDFGS	192 485	102
58A08	GRTFSSLAVG	143	AISWSGGNTY	165	GLPIRVGVPGGYDY	193 486	103
57D1	GHTFSTYAMG	144	GITRSGDSTH	166	ASFAYLSTYTHHYDY	194 487	104
1H5	GRSFGDYTVG	145	GLSWLGGTIY	167	SRSAISRKATDFGS	195 488	105
L57B06	GGTFSSYAMG	139	AISSEGGSTY	161	KGVGWPQEQASYDY	189	110

10

20

30

40

【 0 5 7 4 】

実施例 2：フローサイトメトリーによる、B7H3発現細胞に対するsdAbの結合

特異性および相対的な親和性を、精製されたsdAb-FcについてB7H3発現細胞に対して評価した。B7H3-sdAb-Fc融合タンパク質の結合を、B7H3発現細胞、肺癌細胞株（NCIH460）、黒色腫細胞株（A375）、またはB7H3をトランスフェクトした293細胞株（B7H3+ 293）を用いてフローサイトメトリーにより評価した。滴定系列の融合タンパク質を、B7H3発現細胞株（およそ $2.5 \sim 5 \times 10^4$ 細胞/ウェル）と30分間、4℃でFACS緩衝液（PBS、1% BSA、0.1% NaN₃、pH 7.4）において96ウェルプレート中でインキュベートした。FACS緩衝液での3回の洗浄後に、APCコンジュゲート抗ヒトFc

50

特異的二次抗体（Jackson ImmunoResearch）を添加して、細胞を30分間、4 でインキュベートした。FACS緩衝液における3回の追加の洗浄後に、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。

【0575】

図1A～1Fは、例示的なB7H3 sdAb、すなわち、1A10（SEQ ID NO：92）、1E4（SEQ ID NO：93）、D9（SEQ ID NO：94）、A3（SEQ ID NO：95）、57D1c（SEQ ID NO：104）、57B10（SEQ ID NO：99）、58A08（SEQ ID NO：103）、58B06（SEQ ID NO：100）、58E05（SEQ ID NO：44）、57A12（SEQ ID NO：101）、57B04（SEQ ID NO：35）、57B06（SEQ ID NO：98）、および57B08（SEQ ID NO：102）についての結果を示す。

10

【0576】

実施例3：ラクダ科由来のB7H3 sdAbのヒト化

例示的なラクダ科由来のB7H3 sdAbであるL1A5（SEQ ID NO：1）、L57B04（SEQ ID NO：35）、L58E05（SEQ ID NO：44）、1H5（SEQ ID NO：105）、およびL57B06（SEQ ID NO：110）を、ヒトVH3-23生殖系列をスクフォールドとして用いてヒト化した。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の残基は、未改変のままであった。加えて、すべてのヒト化バリエーションは、Leu11Glu（L11E）の改変、ならびにSer112Lys（S112K）およびSer113Pro（S113P）のカルボキシ末端の改変を含有しており、それは、これらが、（US20160207981に記載されているように）sdAbに対する既存のADAの認識を阻止するかまたは低減することが公知であるためである。

20

【0577】

表E2は、例示的なB7H3 sdAbヒト化バリエーションを示す。場合によっては、sdAbは、Fcまたは別のsdAbなどの別のポリペプチドへの連結のための可動性リンカー（例えばGG）を含むことができる。

【0578】

（表E2）B7H3 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
L1A5ヒト化バリエーション							
hz1A5v1	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	2492

30

40

50

クローン名	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
hz1A5v2	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	3 493
hz1A5v3	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	4 494
hz1A5v7	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	5 495
hz1A5v8	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	6 496
hz1A5v9	GFSFGSNVMM	115	TIYSRGTGTF	147	SGPVRGWGP	168	7 497
hz1A5v12	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	8
hz1A5v17	GFSFGSNVMM	115	TIYSRGTGTF	147	SGPVRGWGP	168	9
hz1A5v24	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	10
hz1A5v25	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	11
hz1A5v28	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	12
hz1A5v29	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	13
hz1A5v30	GFSFGSNVMM	115	TIYSRGGSTF	148	SGPVRGWGP	168	14
hz1A5v31	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTY	149	SGPVRGWGP	168	15
hz1A5v32	GFSFGSNVMM	115	TIYSRGGSTY	150	SGPVRGWGP	168	16
hz1A5v33	GFSFGSNVMM	115	TIYSRGTGTF	147	SGPVRGWGP	168	17
hz1A5v34	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	18
hz1A5v35	GFSFGSYVMM	116	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	19
hz1A5v36	GFSFGSFVMM	117	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	20
hz1A5v37	GFTFGSNVMM	118	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	21

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
hz1A5v38	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGY	169	22
hz1A5v39	GFSFSSNVMM	119	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	23
hz1A5v40	GFSFTSNVMM	120	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	24
hz1A5v41	GFSFGSNVMM	115	TIYSRGTGTF	147	SGPVRGWGP	168	25
hz1A5v42	GFSFGSNVMM	115	TIYSRGTGTF	147	SGPVRGWGP	168	26
hz1A5v43	GFSFGSNVMM	115	TIYSRGTGTF	147	SGPVRGWGP	168	27
hz1A5v44	GFSFGSNVMM	115	TIYSRGTGTY	151	SGPVRGWGP	168	28
hz1A5v45	GFSFGSYVMM	116	TIYSRGTGTF	147	SGPVRGWGP	168	29
hz1A5v46	GFTFGSNVMM	118	TIYSRGTGTF	147	SGPVRGWGP	168	30
hz1A5v47	GFSFSSNVMM	119	TIYSRGTGTF	147	SGPVRGWGP	168	31
hz1A5v48	GFSFGSYVMM	116	TIYSRGTGTY	151	SGPVRGWGP	168	32
hz1A5v49	GFTFSSNVMM	121	TIYSRGTGTF	147	SGPVRGWGP	168	33
hz1A5v50	GFTFSSYVMM	122	TIYSRGTGTY	151	SGPVRGWGP	168	34
hz1A5v51	GFSFSSNVMM	119	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	467
hz1A5v52	GFSFSSNVMM	119	TIYSSGTGTY	149	SGPVRGWGP	168	489
hz1A5v53	GFSFGSNVMM	115	TIYSSGTGTF	146	SGPVRGWGP	168	490
L57B04 ヒト化バリエント							
hz57B04v3	ERTFSTYTMG	123	VVNWSGGSKY	152	GGAYSGPYDTRQYTY	170	36 498
hz57B04v4	ERTFSTYTMG	123	VVNWSGGSKY	152	GGAYSGPYDTRQYTY	170	37 499

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
hz57B04v8	ERTFSTYTMG	123	VVNWSGGSKY	152	GGAYSGPYYDTRQYTY	170	38 500
hz57B04v9	ERTFSTYTMG	123	VVNWSGGSKY	152	GGAYSGPYYDTRQYTY	170	39 501
hz57B04v15	ERTFSTYTMG	123	VVNWGGGSKY	153	GGAYSGPYYDTRQYTY	170	40
hz57B04v20	ERTFSTYTMG	123	VVNWGGGSKY	153	GGAYSTPYYDTRQYTY	171	41
hz57B04v23	ERTFSTYTMG	123	VVNWSGGSKY	152	GGAYSGPYYDTRQYTY	170	42 502
hz57B04v24	ERTFSTYTMG	123	VVNWGGGSKY	153	GGAYSGPYYDTRQYTY	170	43 503
L58E05 ヒト化バリエーション							
hz58E05v1	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNGRGY	172	45 504
hz58E05v2	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNGRGY	172	46 505
hz58E05v3	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNGRGY	172	47 506
hz58E05v4	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNGRGY	172	48 507
hz58E05v5	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	49 508
hz58E05v6	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNARGY	174	50 509
hz58E05v7	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNTRGY	175	51 510
hz58E05v8	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNGRGY	172	52 511
hz58E05v9	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	53 512
hz58E05v10	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNARGY	174	54 513
hz58E05v11	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNTRGY	175	55 514
hz58E05v13	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	56

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
hz58E05v16	GSTFSLYHMS	125	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	57
hz58E05v18	GSTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	58
hz58E05v19	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	59
hz58E05v20	GSTFSTYHMS	127	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	60
hz58E05v21	GSTFSKYHMS	128	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	61
hz58E05v22	GSTFSFYHMS	129	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	62
hz58E05v23	GSTFSDYHMS	130	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	63
hz58E05v24	GSTFSRYHMS	131	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	64
hz58E05v25	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	65
hz58E05v26	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	66
hz58E05v27	GSTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	67
hz58E05v28	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNGRGY	172	68
hz58E05v29	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNGRGY	172	69
hz58E05v30	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNGRGY	172	70
hz58E05v31	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	71
hz58E05v32	GSTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	72
hz58E05v36	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYGGRGY	176	73
hz58E05v37	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYSGRGY	177	74
hz58E05v38	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYVGRGY	178	75

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
hz58E05v39	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYEGRGY	179	76
hz58E05v40	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNPRGY	180	77
hz58E05v41	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYGNRGY	181	78
hz58E05v42	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNYGRGY	182	79
hz58E05v43	GSTFSMYHMS	124	TSHHGGTTN	154	DHGYNRGGY	183	80
hz58E05v44	GSTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYGGRGY	176	81
hz58E05v45	GSTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYEGRGY	179	82
hz58E05v46	GSTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYNYGRGY	182	83
hz58E05v47	GSTFSIYHMS	132	TSHHGGTTN	154	DHGYGGRGY	176	84
hz58E05v48	GFTFSSYHMS	133	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	85
hz58E05v49	GSTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	86
hz58E05v50	GSTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	87
hz58E05v51	GSTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	88
hz58E05v52	GSTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	89
hz58E05v53	GSTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	90
hz58E05v54	GSTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	91
hz58E05v55	GFTFSSYHMS	126	TSHHGGTTN	154	DHGYQGRGY	173	466
IH5 ヒト化バリエーション							
hz1H5v1	GRSFGDYTVG	145	GLSWLGGTIY	167	SRSAISRKATDFGS	488	106

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
hz1H5v2	GRSFGDYTVG	145	GLSWLGGTIY	167	SRSAISRKATDFGS	488	107
hz1H5v3	GRSFGDYTVG	145	GLSWLGGTIY	167	SRSAISRKATDFGS	488	108
hz1H5v4	GRSFGDYTVG	145	GLSWLGGTIY	167	SRSAISRKATDFGS	488	109
L57B06ヒト化バリエーション							
h57B06v5	GGTFSSYAMG	139	AISSEGGSTY	161	KGVGWPQEQASYDY	189	111 515
h57B06v6	GGTFSSYAMG	139	AISSEGGSTY	161	KGVGWPQEQASYDY	189	112 516
h57B06v7	GGTFSSYAMG	139	AISSEGGSTY	161	KGVGWPQEQASYDY	189	113 517
h57B06v8	GGTFSSYAMG	139	AISSEGGSTY	161	KGVGWPQEQASYDY	189	114 518

10

20

【 0 5 7 9 】

B7H3 sdAbのヒト化バリエーションを、実質的に実施例2に記載されるように、B7H3発現細胞に結合するその能力について試験し、ほとんどの場合、結合を親sdAbと比較した。場合によっては、両方とも内在性にB7H3を発現するHCT-116細胞株またはA549細胞株を、これらの研究において用いた。結果を図2A～2Yに示し、これらは、ヒト化バリエーションの結合を確認する。

【 0 5 8 0 】

実施例4：B7H3を標的とする制約付きCD3結合タンパク質を生成する方法

制約付きの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、および、Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/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上記の1つまたは複数のB7H3 sdAbを含有する、多重特異性ポリペプチド構築物を作製した。図3A～3Eに示されるように、多重特異性構築物を、様々な配置で作製した。場合によっては、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、かつ/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少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）を含有していた。例示的なCRBRは、4-1BB共刺激受容体を標的とするsdAb（例えば、それぞれSEQ ID NO：468、469、および470に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する；例えば、SEQ ID NO：400に示される）である。

30

【 0 5 8 1 】

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少なくとも第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドを作製して、発現のためにプラスミド中にクローニングした。第1のポリペプチド鎖は概して、N末端からC末端への順序で、Fcホールポリペプチド（例えば、SEQ ID NO：302、または場合によってはSEQ ID NO：304に示される）；切断可能なリンカーまたは切断不可能なリンカー、例えば、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；およびdsFv抗CD3抗体の可変軽鎖（VL）ドメイン（例えば、SEQ ID NO：417に示される）を含んでいた。第2のポリペプチド鎖は概して、N末端からC末端への順序で、Fcノブポリペプチド（例えば、SEQ ID NO：295、または場合によってはSEQ ID NO：299に示される）；第1のポリペプチド鎖と同じ切断可能なリンカーまたは同じ切断不可能

40

50

なリンカー；およびdsFv抗CD3抗体の可変重鎖ドメイン（例えば、SEQ ID NO：237に示される）を含んでいた。構築物は、例示的な切断不可能なリンカーであるGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:317)

または例示的な切断可能なリンカーである、グランザイムBの基質認識部位を含有するGGSGGGIEPDI GGSGGS (SEQ ID NO:361)

で作製した。ポリペプチド鎖の一方または両方は、様々な配置で、Fcドメインのアミノ末端、かつ/もしくはCD3結合領域のカルボキシ末端の1つもしくは複数のB7H3 sdAb、および/またはFcドメインのアミノ末端、かつ/もしくはCD3結合領域のカルボキシ末端の共刺激受容体結合ドメインを追加的にコードしていた。

10

【0582】

ヘテロ二量体制約付き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用いて哺乳類細胞（HEK293またはCHOのいずれか）中に等モル比で一過性にトランスフェクトした。3～7日後に上清を収集し、分泌された組換えタンパク質を、プロテインAクロマトグラフィーによって、およびその後の調製用サイズ排除クロマトグラフィー（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ー（HIC）のいずれかによって精製した。ヘテロ二量体タンパク質は、ヘテロ二量体Fcの一方の鎖中の位置I253RまたはH435R（通常ホール-Fc）での、それがプロテインAに結合しないように設計された変異のために、選択的に精製された。SEC（Superdex-200レジンを有するAKTA）またはFT-HIC（ブチル/フェニルセファロースを有するAKTA）上での第2のクロマトグラフィー工程を用いて、より疎水性であり、かつ期待される分子量の2倍である、2つのヘテロ二量体Fcを含有する望ましくないクロスペア種を除去した。

20

【0583】

方法は、記載されるようなヘテロ二量体Fcとジスルフィド安定化抗CD3 Fv（例えば、SEQ ID NO：237に示されるような変異G44Cを有する抗CD3 VHおよびSEQ ID NO：417に示されるような変異G100Cを有するVL）との妥当なペア種を含有する、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の生成に好都合であった。精製されたヘテロ二量体制約付きCD3結合タンパク質は、安定であり、4 での長期のインキュベーションまたは増加したタンパク質濃度であってもクロスペア種を蓄積しなかった。

30

【0584】

表E3は、例示的な作製された制約付き多重特異性構築物を示す。

【0585】

（表E3）B7H3 VHH制約付き多重特異性構築物

40

50

構築物 #	鎖	N末端 sdAb (B7H3) (SEQ ID NO)	Fc	リンカー	CD3 結合ドメイン	C末端 sdAb (B7H3) (SEQ ID NO)
cx2846	1	58E05v27 (67)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	57B04v24 (503,例えば 43)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx3072	1	58E05v27 (67)	hFc-ノブ	(G5S)3	Con1 VH	57B04v24 (503)
	2	-	hFc-ホール	(G5S)3	Con1 VL	-
cx3090	1	58E05v27 (67)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	57B04v24 (503,例えば 43)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (400)
cx3243	1	58E05v27 (67)	hFc-ノブ	(G5S)3	Con1 VH	57B04v24 (503,例えば 43)
	2	-	hFc-ホール	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (400)
cx3834	1	58E05v27 (67)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	58E05v27 (67)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx3855	1	58E05v27 (67)	xELL-ノブ	IEPDI	Con1 VH	58E05v27 (67)
	2	-	xELL-ホール	IEPDI	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (400)
cx3960	1	58E05v27 (67)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	1A5 (1)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx4136	1	58E05v27 (67)	xELL-ノブ	(G5S)3	Con1 VH	58E05v27 (67)
	2	-	xELL-ホール	(G5S)3	Con1 VL	-
cx4137	1	58E05v27 (67)	xELL-ノブ	(G5S)3	Con1 VH	58E05v27 (67)
	2	-	xELL-ホール	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (400)
cx4641	1	58E05v27 (67)	xELL-ノブ	IEPDI	Con1 VH	1A5 (1)
	2	-	xELL-ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx4645	1	58E05v27 (67)	xELL-ノブ	IEPDI	Con1 VH	1A5 (1)
	2	-	xELL-ホール	IEPDI	Con1 VL	-

10

20

30

40

50

cx4736	1	58E05v27 (67)	xELL-ノブ	IEPDI	Con1 VH	58E05v27 (67)
	2	-	xELL-ホール	IEPDI	Con2 VL	-
cx4904	1	58E05v27 (67)	xELL-ノブ	IEPDI	Con1 VH	58E05v27 (67)
	2	-	xELL-ホール	IEPDI	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (400)
cx4908	1	58E05v27 (67)	xELL-ノブ	IEPDI	Con1 VH	1A5v12 (8)
	2	-	xELL-ホール	IEPDI	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (400)

10

【 0 5 8 6 】

実施例5：単離された初代T細胞に対する結合対B7H3発現がん細胞に対する結合の比較表E3に示される例示的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の、初代T細胞の表面上のCD3またはB7H3発現細胞（A375）に対する結合を、フローサイトメトリーにより評価した。T細胞は、健常ヒトドナー末梢血leukopakより単離されたPBMCからネガティブ濃縮された初代T細胞であった。結合した構築物を、ヒトFcに特異的な蛍光体コンジュゲート二次抗体（抗ヒトIgG APC二次抗体）で検出し、結合をフローサイトメトリーにより測定した。二次抗体のみとインキュベートされた細胞が、陰性対照として機能した。結合を、B7H3およびCD3を標的とするDual-affinity Re-targeting Antibody（DART）-単量体Fc形式（DART-Fc B7H3xCD3；例えばWO2017030926A1を参照されたい）と比較した。

20

【 0 5 8 7 】

200nMの各構築物での正規化された細胞数対蛍光を提示するフローサイトメトリーヒストグラムからの結果を、図4A～C（cx3855）、図5A～C（cx4137）、図6A～C（cx3090）、図7A～C（cx3243）、図8A～C（cx4736）、図9A～C（cx4136）、図10A～C（cx3072）、図11A～C（cx4641）、図12A～C（cx4645）、図13A～C（cx4736、50nM）、図14A～C（cx4736、12.5nM）、図15A～C（cx2846）、図16A～C（cx3834）、図17A～C（cx3960）、図18A～C（cx4904）、および図19A～C（cx4908）に示す。示されるように、代表的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージャーは、B7H3を発現するA375細胞に結合することが見出された（図の各々の部分「A」）。しかし、図の各々の部分「B」および「C」に示されるように、同じ構築物は、単離状態のT細胞に結合することができなかった。これらの研究において、代表的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージャーであるcx3855の結合を、B7H3およびCD3を標的とするDual-affinity Re-targeting Antibody（DART）-単量体Fc形式（DART-Fc B7H3xCD3；例えばWO2017030926A1を参照されたい）のアナログと比較した。DART-Fc B7H3xCD3は、SEQ ID NO：418、419、420に示されるようなB7H3配列を含有していた。注目すべきことに、DART-Fc形式のみが、B7H3エンゲージメントの非存在下でのT細胞結合を可能にすることが観察された（図4B）のに対して、両方の構築物が、B7H3発現細胞に対する結合を示した（図4A）。

30

40

【 0 5 8 8 】

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B7H3またはCD3に対する親和性を要約する。

【 0 5 8 9 】

（表E4）構築物の結合親和性

構築物 #	親和性 B7H3	親和性 CD3
cx3072	0.539 nM	>200 nM
cx3090	0.523 nM	>200 nM
cx3243	0.477 nM	>200 nM
cx3855	0.395 nM	>200 nM
cx4136	0.368 nM	>200 nM
cx4137	0.375 nM	>200 nM
cx4641	0.379 nM	>200 nM
cx4645	1.776 nM	>200 nM
cx4736	0.468 nM	>200 nM

10

【 0 5 9 0 】

実施例 6：レポーターアッセイを用いた B7H3 依存性の CD3 レポーター T 細胞活性化の評価

本実施例は、B7H3 発現細胞との共培養において CD3 NFAT レポーター Jurkat 細胞株を活性化する、様々な代表的な B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物の能力の評価を記載する。レポーターアッセイにおいて、Jurkat 細胞における 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結果としてもたらす。これらのアッセイを用いて、CD3 結合ドメインを介した T 細胞結合は、（実施例 5 に示されるように）単離された T 細胞上で制限されるかまたは抑制されるが、本明細書で提供される B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物がひとたび同族抗原に結合すると、それらが T 細胞をエンゲージでき、T 細胞活性化を媒介できることを実証した。

20

【 0 5 9 1 】

抗原を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物を、B7H3 発現標的細胞である A375 と、NFAT 駆動緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する操作された Jurkat 細胞との共培養上で滴定した。接着性の標的細胞を利用するレポーターアッセイについては、 2.5×10^4 個の標的細胞を播種し、均一な分布のために室温で静置させて、数時間 37 ° でインキュベートして接着させ、その後、ウェル当たり 5.0×10^4 個のレポーター細胞および抗原を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物を添加した。IncuCyte ZOOM システムを用いてアッセイプレートを連続的に画像化し、合計の緑色オブジェクトの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判定した。図 20A および 20B に示されるように、評価した B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物は、B7H3 陽性細胞（A375）を含有する培養物においてレポーター活性を誘導した（図 20A）が、T 細胞を B7H3 陰性細胞（A375 B7H3-/-）と培養した場合には、いかなる測定可能なレポーター活性も観察されなかった（図 20B）。

30

【 0 5 9 2 】

実施例 7：機能活性の評価

本実施例は、インビトロアッセイにおける、例示的な作製された B7H3 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物のヒト初代 T 細胞における評価および特徴決定を記載する。機能活性を、上記の B7H3 x CD3 DART-Fc と比較した。

40

【 0 5 9 3 】

1. T 細胞媒介性細胞傷害活性

標的細胞を、CytoID red で蛍光標識した。接着性の標的細胞（例えば、A375、A355 del B7H3（B7H3-/-）、A549）を利用する細胞傷害活性アッセイについては、ウェル当たり 1.0×10^4 個の標的細胞を播種し、均一な分布のために室温で静置させて、数時間 37 ° でインキュベートして接着させ、その後、他のアッセイ構成要素を添加した。初代 T 細胞を、健常ヒトドナー leukopak より単離された PBMC からネガティブ濃縮し、10 : 1 の T 細胞対標的細胞の比で添加した。緑色カスパーゼ-3/7 試薬を添加し、これは、ア

50

ポトースを受けている細胞の核DNAを蛍光標識する (Essen BioScience)。抗体を、共培養上で滴定し、IncuCyte ZOOMシステムを用いてアッセイプレートを連続的に画像化した。合計の赤色/緑色 重複オブジェクト面積を測定することによって、標的細胞の死を判定した。

【0594】

図21Aに示されるように、評価したB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物は、B7H3陽性細胞 (A375) の強力なT細胞媒介性細胞傷害活性を誘導した。図21Bに示されるように、いかなる測定可能なT細胞細胞傷害活性も、B7H3陰性細胞 (A375 B7H3-/-) に対しては観察されず、これは、抗原依存性T細胞活性化を強力に誘導する能力と一貫していた。これらの構築物は、代替形式であるDART-Fc B7H3xCD3と類似した効力を示した。これらの観察は、本明細書で提供される抗原を標的とする制約付きCD3形式が、他のCD3エンゲージング形式と比較して、強力なB7H3依存性T細胞細胞傷害活性を誘導する能力を維持しながら、単離状態のT細胞結合を欠如しているか、または低減したT細胞結合を示すことを支持する。

10

【0595】

2. T細胞活性化

T細胞活性化を評価するために、T細胞媒介性細胞傷害活性アッセイ由来の浮遊細胞を収集して、live/deadステイン、ならびに蛍光体コンジュゲート抗CD4、抗CD8、抗CD25、抗CD69、および/または抗CD71抗体で染色した。細胞を、SONY SA3800スペクトルアナライザーを用いて解析し、CD4+ T細胞またはCD8+ T細胞の活性化を、CD25、CD69、もしくはCD71の発現レベル、またはCD25、CD69、もしくはCD71陽性のパーセントを測定することによって判定した。

20

【0596】

図22A~22Bおよび図25A~25Bは、例示的な構築物の存在下でのT細胞とB7H3陽性細胞 (A375) またはB7H3陰性細胞 (A375 B7H3-/-) との培養時の、それぞれCD4 T細胞およびCD8 T細胞上のCD25発現についての結果を図示する。図23A~23Bおよび図26A~26Bは、例示的な構築物の存在下でのT細胞とB7H3陽性細胞 (A375) またはB7H3陰性細胞 (A375 B7H3-/-) との培養時の、それぞれCD4細胞およびCD8 T細胞上のCD69発現についての結果を図示する。図24A~24Bおよび図27A~27Bは、例示的な構築物の存在下でのT細胞とB7H3陽性細胞 (A375) またはB7H3陰性細胞 (A375 B7H3-/-) との培養時の、それぞれCD4 T細胞およびCD8 T細胞上のCD71発現についての結果を図示する。CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞におけるCD25、CD69、およびCD71の発現の増加によって証明されるように、結果は、例示的な評価したB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が、CD3結合を介して用量依存的なB7H3依存性T細胞活性化を媒介したことを示した。制約付きCD3エンゲージング構築物およびDART-Fc形式による類似したT細胞活性化の効力が、これらの2つの形式によるT細胞結合の有意な差にもかかわらず、観察された。

30

【0597】

したがって、結果は、本発明のB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が、CD4 T細胞およびCD8 T細胞両方の強力な抗原依存性活性化を誘導したことを実証した。

40

【0598】

3. T細胞サイトカイン産生 (ELISA)

T細胞媒介性細胞傷害活性アッセイからの上清を、サンドイッチELISA (BioLegend, USA) によってIFN 含量について解析した。製造業者の説明書に従って、標準曲線を作製し、それから上清試料のサイトカイン濃度値を内挿した。検出下限よりも下の吸光度値を有した試料には、最低標準濃度の半分と同等のサイトカイン濃度を割り当てた。図28Aは、代表的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物であるcx4136、cx4137、cx3960、およびcx2846が、抗原依存性様式でT細胞によるIFN 産生を惹起すると観察されたことを示す。

50

【0599】

4. T細胞サイトカイン産生 (FluoroSpot)

FluoroSpot膜を、IFN 捕捉抗体およびTNF 捕捉抗体で一晩、4 でコーティングした。膜をPBSで洗浄し、抗体滴定物、標的細胞、およびPBMCまたはPBMCからネガティブ濃縮された精製T細胞を添加した。細胞を、1:10の比の標的細胞対エフェクター細胞で播種した。アッセイプレートを、約24時間、37 でインキュベートし、膜を、製造業者 (C.T.L.) の説明書に従って調製した。CTL-ImmunoSpot S6 Universal Analyzerを用いて、膜を画像化した。アッセイウェル間で均一な曝露時間および強度設定を用いて、サイトカインスポット数を測定した。図28Bおよび28C (IFN) ならびに図28D (TNF) は、B7H3依存性様式でPBMCまたはT細胞からのサイトカイン産生を惹起する、例示的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の能力を図示する。

10

【0600】

実施例8: ADCCレポーター活性化

例示的なB7H3を標的とするsdAbのFcエフェクター機能を評価するために、NFAT駆動ルシフェラーゼレポーター遺伝子を有する、CD16aを安定に発現するように操作されたJurkatレポーター細胞株を用いた。Jurkatレポーター細胞を、B7H3高発現A375細胞 (3×10^4 細胞/ウェル) の非存在下または存在下で播種した (およそ 9×10^4 細胞/ウェル)。58E05-Fc、hz58E05v55-Fc、hz1A5v53-Fc、または抗B7H3 IgG1抗体 (US 9,896,508において公開された配列由来) を、細胞上で滴定して、アッセイプレートを37 で5.5時間インキュベートし、最終アッセイ体積は125マイクロリットルであった。アッセイプレートを室温で平衡化し、100マイクロリットルのBio-Gloを試料ウェルに添加して、アッセイプレートを室温でさらに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白色96ウェルプレートに移し、SpectraMax Lを用いて発光を測定した。図29Aは、抗原依存性様式でCD16aレポーター細胞を活性化する、58E05-Fcの能力を図示する。図29Bは、Jurkatレポーター細胞を活性化するhz58E05v55-Fcおよびhz1A5v53Fcの能力を図示するが、比較物のB7H3-mAb IgG1抗体は、この能力を示さなかった。

20

【0601】

実施例9: 制約付きCD3結合を有する追加の構築物の作製

実施例9は、制約付きCD3結合を示すCD3結合領域を含有する多重特異性ポリペプチド構築物の作製および発現を記載する。多重特異性構築物を、CD3結合領域にリンカー (例えば、切断不可能なリンカー) 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、および、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、かつ/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づけられた、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するように、様々な配置で作製した。

30

【0602】

A. 構築物の設計および作製

ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の少なくとも第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドを作製して、発現のためにプラスミド中にクローニングした。第1のポリペプチド鎖は概して、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) ; 切断不可能なリンカー ; 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概して、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じ切断不可能なリンカー ; 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に示されるような、ジスルフィド安定化 (dsFv) 抗体 (変異G44Cを有する抗CD3 VHおよび変異G100Cを有するVL) を含むか、または非ジスルフィド安定化Fv抗体を含有していた。ポリペプチド鎖のヘテロ二量体化を促進する様々な例示的なFcポリペプチドのペアを、表E5に示されるように用

40

50

いた。ポリペプチド鎖の一方または両方は、追加的に、Fcドメインのアミノ末端、かつ/またはCD3結合領域のカルボキシ末端の1つまたは複数のTAA抗原結合ドメインを、様々な配置でコードしていた。類似した構築物を、記載されているいずれかなどの、他のノブイントゥホール配置を含む他のヘテロ二量体Fc配置；dsFvもしくは他の一価断片を含む、他の抗CD3抗体を含む、他のCD3結合領域；または他のTAA抗原結合断片を用いて作製することができ、例えば、scFv、sdAb、またはFab形式もまた、用いることができる。

【0603】

作製された構築物の中で、切断不可能なリンカーは、3～18アミノ酸の範囲にわたるサイズのリンカーを含んでいた。例示的な作製された分子において用いられた切断不可能なリンカーの例は、

GGG, GGSGGS (SEQ ID NO:191), GGSGGSGGS (SEQ ID NO:192), GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:193), GGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:194), およびGGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:317)

、例示的な構築物cx5823およびcx5952に含有される)、またはGGSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:319)

であった。

【0604】

TAAに結合する任意の抗原結合ドメインを、提供される多重特異性ポリペプチド構築物において使用することができる。例示的な作製されたタンパク質は、B7H3 (CD276) に結合する抗原結合ドメインを含有していた。抗原結合ドメインは、一本鎖断片 (例えば、sdAbもしくはscFv) または二本鎖抗原結合断片 (Fab) を含むことができる。TAAが、一本鎖断片、例えば、sdAbまたはscFvとして提供された場合、TAA抗原結合ドメインは、ペプチドリンカー、例えば、PGGGG (SEQ ID NO:444) 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) のN末端に連結され、かつ/または、ペプチドリンカー、例えば、GGGG (SEQ ID NO:195) 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) のC末端に連結された。他の類似したペプチドリンカーを、使用することができる。TAAが、Fab抗原結合断片として提供された場合、構築物は、リンカーを含まずに一方または両方のFcポリペプチドに直接連結されたVHおよびCH1、ならびにVLおよびCLから構成された軽鎖から構成された。これらのTAA結合Fabは、ヘテロ二量体Fcのアミノ末端またはカルボキシ末端に位置することができる。

【0605】

例えば、それぞれ一価、二価、三価、または四価の結合を提供するために、1、2、3、または4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作製した。場合によっては、TAA抗原結合ドメインは同じであった (モノエピトープ (mono-epitopic))。場合によっては、作製された多重特異性ポリペプチド構築物が、同じTAAの異なるエピトープ (バイエピトープ) または同じTAAの同じエピトープ (モノエピトープ) に対して、少なくとも2つの異なるTAAへの特異性を示すように、TAA抗原結合ドメインは異なっていた。

【0606】

作製されたタンパク質の中には、TAA抗原結合ドメインが、抗原結合断片 (Fab) のシングルドメイン抗体 (sdAb) として構成された構築物があった。ポリヌクレオチドを、切断不可能なリンカーを含有す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ように作製した。これらには、図30Aおよび30Bに図示されるような、B7H3を標的とするcx3072、cx5952、cx6079、cx6080、cx6081、cx5823、cx5873、およびcx5965と称されるsdAb含有構築物；ならびに、図30Cに図示されるような、B7H3を標的とするcx5067、6083、および6084と称されるFab含有構築物が含

まれた。dsFv抗CD3抗体のVHドメインおよびsdAbが両方とも、Fcヘテロ二量体の同じ側（例えば、ホール側またはノブ側）に連結されたいくつかの構築物を作製した（例えば、図30Aに示されるcx3072およびcx5952）。構築物を、ジスルフィド安定化Fvを伴わずに操作したか、または抗CD3抗体のVHおよびVLドメインを安定化するジスルフィド結合を伴って操作した。注目すべきことに、作製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sdAb（それぞれSEQ ID NO: 468、469、および470に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する；例えば、SEQ ID NO: 400）を追加的に含有していた（例えば、cx5823、cx5873、cx5965）。sdAbおよびFab TAAドメインを有する例示的な制約付きCD3結合構築物のリストを、以下の表E5に示す。

10

【 0 6 0 7 】

(表E5) 例示的な制約付きCD3エンゲージング構築物

構築物 ID	鎖	N末端 sdAb (標的)	Fc	リンカー	CD3 結合 ドメイン	C末端 sdAb (標的)	ジスルフィド 安定化
cx5823	1	B7H3 sdAb 4 hz1A5v5 1 (SEQ ID NO:467)	xELL-ノブ (SEQ ID NO:299)	GGGGGSGGGG GS GGGGGS (SEQ ID NO:317)	VH13 (SEQ ID NO: 237)	B7H3 sdAb 5 hz58E05v55 (SEQ ID NO:466)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:304)	GGGGGSGGGG GS GGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VL10 (SEQ ID NO: 265)	共刺激受容体 sdAb	
cx5952	1	B7H3 sdAb 4 hz1A5v5 1 (SEQ ID NO:467)	xELL-ノブ (SEQ ID NO: 299)	GGGGGSGGGG GS GGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VH13 (SEQ ID NO: 237)	B7H3 sdAb 5 hz58E05v55 (SEQ ID NO:466)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO: 304)	GGGGGSGGGG GS GGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VL10 (SEQ ID NO: 265)	なし	
cx6079	1	B7H3 sdAb 4 hz1A5v5 1 (SEQ ID NO:467)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO:457)	GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO:318)	VH32 (SEQ ID NO: 460)	なし	なし
	2	B7H3 sdAb 4 hz1A5v5 1 (SEQ ID NO:467)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO:458)	GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 318)	VL20 (SEQ ID NO: 461)	なし	
cx6080	1	B7H3 sdAb 4 hz1A5v5 1 (SEQ ID NO:467)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO:457)	GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 318)	VH33 (SEQ ID NO: 480)	なし	あり

20

30

40

構築物 ID	鎖	N末端 sdAb (標的)	Fc	リンカー	CD3 結合 ドメイン	C末端 sdAb (標的)	ジスルフィド 安定化
	2	B7H3 sdAb 4 hz1A5v5 1 (SEQ ID NO:467)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO:458)	GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 318)	VL21 (SEQ ID NO: 459)	なし	
cx6081	1	B7H3 sdAb 4 hz1A5v5 1 (SEQ ID NO:467)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO:457)	GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 318)	VH13 (SEQ ID NO: 237)	なし	あり
	2	B7H3 sdAb 4 hz1A5v5 1 (SEQ ID NO:467)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 458)	GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 318)	VL10 (SEQ ID NO: 265)	なし	
cx3072	1	B7H3 sdAb 2 hz58E05 v27 (SEQ ID NO:67)	IgG1- ノブ (SEQ ID NO:293, 297 または 445)	GGGGGS GGGG GSGGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VH13 (SEQ ID NO: 237)	B7H3 sdAb 1 hz57B04v24 (SEQ ID NO:503, 例えば43)	あり
	2	なし	IgG1- ホール (SEQ ID NO:294, 298 または 446)	GGGGGS GGGG GSGGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VL10 (SEQ ID NO: 265)	なし	
cx5873	1	なし	xELL- ノブ (SEQ ID NO:295, 299)	GGGGGS GGGG GSGGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VH13 (SEQ ID NO: 237)	B7H3 sdAb 3 hz58E05v48 (SEQ ID NO:85)	あり
	2	なし	xELL- ホール (SEQ ID NO:302, 304)	GGGGGS GGGG GSGGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VL10 (SEQ ID NO: 265)	共刺激 受容体 sdAb	
cx5965	1	B7H3 sdAb 4 hz1A5v5 1 (SEQ ID NO:467)	xELL- ノブ (SEQ ID NO:295, 299)	GGGGGS GGGG GSGGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VH13 (SEQ ID NO: 237)	なし	あり

10

20

30

40

構築物 ID	鎖	N末端 sdAb (標的)	Fc	リンカー	CD3 結合 ドメイン	C末端 sdAb (標的)	ジスルフィド 安定化
	2	なし	xELL- ホール (SEQ ID NO:302, 304)	GGGGGSGGGG GSGGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VL10 (SEQ ID NO: 265)	共刺激 受容体 sdAb	
cx5187	1	B7H3 sdAb 4 hz1A5v5 1 (SEQ ID NO:467)	xELL- ノブ (SEQ ID NO:295, 299)	GGGGGSGGGG GSGGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VH13 (SEQ ID NO: 237)	B7H3 sdAb 3 hz58E05v48 (SEQ ID NO:85)	あり
	2	なし	xELL- ホール (SEQ ID NO:302, 304)	GGGGGSGGGG GSGGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VL10 (SEQ ID NO: 265)	共刺激 受容体 sdAb	
cx5067	1	B7H3- Fab (SEQ ID NOs: 455,456)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO: 457)	GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO:318)	VH32 (SEQ ID NO: 460)	なし	なし
	2	B7H3- Fab (SEQ ID NOs: 455,456)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 458)	GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 318)	VL20 (SEQ ID NO: 461)	なし	
cx6083	1	B7H3- Fab (SEQ ID NOs: 455,456)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO: 457)	GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 318)	VH33 (SEQ ID NO: 480)	なし	あり
	2	B7H3- Fab (SEQ ID NOs: 455,456)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 458)	GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 318)	VL21 (SEQ ID NO: 459)	なし	
cx6084	1	B7H3- Fab (SEQ ID NOs: 455,456)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO: 457)	GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 318)	VH13 (SEQ ID NO: 237)	なし	あり
	2	B7H3- Fab (SEQ ID NOs: 455,456)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 458)	GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO: 318)	VL10 (SEQ ID NO: 265)	なし	

10

20

30

40

【 0 6 0 8 】

B. 作製された構築物の発現および精製

ヘテロ二量体制約付き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用いて哺乳類細胞（HEK293またはCHOのいずれか）中に等モル比で一過性に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クロマトグラフィーによって、およびその後の調製用サイズ排除クロマトグラフィー（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ー（HIC）のいずれかによって精製した。場合によっては、ヘテロ二量体タンパク質を、ヘテロ二量体Fcの一方の鎖中の位置I253RまたはH435R（例えば、ホール-Fc中）での、そ

50

れがプロテインAに結合せず、したがってI253RまたはH435Rのホモ二量体が精製されないように設計された変異のために、精製中に濃縮された。SEC (Superdex-200レジンを有するAKTA) またはFT-HIC (ブチル/フェニルセファロースを有するAKTA) による第2のクロマトグラフィー工程を用いて、より疎水性であり、かつ期待される分子量の2倍である、2つのヘテロ二量体Fcを含有する望ましくないクロスペア種を除去した。

【0609】

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) の妥当なペア種を含有する、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の生成に好都合であった。精製されたヘテロ二量体制約付きCD3結合タンパク質は、安定であり、4 での長期のインキュベーションまたはタンパク質濃度の増加時にクロスペア種を蓄積しなかった。

10

【0610】

実施例10：フローサイトメトリーによるがん細胞および初代T細胞に対する制約付きCD3結合構築物の結合の評価

本実施例は、T細胞またはがん細胞に対する例示的な構築物の結合を評価する研究を記載する。これらの研究は、互いから単離状態のT細胞のみまたはがん細胞のみのいずれかを含有する単一培養物において実施した。

【0611】

B7H3に対する抗原結合ドメインを含有する例示的な多重特異性構築物の結合を、B7H3陽性A375腫瘍細胞または初代T細胞に対する結合について評価した。sdAbまたはFABのいずれかであり、および、FcのN末端であるだけであるか、またはFcのN末端かつ抗CD3結合ドメインのC末端の両方であるかのいずれかで位置づけられた抗原結合ドメインを含有する構築物を作製した (図30Aおよび30C、ならびに表E5を参照されたい)。試験した様々な形式の構築物の中には、sdAb-Fc-dsFV-sdAb (cx3072、cx5952)、sdAb-Fc-FV (cx6079)、sdAb-Fc-dsFV (cx6080、cx6081)、MAB-FV (cx5067)、およびMAB-dsFV (cx6083、cx6084) が含まれ、ここで、FVは、VHおよびVLドメインのペアから構成された抗CD3結合ドメインを表し、「ds」は、操作されたドメイン間ジスルフィド結合を介して安定化されたジスルフィドを示す。

20

【0612】

図31A~Fは、これらの構築物が、B7H3に結合できたが、単離状態のT細胞には結合できなかったことを実証する。結合は、蛍光体コンジュゲート抗ヒトFc二次抗体を用いたフローサイトメトリーを介して、上記のように評価した。cx3072は、高親和性でA375細胞に結合した (図31A) が、単離されたT細胞には結合しなかった (図31B)。試験したsdAb-Fc-dsFV-sdAb (cx5952) は、FAB含有MAB-FV (cx5067) およびMAB-dsFV構築物 (cx6083、cx6084) と比較してより高い結合親和性を示した (図31C)。B7H3を標的とするsdAbを含有する構築物 (cx5952、cx6079、cx6080、およびcx6081) は、類似した親和性でB7H3陽性細胞に結合し (図31Eに図示される)、cx5952がより高い最大結合を示した。cx6079、cx6080、およびcx6081は、2つの同一のB7H3を標的とするsdAbを含有するが、cx5952およびcx3072は、異なるエピトープに結合する2つの別個のB7H3を標的とするsdAbを含有する。MAB-FVであるcx5067は、2つの同一のB7H3を標的とするFABドメインを含有する。注目すべきことに、図31B、31D、および31Fに図示されるように、例示的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物のいずれも、初代ヒトT細胞には結合しなかった。これらの結果は、単離状態のT細胞上のCD3に対する結合が、提供される形式において制約されていることをさらに支持する。

30

40

【0613】

実施例11：B7H3を標的とする制約付きCD3結合構築物のT細胞活性化活性の評価

腫瘍関連抗原結合ドメインとしてB7H3を標的とするsdAbまたはFabのいずれかを含有する構築物を、T細胞レポーターアッセイにおいておよびT細胞細胞傷害活性アッセイにおいて、T細胞活性化活性について評価した。抗原結合ドメインとして抗B7H3 sdAbを

50

有する形式をしたB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物（例えば、cx5823、cx6079、cx6080、cx6081、cx3072、およびcx5952）またはFabを有する形式をした抗B7H3 MAB構築物（例えば、cx5067、cx6083、またはcx6084）の活性を評価した（図30A～30Cおよび表E5を参照されたい）。cx5067およびcx6079以外の試験した構築物はすべて、VL G100Cとペア形成した抗CD3 VH G44Cの改変によって創出された鎖間ジスルフィド結合を含有するジスルフィド安定化抗CD3 Fv（dsFv）を含有していた。MAB-Fvと称されるcx5067の抗CD3 FvおよびsdAb-Fc-Fvと称されるcx6079の抗CD3 Fvは、ジスルフィド安定化されていなかった。

【0614】

A. T細胞レポーター活性

NFAT-GFP CD3 Jurkatレポーターを用いて、B7H3陽性細胞（A375）またはB7H3発現を天然に欠如している非標的CCRF-CEM細胞の存在下で共培養した場合の、B7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物のCD3アゴニスト特性を比較した。Jurkat細胞は、NFAT駆動緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する。CD3のアゴニズムは、NFATシグナル伝達および緑色蛍光の生成を結果としてもたらす。

【0615】

抗原を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物を、標的細胞と、NFAT駆動緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する操作されたJurkat細胞との共培養上で滴定した。このアッセイにおいて、標的細胞株は、A375またはCCRF-CEMのいずれかを含んでいた。接着性の抗原発現標的細胞を利用するレポーターアッセイについては、標的細胞を播種し、均一な分布のために室温で静置させて、数時間37℃でインキュベートして接着させ、その後、レポーター細胞および抗原を標的とする制約付き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システムを用いて連続的に画像化し、合計の積分された緑色オブジェクトを測定することによって、CD3レポーター細胞活性化を判定した。

【0616】

このアッセイにおいて、抗B7H3 sdAb構築物であるcx5823、cx6079、cx6080、およびcx6081、または抗B7H3 Fab構築物であるcx5067、cx6083、およびcx6084を、B7H3ターゲティングドメインとして用いた。図32Aに示されるように、B7H3を標的とするsdAbを含有する構築物は、抗原依存性CD3活性化の類似した効力を示した。図32Cに示されるように、B7H3を標的とするsdAbを含有する例示的なcx5823構築物は、B7H3を標的とするFabを含有する構築物と比較して、抗原依存性CD3活性化の媒介が優れていることが見出された。cx5823は、共刺激受容体に対する結合ドメインを有する形式をしているが、Jurkat T細胞は共刺激受容体を発現しないため、この構成要素が結果における差に寄与した可能性は低い。構築物のいずれも、B7H3陰性CCRF-CEM細胞に対する活性を実証しなかった（図32Bおよび32D）。

【0617】

B. 細胞傷害活性

分子の活性をさらに評価するために、例示的なB7H3を標的とする構築物であるcx3072およびcx5952（各々sdAb-dsFvとしての形式をしている）、cx6083およびcx6084（MAB-dsFv）、cx5067（MAB-Fv）、cx6079（sdAb-Fv）、ならびにcx6080およびcx6081（sdAb-dsFv）を、T細胞媒介性細胞傷害活性アッセイにおいて試験した。標的細胞は、B7H3陽性細胞株であるA375、および、B7H3遺伝子がCRISPRによって破壊された改変A375細胞（A375:B7H3 KD）またはB7H3発現を天然に欠如しているCCRF-CEM細胞のいずれかを含んでいた。標的細胞を、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させて、数時間37℃でインキュベートした。初代T細胞を、健常ヒトドナーleukopakより単離されたPBMCからネガティブ濃縮し、10:1のT細胞対標的細胞の比で添加した。緑色カスパーゼ-3/7試薬を添加し、これは、アポトーシスを受けている細胞の核DNAを蛍光標識する。制約付きCD3エンゲージング活性を有する多重特異性構築物を、共培養上で滴定し、Incucyte ZOOMシステムを用

10

20

30

40

50

いてアッセイプレートを連続的に画像化した。合計の赤色/緑色 重複オブジェクト面積を測定することによって、標的細胞の死を判定した。

【0618】

図33Aおよび33Bに示されるように、sdAbのB7H3を標的とする抗原結合ドメインを含有する例示的な構築物cx3072およびcx5952は、B7H3陽性細胞(A375)の強力なT細胞媒介性細胞傷害活性を誘導したが、B7H3陰性細胞のものは誘導しなかった。

【0619】

FabのB7H3ターゲティングドメインを有する例示的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージャー(cx5067、cx6083、およびcx6084)と比較した場合に、例示的なsdAbのB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージャーであるcx5952は、増強された標的依存性T細胞細胞傷害活性を媒介した(図34A)。いかなる測定可能なT細胞細胞傷害活性も、試験した構築物のいずれかについてB7H3陰性細胞株CCRF-CEMに対して観察されず、これは、抗原依存性T細胞活性化を強力に誘導する能力と一貫していた(図34B)。試験した構築物のうち、代表的なMAB-dsFV構築物であるcx6084およびcx6083は、操作されたジスルフィドを含有していたのに対して、代表的なMAB-FV構築物であるcx5067は、この安定化改変を欠如していた。注目すべきことに、cx6083とcx5067とは、(図30Cに図示される)抗CD3 FVドメイン内の操作されたジスルフィドの存在(cx6083)または不在(cx5067)を除いては同一である。操作されたジスルフィドは、VH内のG44CおよびVL内のG100Cの改変によって創出された。図34Aに示されるように、cx6083は、cx5067と比較して、標的依存性T細胞細胞傷害活性の媒介において優れた効力を示し、これは、ドメイン間ジスルフィドの組入れが、恐らく、抗CD3 FVを構成するVHドメインおよびVLドメインの妥当な会合を増強することによって、T細胞媒介性細胞傷害活性において有益であることを示唆する。

【0620】

sdAbのB7H3ターゲティングドメインを有する他の例示的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージャー(cx6079、cx6080、およびcx6081)と比較した場合に、例示的なsdAbのB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージャーであるcx5952は、増強された標的依存性T細胞細胞傷害活性を媒介した(図34C)。いかなる測定可能なT細胞細胞傷害活性も、試験した構築物のいずれかについてB7H3陰性細胞株CCRF-CEMに対して観察されず、これは、抗原依存性T細胞活性化を強力に誘導する能力と一貫していた(図34D)。試験した構築物のうち、sdAb-dsFV構築物であるcx5952、cx6080、およびcx6081は、操作されたジスルフィド結合を含有していたのに対して、sdAb-FV構築物であるcx6079は、この安定化改変を欠如していた。操作されたジスルフィドは、VH内のG44CおよびVL内のG100Cの改変によって創出された。注目すべきことに、cx5952は、1つはアミノ末端に位置し、1つはカルボキシ末端に位置する、2つの別個のB7H3ターゲティングドメインを有するように操作されていた。cx6079、cx6080、およびcx6081は、両方ともアミノ末端に位置する、2つの同一のB7H3ターゲティングドメインを有するように操作されていた(図30Aを参照されたい)。

【0621】

C. T細胞調節

T細胞調節をさらに評価するために、T細胞活性化マーカーを調節する構築物の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制約付き結合構築物を評価した。T細胞活性化を評価するために、例示的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物であるcx5952の存在下での、T細胞とB7H3陽性細胞(A375)またはB7H3陰性細胞(CCRF-CEM)との培養物を含む、上記のT細胞細胞傷害活性アッセイ由来の浮遊細胞を収集した。細胞を、live/deadステイン、ならびに蛍光体コンジュゲート抗CD4、抗CD8、抗CD25、抗CD69、および/または抗CD71抗体で染色した。細胞を、SONY SA3800スペクトルアナライザーを用いて解析し、CD4+ T細胞またはCD8+ T細胞の活性化を、CD25、CD69、もしくはCD71の発現レベル、またはCD25、CD69、もしくはCD71陽性細胞のパーセントを測定することによって判定した。

【0622】

cx5952の存在下でのB7H3陽性細胞（A375）またはB7H3陰性細胞（CCRF-CEM）との共培養後のCD4+ T細胞およびCD8+ T細胞上のCD25発現（図35A）、CD69発現（図35B）、およびCD71発現（図35C）について、結果を示す。CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞におけるCD25、CD69、およびCD71の発現の増加によって証明されるように、結果は、cx5952が、CD3結合を介して用量依存的なB7H3依存性T細胞活性化を媒介したことを示した。

【0623】

sdAbのB7H3ターゲティングドメインを有する他の例示的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージャー（cx6079、cx6080、およびcx6081）と比較した場合に、例示的なsdAbのB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージャーであるcx5952は、CD4+ T細胞における（図35D）およびCD8+ T細胞における（図35H）CD25の発現の増加、ならびにCD4+ T細胞における（図35F）およびCD8+ T細胞における（図35J）CD71の発現の増加によって証明されるように、増加したT細胞活性化を媒介した。T細胞上の表面マーカーの発現の増加は、B7H3陰性細胞株との培養においては、B7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージャー構築物の存在下で観察されなかった（CD4+ T細胞について図35Eおよび35G、ならびにCD8+ T細胞について図35Iおよび35K）。

【0624】

D. T細胞サイトカイン産生

cx5952、cx6083、cx6084、またはcx5067の存在下でのT細胞とB7H3陽性A375細胞またはB7H3陰性CCRF-CEM細胞との共培養を含む、T細胞細胞傷害活性腫瘍細胞共培養アッセイからの上清を、サンドイッチELISAによってIFN 含量について解析した。標準曲線を作製し、それから上清試料のサイトカイン濃度値を内挿した。検出下限よりも下の吸光度値を有した試料には、最低標準濃度の半分と同等のサイトカイン濃度を割り当てた。図36Aに示されるように、代表的なsdAb-Fc-dsFV-sdAb構築物であるcx5952は、活性化T細胞からの標的依存性のサイトカイン放出の惹起において、試験したB7H3を標的とするFAB含有構築物であるcx6083、cx6084、およびcx5067よりも優れていた。重要なことに、MAB-dsFV構築物であるcx6083およびcx6084は、MAB-FV構築物であるcx5067よりも優れており、これは、T細胞機能を増強するためのドメイン間ジスルフィド安定化改変の重要性を実証した。

【0625】

sdAbのB7H3ターゲティングドメインを有する他の例示的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージャー（cx6079、cx6080、およびcx6081）と比較した場合に、例示的なsdAbのB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージャーであるcx5952は、B7H3標的細胞、T細胞の存在下ではIFN の産生の増加を実質的に媒介したが、B7H3陰性細胞株との培養においては媒介しなかった（図36B）。

【0626】

E. 要約

これらの観察は、本明細書において提供される抗原を標的とする制約付きCD3形式が、強力なB7H3依存性T細胞細胞傷害活性を誘導する能力を維持しながら、単離状態ではT細胞結合を欠如しているか、または低減したT細胞結合を示すことをさらに支持する。理論に束縛されることは望まないが、これらの結果は合わせて、Fabの代わりに抗原を標的とするsdAbを利用することが、TAA発現腫瘍細胞とCD3発現T細胞との間の免疫シナプス距離を低減させ、T細胞の活性および細胞傷害活性を増強し得ることを示す。注目すべきことに、VL G100Cとペア形成した抗CD3 VH G44Cの改変によって創出される鎖間ジスルフィド結合を含めることが、制約付きCD3エンゲージング構築物の活性を大きく増強したことが見出された。さらに、他のsdAb B7H3ターゲティングドメイン構築物と比較してより強力な、cx5952によるB7H3依存性T細胞活性によって、抗CD3結合ドメインのC末端の、B7H3を標的とするsdAbの位置づけ、または、cx5952はB7H3上の2つの別個のエピトープに結合するのに対して、試験した他の構築物は単一のエピトープに

二価様式で結合するという事実が、この活性の増強に寄与したことが示唆される。

【0627】

実施例12：単一または複数のB7H3結合ターゲティングドメインを含有するCD3制約付き多重特異性構築物の評価

(N末端またはC末端のいずれかに位置づけられた)一価のsdAb抗原結合ドメインを含有する構築物の活性を、N末端およびC末端の両方に位置づけられた、抗原を標的とするsdAbを含有する、二重に結合する(二価の)構築物の活性と比較した。結合は、実質的に実施例10に記載されるように評価し、T細胞活性は、実質的に実施例11に記載されるように、JurkatレポーターアッセイおよびT細胞細胞傷害活性アッセイにおいて評価した。

10

【0628】

A. 結合

図37Aに示されるように、二価のB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物であるcx5187およびcx5823は、一価バージョンであるcx5873およびcx5965と比較して、B7H3陽性A375細胞に対してより高親和性の結合を示した。これらの構築物はいずれも、B7H3陰性CCRF-CEM細胞または単離されたT細胞に対していかなる検出可能な結合も示さなかった(図37B)。

【0629】

B. T細胞レポーター活性

抗原を一価様式または二価様式でエンゲージする、抗原を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物のB7H3抗原依存性のCD3アゴニスト能力を、実質的に上記のようなアッセイにおいて、CD3-NFAT Jurkatレポーター細胞を用いて評価した。図37Cに示されるように、例示的な一価構築物であるcx5873およびcx5965についてのレポーター活性と比較して、実質的に増加した蛍光レポーター活性が、例示的な二価のB7H3を標的とする構築物であるcx5187の存在下で観察された。構築物を、B7H3陰性CCRF標的細胞と共培養したJurkatレポーター細胞とインキュベートした場合には、いかなるレポーター活性も観察されなかった(図37D)。

20

【0630】

C. 細胞傷害活性

B7H3を標的とするCD3制約付き結合構築物の細胞傷害活性を、それぞれB7H3陽性細胞株およびB7H3陰性細胞株として用いた、黒色腫細胞株A375およびT細胞急性リンパ芽球性白血病細胞株CCRF-CEMに対して評価した。細胞傷害活性は、実質的に実施例11に記載されるように評価した。図38Aに示されるように、例示的な二価のB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物であるcx5187は、一価バージョンの構築物であるcx5873およびcx5965と比較して、増強された標的依存性T細胞媒介性細胞傷害活性を示した。これらのアッセイにおいて、CCRF-CEM細胞を標的細胞として用いた図38Bに示されるように、標的細胞のB7H3発現の非存在下では、いかなる細胞傷害活性も観察されなかった。

30

【0631】

D. T細胞調節

T細胞調節を、実質的に実施例11に記載されるように、cx5187、cx5873、またはcx5965の存在下でのT細胞とB7H3陽性細胞(A375)またはB7H3陰性細胞(CCRF-CEM)との培養を含む、上記のT細胞細胞傷害活性アッセイ由来の浮遊細胞において、CD25の発現をモニタリングすることによって評価した。図39Aおよび39Bに示されるように、例示的な二価のB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物であるcx5187は、CD4 T細胞およびCD8 T細胞上のCD25上方制御の効力の増強によって証明されるように、一価バージョンの構築物であるcx5873およびcx5965と比較して、増強された標的依存性T細胞媒介性活性化を示した。これらのアッセイにおいて、CCRF-CEM細胞を標的細胞として用いた図39Cおよび39Dに示されるように、標的細胞のB7H3発現の非存在下では、いかなるT細胞活性化も観察されなかった。これらの結果は、B7H3を標

40

50

的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が、CD4 T細胞およびCD8 T細胞の両方の強力な抗原依存性活性化を誘導したことを実証した。

【0632】

D. 要約

合わせると、これらの結果は、二価の抗原を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が、一価の抗原を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物よりも、優れた抗原依存性のCD3結合および活性を示したことを実証する。これらの結果は、N末端およびC末端の両方に位置づけられた二重の抗原結合ドメインを含有する構築物が、単一の二価抗原結合ドメインのみを含有する一価構築物よりも、優れた結合およびT細胞活性を有するという知見と一貫している。さらに、理論に束縛されることは望まないが、sdAbのうちの1つをCD3結合ドメインのC末端に位置づけることは、sdAbがFcのN末端に位置づけられただけの構築物と比較して、より至適の免疫シナプスを形成する可能性があり、それは、後者が免疫シナプス距離を増加し得るためである。

10

【0633】

実施例13：B7H3を標的とするsdAbドメインおよびFabドメインを含有するCD3制約付き多重特異性構築物の評価

腫瘍関連抗原結合ドメインとしてB7H3を標的とするsdAbまたはFabのいずれかを含有する構築物を、T細胞活性化活性について評価した。抗原結合ドメインとして抗B7H3 sdAbを有する形式をしたB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物（例えば、cx5952およびcx6079）またはFabを有する形式をした抗B7H3 MAB構築物（例えば、cx5067、cx6083、またはcx6084）の活性を評価した（図30Aおよび30C、ならびに表E5を参照されたい）。cx6079およびcx5067以外の試験した構築物はすべて、VL G100Cとペア形成した抗CD3 VH G44Cの改変によって創出された鎖間ジスルフィド結合を含有するジスルフィド安定化抗CD3 Fv (dsFv) を含有していた。MAB-Fvと称されるcx5067の抗CD3 FvおよびsdAb-Fc-Fvと称されるcx6079の抗CD3 Fvは、ジスルフィド安定化されていなかった。追加的に、cx5952は、1つはFcドメインのN末端に位置し、1つはCD3結合ドメインのC末端に位置する、2つの別個のB7H3ターゲティングsdAbドメインを含有するように操作されていた。対照的に、cx6079は、両方ともFcドメインのN末端に位置する、2つの同一のB7H3ターゲティングsdAbドメインを含有するように操作されていた。3つのFab構築物すべてのFvは、FcドメインのN末端であるように操作されていた。

20

30

【0634】

A. 細胞傷害活性

B7H3を標的とするCD3制約付き結合構築物の細胞傷害活性を、実質的に実施例11に記載されるように評価した。細胞傷害活性を、それぞれB7H3陽性細胞株およびB7H3陰性細胞株として用いた、黒色腫細胞株A375およびT細胞急性リンパ芽球性白血病細胞株CCRF-CEMに対して評価した。図40Aに示されるように、B7H3を標的とするsdAbを有する形式をした例示的な制約付きCD3エンゲージング構築物であるcx5952およびcx6079は、抗原依存性T細胞細胞傷害活性の惹起において、Fabを有する形式をした抗B7H3 MAB構築物であるcx5067、cx6083、およびcx6084と比較して優れていた。注目すべきことに、cx5952はcx6079よりも強力であり、これは、抗CD3結合ドメインのC末端の、B7H3を標的とするsdAbの位置づけ、および/または操作されたジスルフィドを介した抗CD3 Fvの安定化が、この活性の増強に寄与したことを示唆した。これらのアッセイにおいて、図40Bに示されるように、B7H3陰性CCRF-CEM細胞である標的細胞の存在下では、いかなる細胞傷害活性も観察されなかった。

40

【0635】

B. T細胞調節

T細胞調節をさらに評価するために、実質的に実施例11に記載されるように、T細胞活性化マーカーを調節する構築物の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制約付き結合構築物を評価した。T細胞活性化を評価するために、例示的なB7H3

50

を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の存在下でのT細胞とB7H3陽性細胞（A375）またはB7H3陰性細胞（CCRF-CEM）との培養を含む、上記のT細胞細胞傷害活性アッセイ由来の浮遊細胞を収集した。試験した構築物は、sdAbを有する形式をした抗B7H3構築物（例えば、cx5952およびcx6079）ならびにFabを有する形式をした抗B7H3構築物（例えば、cx5067、cx6083、およびcx6084）を含んでいた。

【0636】

細胞を、live/deadステイン、ならびに蛍光体コンジュゲート抗CD4、抗CD8、抗CD25、および/または抗CD71抗体で染色した。細胞を、SONY SA3800スペクトルアナライザーを用いて解析し、CD4+ T細胞またはCD8+ T細胞の活性化を、CD25もしくはCD71の発現レベル、またはCD25もしくはCD71陽性細胞のパーセントを測定することによって判定した。

10

【0637】

記載される構築物の存在下での、B7H3陽性細胞（A375）またはB7H3陰性細胞（CCRF-CEM）との共培養後のCD4+ T細胞およびCD8+ T細胞上のCD25発現（図40C～F）およびCD71発現（図40G～J）について、結果を示す。CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞におけるCD25およびCD71の発現の増加によって証明されるように、結果は、cx5952が、CD3結合を介して用量依存的なB7H3依存性T細胞活性化を媒介したことを示した。cx5952は、T依存性T細胞活性化の誘導において、他のB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物を上回って最も強力であった。

【0638】

20

C. T細胞サイトカイン産生

cx5952、cx6079、cx6083、cx6084、またはcx5067の存在下でのT細胞とB7H3陽性であるA375または陰性であるCCRF-CEM細胞との共培養を含む、T細胞細胞傷害活性腫瘍細胞共培養アッセイからの上清を、サンドイッチELISAによってIFN 含量について解析した。標準曲線を作製し、それから上清試料のサイトカイン濃度値を内挿した。検出下限よりも下の吸光度値を有した試料には、最低標準濃度の半分と同等のサイトカイン濃度を割り当てた。図40Kに示されるように、代表的なsdAb-Fc-dsFV-sdAb構築物であるcx5952は、活性化T細胞からの標的依存性サイトカイン放出の惹起において、試験したB7H3を標的とするFAB含有構築物であるcx6083、cx6084、およびcx5067よりも優れていた。サイトカイン産生の増加は、B7H3陰性CCRF-CEM細胞の存在下では観察されなかったため、標的依存性であった（図40L）。これは、抗原依存性の細胞傷害活性および活性化アッセイからの知見と一貫している。重要なことに、MAB-dsFV構築物であるcx6083およびcx6084は、MAB-FV構築物であるcx5067よりも優れており、これは、T細胞機能を増強するためのドメイン間ジスルフィド安定化改変の重要性を実証した。

30

【0639】

D. 要約

合わせると、これらの結果は、抗B7H3 sdAb結合ドメインを有する形式をした制約付き抗CD3構築物が、抗原依存性T細胞細胞傷害活性の惹起において、Fab B7H3結合ドメインを有する形式をした抗B7H3 MAB構築物と比較して優れていたことを実証する。さらに、cx5952がcx6079よりも強力であったことは、CD3結合ドメインのC末端の、B7H3を標的とするsdAbの位置づけ、操作されたジスルフィドを介した抗CD3 FVの安定化、またはその両方が、活性の増強に寄与することを示唆した。理論に束縛されることは望まないが、sdAbのうちの1つをCD3結合ドメインのC末端に位置づけることは、sdAbがFcのN末端に位置づけられただけの構築物と比較して、より至適の免疫シナプスを形成する可能性があり、それは、後者が免疫シナプス距離を増加し得るためである。

40

【0640】

実施例14：B7H3ターゲティングドメインを含有するCD3制約付き多重特異性構築物におけるCD3結合領域の配向の比較

構築物中の抗CD3 FvのVHまたはVLが、ヘテロ二量体Fc領域のFc-ノブまたはFc-ホー

50

ルのいずれかに対してC末端に位置づけられた、CD3結合領域としてFvを含有する、追加のB7H3を標的とする多重特異性ポリペプチド構築物を作製した。作製されたCD3制約付き多重特異性ポリペプチド構築物を、T細胞レポーターアッセイにおいて、CD3エンゲージメントを介してT細胞を活性化する能力について評価した。

【0641】

A. 構築物の設計および作製

図41A～Bに示されるような、CD3結合領域にリンカー（例えば、切断不可能なリンカー）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づけられた、CRBRとしての4-1BB抗原結合ドメイン（例えば、それぞれSEQ ID NO: 468、469、および470に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有するsdAb；例えば、SEQ ID NO: 400）、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、かつ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た、B7H3腫瘍関連抗原（TAA）に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作製した。

10

【0642】

ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の少なくとも第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドを作製して、発現のためにプラスミド中にクローニングした。第1のポリペプチド鎖は概して、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）；切断不可能なリンカー；抗CD3抗体の可変軽鎖（VL；例えば、cx5187）または可変重鎖（VH；例えば、cx5841）ドメイン；およびCRBRとしての4-1BB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概して、N末端からC末端への順序で、第1のB7H3抗原結合ドメイン（例えば、B7H3 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じリンカー；抗CD3抗体の可変重鎖（VH）または可変軽鎖（VL）ドメインのもう一方；および第2のB7H3抗原結合ドメイン（例えば、B7H3 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（変異G44Cを有する抗CD3 VHおよび変異G100Cを有するVL）を含んでいた。

20

【0643】

注目すべきことに、図41A～Bに示されるように、CD3 Fvの抗CD3 VHおよび抗CD3 VLの配向を、ヘテロ二量体Fc領域のFcノブまたはFcホールに対して異なるように位置づけた。図41A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ノブのC末端に位置づけられたCD3 FvのVLと、最もN末端およびC末端のB7H3結合ドメインとを有し、かつヘテロ二量体構築物の第2のポリペプチドが、FcホールのC末端に位置づけられたCD3 FvのVHと、最もC末端の41BB結合物を有した、cx5841を作製した。対照的に、図41Bは、ヘテロ二量体構築物の第1のポリペプチドが、FcノブのC末端に位置づけられたCD3 FvのVHと、最もN末端およびC末端のB7H3結合ドメインとを有し、かつヘテロ二量体構築物の第2のポリペプチドが、FcホールのC末端に位置づけられたCD3 FvのVLと、最もC末端の41BB結合物を有した、例示的な構築物cx5187（実施例9に記載される）を図示する。

30

【0644】

例示的な作製された制約付きCD3結合構築物の構成要素を、表E6に示す。実質的に実施例9に記載されるように、構築物を発現させて精製した。

40

【0645】

（表E6）B7H3ターゲティングドメインを含有する例示的な制約付きCD3エンゲージング構築物

構築物 ID	鎖	N末端 sdAb (標的)	Fc	リンカー	CD3 結合 ドメイン	C末端 sdAb (標的)	ジスルフィド 安定化
cx5841	1	B7H3 sdAb 4 hz1A5v5 1 (SEQ ID NO:467)	xELL- ノブ (SEQ ID NO:295, 299)	GGGGGSGGGGG SGGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VL10 (SEQ ID NO: 265)	B7H3 sdAb 3 hz58E05v48 (SEQ ID NO:85)	あり
	2	なし	xELL- ホール (SEQ ID NO:302, 304)	GGGGGSGGGGG SGGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VH13 (SEQ ID NO: 237)	共刺激 受容体 sdAb (例えば、SEQ ID NO: 400)	
cx5187	1	B7H3 sdAb 4 hz1A5v5 1 (SEQ ID NO:467)	xELL- ノブ (SEQ ID NO:295, 299)	GGGGGSGGGGG SGGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VH13 (SEQ ID NO: 237)	B7H3 sdAb 3 hz58E05v48 (SEQ ID NO:85)	あり
	2	なし	xELL- ホール (SEQ ID NO:302, 304)	GGGGGSGGGGG SGGGGGS (SEQ ID NO: 317)	VL10 (SEQ ID NO: 265)	共刺激 受容体 sdAb (例えば、SEQ ID NO: 400)	

10

20

【 0 6 4 6 】

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に、例示的な構築物を、抗原依存性CD3レポーターアッセイにおいて、標的抗原発現細胞との共培養においてCD3 NFATレポーターJurkat細胞株を活性化その能力を評価することによって試験した。活性化は、Jurkatレポーター細胞における緑色蛍光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評価した。

30

【 0 6 4 7 】

B7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物を、B7H3を発現するA375細胞またはB7H3を発現しない対照CCRF-CEM細胞のいずれかと、NFAT駆動緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する操作されたJurkat細胞との共培養上で滴定した。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結果としてもたらす。接着性の標的細胞を利用するレポーターアッセイについては、標的細胞を播種し、均一な分布のために室温で静置させて、数時間37℃でインキュベートして接着させ、その後、レポーター細胞および抗原を標的とする制約付き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システムを用いて連続的に画像化し、合計の緑色オブジェクトの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判定した。

40

【 0 6 4 8 】

図42Aに示されるように、例示的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物は、B7H3発現標的細胞の存在下でレポーターT細胞共培養においてインキュベートした場合に、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、B7H3を発現しない細胞との共培養においては、レポーター活性が観察されなかった (図42B)。注目すべきことに、ノブ-VH；ホール-VL形式を有するcx5187は、ノブ-VL；ホール-VH形式を有するcx5841と比較して増強されたT細胞活性化を示した。

【 0 6 4 9 】

類似したアッセイにおいて、同じB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物を、B7H3を発現するA375細胞またはB7H3を発現しない対照CCRF-CEM細胞のい

50

れかと、NFAT駆動ルシフェラーゼを発現する操作されたJurkat細胞との共培養上で滴定した。図42Cに示されるように、例示的なB7H3を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物は、B7H3発現標的細胞の存在下でレポーターT細胞共培養においてインキュベートした場合に、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、B7H3を発現しない細胞との共培養においては、レポーター活性が観察されなかった（図42D）。GFPレポーターアッセイにおけるように、ノブ-VH；ホール-VL形式を有する構築物（cx5187）は、ノブ-VL；ホール-VH形式を有する構築物（cx5841）と比較して増強されたT細胞活性化を示した。

【0650】

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ホール領域のC末端に位置づけられるように、CD3 Fvの構成要素が配向される場合に、増強されたCD3エンゲージメントおよび活性が認められるという観察と一貫している。

【0651】

実施例15：B7H3 sdAbのエピトープマッピング

別個のエピトープに結合する様々なB7H3 sdAbの能力を、ストレプトアビジンコーティングされたセンサーおよびビオチン化組換えB7H3細胞外ドメインを有するForteBio Octetシステムを用いたバイオレイヤー干渉法（Bio-Layer Interferometry）（BLI）によって評価した。例示的なB7H3 sdAbは、抗原のエピトープに対する別の結合のプロッキングについてペアであった。結果を、以下の表E7に示す。

ビン1	ビン2	ビン3	ビン4
58E05	57B04	57B06	57B10
	1A5	57H12	
	1H5	58B06	
		57A12	
		57D01	

【0652】

本発明は、例えば、本発明の様々な局面を例証するために提供される特定の開示される態様に、範囲が限定されるようには意図されない。記載される組成物および方法に対する様々な改変は、本明細書における説明および教示から明らかになるであろう。そのような変形物は、本開示の真の範囲および精神から逸脱することなく実施されてもよく、本開示の範囲内に入るように意図される。

【0653】

配列

#	配列	注釈
1	QLQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPGKGPEWVSTIYSSGTGTFYADSVKGRFTISRNNAKNTLYLQMN SLKPDDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	L1A5
2	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPGKGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKPGG	hz1A5v1
3	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPGKGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRNNAKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKPGG	hz1A5v2
4	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPGKGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRNNAKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKPGG	hz1A5v3
5	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPGKGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRNNAKNTLYLQMS SLKPDDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKPGG	hz1A5v7

10

20

30

40

50

6	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAP KGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRNNAKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKPGG	hz1A5v8
7	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGPEWVSTIYSRGTGTFYAESVKGRFTISRNNAKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKPGG	hz1A5v9
8	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS RAEDTAVYYCATSGPVRGWGPWSQGTLVTVKP	hz1A5v12
9	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGPEWVSTIYSRGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v17
10	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS RAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRTQGTLVTVKP	hz1A5v24
11	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v25
12	EVQLVESGGGEVQAGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAP GKGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v28
13	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRTQGTLVTVKP	hz1A5v29
14	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSRGGSTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v30
15	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSSGTGTYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v31
16	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSRGGSTYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v32
17	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSRGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v33
18	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGREWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v34
19	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSYVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v35
20	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSFVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v36
21	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS RAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v37
22	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGYRSQGTLVTVKP	hz1A5v38

10

20

30

40

23	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v39
24	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFTSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v40
25	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPSGFSFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSRGTGTFYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v41
26	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSGFSFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSRGTGTFYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v42
27	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSRGTGTFYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRPEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v43
28	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSRGTGTYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v44
29	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSYVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSRGTGTFYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v45
30	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFGSNVMMWVRQAPG KGIEWVSTIYSRGTGTFYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSSL RAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v46
31	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSRGTGTFYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v47
32	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSYVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSRGTGTYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v48
33	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSRGTGTFYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v49
34	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSRGTGTYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v50
35	EVQLVQSGGGLVQAGDSLRLSCAPSERTFSTYTMGWFRQAPG KREFVAVVNWSGGSKYYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMN NSLKPEDTGYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGTQVTVK P	L57B04
36	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERTFSTYTMGWFRQAPG KREFVSVVNWSGGSKYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMN SLRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGTTLVTVKP GG	hz57B04v3
37	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERTFSTYTMGWFRQAPG KREFVAVVNWSGGSKYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMN SLRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGTTLVTVKP GG	hz57B04v4
38	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPSERTFSTYTMGWFRQAPGK EREFVAVVNWSGGSKYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMN LRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGTTLVTVKPG G	hz57B04v8

10

20

30

40

39	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERTFSTYTMGWFRQAPG KREFVAVVNWGGGSKYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLHMN SLRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGLVTVKPG GG	hz57B04v9
40	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPERTFSTYTMGWFRQAPGK EREFVAVVNWGGGSKYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGLVTVKPG	hz57B04v15
41	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPERTFSTYTMGWFRQAPGK EREFVAVVNWGGGSKYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LRAEDTAVYYCAAGGAYSTPYDTRQYTYWGQGLVTVKPG	hz57B04v20
42	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPERTFSTYTMGWFRQAPGK EREFVAVVNWGGGSKYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGLVTVKPG G	hz57B04v23
43	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPERTFSTYTMGWFRQAPGK EREFVAVVNWGGGSKYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGLVTVKPG G	hz57B04v24
44	EVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREP VATSHHGTTNYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LKPEDTG VYYCKADHGYNGRGYWGQGTQVTVKPG	L58E05
45	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KGREPVSTSHHGTTNYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMNSL RAEDTAVYYCKADHGYNGRGYWGQGLVTVKPGG	hz58E05v1
46	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREP VATSHHGTTNYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMNSL RAEDTAVYYCKADHGYNGRGYWGQGLVTVKPGG	hz58E05v2
47	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREP VATSHHGTTNYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNSL RAEDTAVYYCKADHGYNGRGYWGQGLVTVKPGG	hz58E05v3
48	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREP VATSHHGTTNYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LRAEDTAVYYCKADHGYNGRGYWGQGLVTVKPGG	hz58E05v4
49	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREP VATSHHGTTNYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPGG	hz58E05v5
50	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREP VATSHHGTTNYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LRAEDTAVYYCKADHGYNARGYWGQGLVTVKPGG	hz58E05v6
51	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREP VATSHHGTTNYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LRAEDTAVYYCKADHGYNTRGYWGQGLVTVKPGG	hz58E05v7
52	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREP VATSHHGTTNYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLMNS LRAEDTAVYYCKADHGYNGRGYWGQGLVTVKPGG	hz58E05v8
53	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREP VATSHHGTTNYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMNS LRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPGG	hz58E05v9
54	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREP VATSHHGTTNYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMNS LRAEDTAVYYCKADHGYNARGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v10

10

20

30

40

50

55	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNS LRAEDTAVYYCKADHGYNTRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v11
56	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVSTSHHGGTTNYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNSL RAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v13
57	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSLYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v16
58	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGK QREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNSL RAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v18
59	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v19
60	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSTYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v20
61	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSKYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v21
62	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSFYHMSWFRQAPGK QREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNSL RAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v22
63	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSDYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v23
64	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSRYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v24
65	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQSS LRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v25
66	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNT LRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v26
67	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGK QREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNTL RAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v27
68	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYNGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v28
69	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LKPEDTGYYCKADHGYNGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v29
70	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LRPEDTAVYYCKADHGYNGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v30
71	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LRPEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKPG	hz58E05v31

10

20

30

40

50

72	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGK QREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSL RPEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v32
73	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNS LRPEDTAVYYCKADHGYGGRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v36
74	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNS LRPEDTAVYYCKADHGYSGRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v37
75	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNS LRPEDTAVYYCKADHGYVGRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v38
76	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNS LRPEDTAVYYCKADHGYEGRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v39
77	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNS LRPEDTAVYYCKADHGYNPRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v40
78	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNS LRPEDTAVYYCKADHGYGNRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v41
79	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNS LRPEDTAVYYCKADHGYNARGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v42
80	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNS LRPEDTAVYYCKADHGYNRGGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v43
81	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGK QREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSL RPEDTAVYYCKADHGYGGRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v44
82	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGK QREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSL RPEDTAVYYCKADHGYEGRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v45
83	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGK QREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSL RPEDTAVYYCKADHGYNARGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v46
84	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGK QREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSL RPEDTAVYYCKADHGYGGRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v47
85	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGK QREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNTL RAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v48
86	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGK QRELVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNTL RAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v49
87	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGK QREWVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNTL RAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v50
88	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGK ERELVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNTL RAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLTVTVKP	hz58E05v51

10

20

30

40

50

89	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSSYHMSWFRQAPGK EREFVATSHHGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNTL RAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKP	hz58E05v52
90	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPSGSTFSSYHMSWFRQAPGK QREPVATSHHGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNTL RAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKP	hz58E05v53
91	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSGSTFSSYHMSWFRQAPGK QREPVATSHHGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLQMNTL RAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKP	hz58E05v54
92	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFDEHHMGWFRQAP GKREFVAAITWHTGTTWYADSVKGRFTISRDDAKNTVALQM NALKTDDTALYYCVDGRRPFIREVGVEPDYWGQGTQVTVKP	1A10
93	QVQLQESGGGWWQPGGSLRLSCAASGSSFGSNVMMWVRQAP GKGPEWVSTINSSGTGTFYADSVKGRFTISRNNAKNTLYLQMN SLKPDDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTQVTVKP	1E4
94	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFASTGMSWVRQAPG KGPEWVSSINSIGSDSTMYADSVKGRFTISRDNAMNMLFLQMN SLKPEDTAVYYCAKWALSCSGYGCDDLQDAGQGTQVTVKP	D9
95	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFASYGMSWVRQAPG KGPEWVSSINSIGSDSTMYADSVKGRFTISRDSAKNMLFLQMNS LKPEDTGYYCAKWALSCSQYGCDDLPRPAGQGTQVTVKP	A3
96	QVQLQQSGGGEAQPGGSLRLSCAASGRFTFSSYAMSWYRQAPG KGREWVATITSSGSTTYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSS LRAEDTAVYYCNKYTSRTVRDYWGQGTQVTVKP	E9
97	EVQLVQSGGGEVQPGGSLRLSCAASGRFTFSSYAMSWYRQAPG KGREWVATITGGGTTTYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMS SLRAEDTAVYYCNKYTSRFRDYWGQGTQVTVKP	B4
98	QVQLVQDGDLSRLSCKASGGTFSSYAMGWFRQAPGQEREFVA AISSEGGSTYYADNMEGRFTTSRDNAKNTVYLQMNSLKPEDT AVYYCAVKGVGWPQEASQSYDYWGQGTQVTVKP	57B06
99	QVQLQQSGGGLVQPGGSMRLSCAASGSIPSIDHMGWYRQAPG KERELVASIDLNGRTNYAGPVKGRFAISRDSAKNTMYLQMNSL LPEDTAVYYCNHRWGSPDYHDDVDYWGQGTQVTVKP	57B10
100	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFSTYAMGWFRQAPG KELEFVAAVGWRGNTNYQDSVKGRFTISRDNANTVYLQMS SLKPEDTAVYYCAMGEPIRVGEKSGYDYWGQGTQVTVKP	58B06
101	QVQLQQSGGGLVQAGDSLRLSCEASGGTFSSYAMGWFRQAPR QEREFVA AISSEGGSTYYADNLEGRFTTSRDNAKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAVKGVGWPQEASQSYDYWGQGTQVTVKP	57A12
102	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTFSSYAMGWFRHPPG KREFVAAISWSGGNTLYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNS LKPEDTAVYSCAVGPRDYFSDLEVDFGSWGQGTQVTVKP	57B08
103	QVQLVQSGGGLVQAGDSLRLSCAASGRTFSSLAVGWFRQAPW KREFVGAISWSGGNTYYVDAVEGRITISRDNANTVYLQMN DLKPEDTAVYYCAAGLPIRVGVPGGYDYWGQGTQVTVKP	58A08
104	QVQLQQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGHTFSTYAMGWFRQAP GKREFVAGITRSGDSTHYEDSVKGRFTISRDNNTKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAAASFAYLSTYTHHYDYWGQGTQVTVKP	57D1
105	QVQLQQSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRSFGDYTVGWFRQAPG KERDFVAGLSWLGGTIYYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMT TLKPEDTAVYYCAASRSAISRKATDFGSWGQGTQVTVKP	1H5

10

20

30

40

50

106	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRSFGDYTVGWFRQAPG KERDFVAGLSWLGGTIYYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCAASRSAISRKATDFGSWGQGTLLTVTKP	hz1H5v1
107	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRSFGDYTVGWFRQAPG KERDFVAGLSWLGGTIYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSS LRAEDTAVYYCAASRSAISRKATDFGSWGQGTLLTVTKP	hz1H5v2
108	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRSFGDYTVGWFRQAPG KERDFVAGLSWLGGTIYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMT TLKPEDTAVYYCAASRSAISRKATDFGSWGQGTLLTVTKP	hz1H5v3
109	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRSFGDYTVGWFRQAPG KERDFVAGLSWLGGTIYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSS LRAEDTAVYYCAASRSAISRKATDFGSWGQGTQVTVKP	hz1H5v4
110	QVQLVQSGGGLVQDGDLSRLSCKASGGTFSSYAMGWFRQAPG QEREFVAAISSEGGSTYYADNMEGRFTISRDNANTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAVKGVGWGPQEQASYDYWGQGTQVTVKP	L57B06
111	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPG KREFVAAISSEGGSTYYADNMEGRFTISRDNANTVYLQMSS LRAEDTAVYYCAVKGVGWGPQEQASYDYWGQGTLLTVKPG	h57B06v5
112	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPG KREFVAAISSEGGSTYYAESMEGRFTISRDNANTVYLQMSS LRAEDTAVYYCAVKGVGWGPQEQASYDYWGQGTLLTVKPG	h57B06v6
113	QVQLVQDGDLSRLSCKASGGTFSSYAMGWFRQAPGKREFVAA AISSEGGSTYYADNMEGRFTISRDNANTVYLQMSSLRAEDTA VYYCAVKGVGWGPQEQASYDYWGQGTLLTVKPG	h57B06v7
114	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPG QEREFVAAISSEGGSTYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSL RAEDTAVYYCAVKGVGWGPQEQASYDYWGQGTLLTVKPG	h57B06v8
115	GFSFGSNVMM	CDR-H1 (L1A5, hz1A5v1,2,3,7,8,9, 12,17,24,25,28,29, 30,31,32,33,34,38, 41,42,43,44)
116	GFSFGSYVMM	CDR-H1 (hz1A5v35,45,48)
117	GFSFGSFVMM	CDR-H1 (hz1A5v36)
118	GFTFGSNVMM	CDR-H1 (hz1A5v37,46)
119	GFSFSSNVMM	CDR-H1 (hz1A5v39,47)
120	GFSFTSNVMM	CDR-H1 (hz1A5v40)
121	GFTFSSNVMM	CDR-H1 (hz1A5v49)
122	GFTFSSYVMM	CDR-H1 (hz1A5v50)
123	ERTFSTYTMG	CDR-H1 (L57B04, hz57B04v3,4,8,9,1 5,20,23,24)
124	GSTFSMYHMS	CDR-H1 (L58E05, hz58E05v1,2,3,4,5 ,6,7,8,9,10,11,13,1

10

20

30

40

50

		9,25,26,28,29,30,31,36,37,38,39,40,41,42,43)
125	GSTFSLYHMS	CDR-H1 (hz58E05v16)
126	GSTFSSYHMS	CDR-H1 (hz58E05v18,27,32,44,45,46,49,50,51,52,53,54)
127	GSTFSTYHMS	CDR-H1 (hz58E05v20)
128	GSTFSKYHMS	CDR-H1 (hz58E05v21)
129	GSTFSFYHMS	CDR-H1 (hz58E05v22)
130	GSTFSDYHMS	CDR-H1 (hz58E05v23)
131	GSTFSRYHMS	CDR-H1 (hz58E05v24)
132	GSTFSIYHMS	CDR-H1 (hz58E05v47)
133	GFTFSSYHMS	CDR-H1 (hz58E05v48)
134	GLTFDEHHMG	CDR-H1 (cx3969 pPL2-B7H3-1359-1A10 xELL)
135	GSSFSGNVMM	CDR-H1 (cx3982 pPL2-B7H3-1675-1E4 xELL)
136	GFTFASTGMS	CDR-H1 (cx3218 pPL2-B7H3 avi-D9-xELL)
137	GFTFASYGMS	CDR-H1 (cx3219 pPL2-B7H3 avi-A3-xELL)
138	GRTFSSYAMS	CDR-H1 (合成 E9, 合成 B4)
139	GGTFSSYAMG	CDR-H1 (pPL2-B7H3 VHH-9 (57B06) IgG1, pPL2-B7H3 VHH-7 (57A12) IgG1, L57B06, h57B06v5,6,7,8)
140	GSIPSIDHMG	CDR-H1 (pPL2-B7H3 VHH-12 (57B10) IgG1)
141	GRSFSTYAMG	CDR-H1 (pPL2-B7H3 VHH-54 (58B06) IgG1)

10

20

30

40

50

142	GLTFSSYAMG	CDR-H1 (pPL2-B7H3 VHH-10 (57B08) IgG1)
143	GRTFSSLAVG	CDR-H1 (pPL2-B7H3 VHH-53 (58A08) IgG1)
144	GHTFSTYAMG	CDR-H1 (pPI2-B7H3 VHH 57D1c-IgG1)
145	GRSFGDYTVG	CDR-H1 (1H5, hz1H5v1,2,3,4)
146	TIYSSGTGTF	CDR-H2 (hz1A5v1,2,3,7,8,12,24,25,28,29,34,35,36,37,38,39,40)
147	TIYSRGTGTF	CDR-H2 (hz1A5v9,17,33,41,42,43,45,46,47,49)
148	TIYSRGGSTF	CDR-H2 (hz1A5v30)
149	TIYSSGTGTY	CDR-H2 (hz1A5v31)
150	TIYSRGGSTY	CDR-H2 (hz1A5v32)
151	TIYSRGTGTY	CDR-H2 (hz1A5v44,48,50)
152	VVNWSGGSKY	CDR-H2 (L57B04, hz57B04v3,4,8,9,23)
153	VVNWGGGSKY	CDR-H2 (hz57B04v15,20,24)
154	TSHHGTTN	CDR-H2 (L58E05, hz58E05v1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,13,16,18,19,20,21,22,23,2,2,26,27,28,29,30,31,32,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54)
155	AITWHTGTTW	CDR-H2 (cx3969 pPI2-B7H3-1359-1A10 xELL)
156	TINSSGTGTF	CDR-H2 (cx3982 pPI2-B7H3-1675-1E4 xELL)
157	SINSGSDSTM	CDR-H2 (cx3218 pPI2-B7H3 avi-D9-xELL)

10

20

30

40

50

158	SINSGSDTSM	CDR-H2 (GFTFASYGMS)
159	TITSSGSTTY	CDR-H2 (合成 E9)
160	TITTGGGTTY	CDR-H2 (合成 B4)
161	AISSEGGSTY	CDR-H2 (pPL2-B7H3 VHH-9 (57B06) IgG1, pPL2-B7H3 VHH-7 (57A12) IgG1, L57B06, h57B06v5,6,7,8)
162	SIDLNGRTN	CDR-H2 (pPL2-B7H3 VHH-12 (57B10) IgG1)
163	AVGWRGTNTY	CDR-H2 (pPL2-B7H3 VHH-54 (58B06) IgG1)
164	AISWSGGNTL	CDR-H2 (pPL2-B7H3 VHH-10 (57B08) IgG1)
165	AISWSGGNTY	CDR-H2 (pPL2-B7H3 VHH-53 (58A08) IgG1)
166	GITRSGDSTH	CDR-H2 (pPI2-B7H3 VHH 57D1c-IgG1)
167	GLSWLGGTIY	CDR-H2 (1H5, hz1H5v1,2,3,4)
168	SGPVRGWGP	CDR-H3 (L1A5, hz1A5v1,2,3,7,8,9, 12,17,24,25,28,29, 30,31,32,33,34,35, 36,37,39,40,41,42, 43,44,45,46,47,48, 49,50,cx3982 pPI2-B7H3-1675-1E4 xELL)
169	SGPVRGWGY	CDR-H3 (hz1A5v38)
170	GGAYSGPYYDTRQYTY	CDR-H3 (L57B04, hz57B04v3,4,8,9,1 5,23,24)
171	GGAYSTPYYDTRQYTY	CDR-H3 (hz57B04v20)
172	DHGYNGRGY	CDR-H3 (L58E05, hz58E05v1,2,3,4,8 ,28,29,30)
173	DHGYQGRGY	CDR-H3 (hz58E05v5,9,13,1 6,18,19,20,21,22,2

10

20

30

40

		3,24,25,26,27,31,32,48,49,50,51,52,53,54)
174	DHGYNARGY	CDR-H3 (hz58E05v6)
175	DHGYNTRGY	CDR-H3 (hz58E05v7,11)
176	DHGYGGRGY	CDR-H3 (hz58E05v36,44,47)
177	DHGYSGRGY	CDR-H3 (hz58E05v37)
178	DHGYVGRGY	CDR-H3 (hz58E05v38)
179	DHGYEGRGY	CDR-H3 (hz58E05v39,45)
180	DHGYNPRGY	CDR-H3 (hz58E05v40)
181	DHGYGNRGY	CDR-H3 (hz58E05v41)
182	DHGYNYGRGY	CDR-H3 (hz58E05v42,46)
183	DHGYNRGGY	CDR-H3 (hz58E05v43)
184	GRRPFFIREVGVPEPDY	CDR-H3 (cx3969 pPI2-B7H3-1359-1A10 xELL)
185	WALSCSGYGCDLDPQD	CDR-H3 (cx3218 pPI2-B7H3 avi-D9-xELL)
186	WALSCSQYGCDLPRP	CDR-H3 (cx3219 pPI2-B7H3 avi-A3-xELL)
187	YTSRTVRDY	CDR-H3 (合成 E9)
188	YTSRFPRDY	CDR-H3 (合成 B4)
189	KGVGWPQEQASYDY	CDR-H3 (pPL2-B7H3 VHH-7 (57A12) IgG1)
190	MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVAL VGTDATLCCSFSPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQD QGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQVRVVADEGSFTCFVSIR DFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITICSSYQG YPEAEVFWQDGGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVL GANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDP VVALVGTDATLRCFSFSPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTE GRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASRLRLQVRVVADEGSFTCF VSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITICSS YRGYPEAEVFWQDGGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVL RVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALW	B7H3

10

20

30

40

50

	VTVGLSVCLIALLVAFVCWRKIKQSCEENAGAEDQDGEGE GSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA	
191	GGSGGS	(GGS)2 リンカー
192	GGSGGSGGS	(GGS)3 リンカー
193	GGSGGSGGSGGS	(GGS)4 リンカー
194	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGS)5 リンカー
195	GGGG	グリシンリンカー
196	GGGGG	グリシンリンカー
197	GGGGGG	グリシンリンカー
198	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQOPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	ヒト IgG1 Fc
199	PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSRDELTKNQ VSLTCLVKG FYPDI AVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKS R WQQGNV FSCSV MHEAL HNHYTQKSLS LSPGK	Fc xELL
200	PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLV KGFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	ヒト IgG2 Fc
201	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKTK KGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQOPEN NYNTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRFTQK SLSLSPGK	ヒト IgG3 Fc
202	PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQOPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	ヒト IgG4 Fc
203	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQOPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	ヒト IgG4 Fc
204	EPKSSDKTHTCPPC	改変型IgG1ヒンジ
205	DKTHTCPPC	切断型IgG1ヒンジ
206	ESKYGPCCPPC	改変型IgG4ヒンジ

10

20

30

40

50

207	GQGTLLVTVKPGG	カルボキシ末端配列
208	GQGTLLVTVEPGG	カルボキシ末端配列
209	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDN SKNTAFLQMD SLRPEDTGVYFCARYYDDHYCLDYWGQGTPTVTVSS	OKT3 VH
210	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAP KRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLQPEDIATYYCQ QWSSNPFTFGQGTKLQIT	OKT3 VL
211	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAP GKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDN SKNTAFLQMD SLRPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWGQGTPTVTVSS	OKT3 ヒト化 VH
212	DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAP GQGLEWIGYINPSRGYTNADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSS LRSEDATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTPTVTVSS	OKT3 ヒト化 VH
213	QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAP GQCLEWMGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTADKSTSTAYMEL RSLRSDDTAVYYCARYYDDHYSLDYWG QGTLLVTVSS	OKT3 ヒト化 VH
214	QIVLTQSPAISASPGKEVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSP KRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYY CQQWSSNPFTFGSGTKLEIN	OKT3 ヒト化 VL
215	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSYMNWYQQKPGKAP KRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDYSLTINSLEAEDAATYY CQQWSSNPFTFGGGTKVEIK	OKT3 ヒト化 VL
216	DIQLTQSPSILSASVGDRVTITCRASSSVSYMNWYQQKPGKAPK RWIYDT SKVASGVPPYRFSGSGSGTEYTLTISSMQPEDFATYYCQQWSSN PLTFGCGTKVEIKRT	OKT3 ヒト化 VL
217	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQM NNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSA	抗CD3 Hv
218	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPD HLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAI YFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 Lv
219	TYAMN	抗CD3 VH CDR1
220	RIRSKYNNYATYYADSVKD	抗CD3 VH CDR2
221	HGNFGNSYVSWFAY	抗CD3 VH CDR3
222	RSSTGAVTTSNYAN	抗CD3 VL CDR1
223	GTNKRAP	抗CD3 VL CDR2
224	ALWYSNLWV	抗CD3 VL CDR3
225	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSS	抗CD3 VH1

10

20

30

40

226	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH2
227	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH3
228	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH4
229	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH5
230	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVSIRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH6
231	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH7
232	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVS	抗 CD3 VH8
233	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH9
234	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFYAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH10
235	EVQLVESGGGLVQPKGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH11
236	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVKP	抗 CD3 VH12
237	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVKP	抗 CD3 VH13
238	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGCGTLTVTVKP	抗 CD3 VH14
239	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH15
240	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVSIRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH16
241	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVSIRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH17
242	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH18

10

20

30

40

50

243	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH19
244	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH20
245	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH21
246	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH22
247	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH23
248	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH24
249	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH25
250	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH26
251	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMSWVRQAPG KCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH27
252	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVS	抗 CD3 VH28
253	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH29
254	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFYFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH30
255	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQM NNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH31
256	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPD HLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAI YFCALWYSNLWVFEGGKLTVL	抗 CD3 VL1
257	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKP GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEA DYICALWYSNHWVFEGGKLEIK	抗 CD3 VL2
258	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDE ADYICALWYSNLWVFEGGKLTVL	抗 CD3 VL3
259	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPG QAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESI YFCALWYSNLWVFEGGKLTVL	抗 CD3 VL4

10

20

30

40

50

260	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPG QAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESI YFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL5
261	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPG QAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESD YYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL6
262	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKEP GQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL7
263	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL8
264	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKQP GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGGGTKLEIK	抗 CD3 VL9
265	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKQP GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGCGTKLEIK	抗 CD3 VL10
266	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKQP GQCFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGEGTKLEIK	抗 CD3 VL11
267	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKEPD HLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAI YFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL12
268	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKQP GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEA DYCALWYSNHWVFGGGTKLEIK	抗 CD3 VL13
269	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKQP GQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDE ADYYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL14
270	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPG QAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESI YFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL15
271	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPG QAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESI YFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL16
272	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPG QAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESD YYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL17
273	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKEP GQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL18
274	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL19
275	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSNYHMGWFRQAPG KERELVA AISGGSTYYTDSVKGRFTISRNNAKNTMSLQMSN LKPEDTG VYYCTTPTEKGSSIDYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPD Y	抗 CD3 VHH
276	<u>MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQ</u> <u>AQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQODPRLYWQGGPALGRSF</u> <u>LHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIOVTLAICSSTTASRHPTTLA</u>	UniProt No. P32970, CD70-

10

20

30

40

50

	<u>VGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGT</u> <u>LLPSRNTDETFFGVQWVRP</u>	ECD 残基 39-193
277	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARGSGNWGFFDYWGQGLTVTVSS	CD70 VH
278	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYNTYPRTFGQGTKVEIK	CD70 VL
279	QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINGMGWYRQAPG KERELVAGLTSGGSVTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLKPEDTAVYYCRAEIFTRTGENYYGMDYWGKGTQVTVKP	ICOS sdAb
280	EVQLVESGGGEVQPGRSLRLSCAASGRMFSNYAMGWFRQAPG KEREFVAAINYRRDAADYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRRDDYNYWGQGLTVTVKP	CD28 sdAb
281	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 ϵ シグナル伝達 ドメイン
282	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB 由来の 共刺激ドメイン
283	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 由来の 共刺激ドメイン
284	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 由来の 共刺激ドメイン 2
285	FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAY RS	CD28 由来の 共刺激ドメイン 3
286	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFA SDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	CD8 由来のヒンジ および膜貫通 ドメイン
287	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	CD8 由来のヒンジ および膜貫通 ドメイン
288	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	CD8 ヒンジ および膜貫通 ドメイン
289	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSGGYFWSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGTTYNNPSLKSRTVISIDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARDLFYYDTSGPRGFDPWGQGLTVTVSS	GITR VH
290	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVSSNYLAWYQQKPGQ APRLLIYGSSTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYDSSPWTFGQGTKVEIK	GITR VL
291	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYPGSNKYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGGELGRYYYYYGMVWGQGTTVTVSS	GITR VH
292	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTTCRASQGIRNDLGWYQQKPGK APKRLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY CLQHNNYPWTFGQGTKVDIK	GITR VL

10

20

30

40

293	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPT	ノブ Fc
294	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPT	ホール Fc
295	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPT	ノブ Fc
296	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPT	ホール Fc
297	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	ノブ Fc
298	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	ホール Fc
299	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG	ノブ Fc
300	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG	ホール Fc
301	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY	ホール Fc

10

20

30

40

50

	KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH NRYTQKSLSLSPT	
302	DKTHTCPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNRYT QKSLSLSPT	ホールFc
303	DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH NRYTQKSLSLSPG	ホールFc
304	DKTHTCPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNRYT QKSLSLSPG	ホールFc
305	DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNH YTQKSLSLSPT	ノブFc
306	DKTHTCPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYT QKSLSLSPT	ノブFc
307	DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNH YTQKSLSLSPG	ノブFc
308	DKTHTCPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYT QKSLSLSPG	ノブFc
309	DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRY TQKSLSLSPT	ホールFc
310	DKTHTCPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL	ホールFc

10

20

30

40

	HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRYT QKSLSLSPT	
311	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRY TQKSLSLSPG	ホールFc
312	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRYT QKSLSLSPG	ホールFc
313	(GGGGS) _n , nは1〜5である	リンカー
314	(GGGGGS) _n , nは1〜4である	リンカー
315	GGGGS	リンカー
316	GGGGGS	リンカー
317	GGGGSGGGGGSGGGGS	リンカー
318	GGGGSGGGGGSGGGGS	リンカー
319	GGSGGGGGSGGGGGSGGGGS	リンカー
320	GlyxXaa-Glyy-Xaa-Glyz Xaaは、独立して、A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D、 またはEから選択される x、y、およびzは各々、1〜5の範囲の整数である	リンカー
321	Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly Xaaは、独立して、A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D、 またはEから選択される	リンカー
322	(SSSSG) _n n=1-9	リンカー
323	GGGGG-C-GGGGG	リンカー
324	(EAAAK) _n n=2-20	リンカー
325	AS-(AP) _n -GT n=2-20	リンカー
326	AS-(EAAAK) _n -GT n=2-20	リンカー
327	(GGGGA) _n n=2-20	リンカー
328	(PGGGS) _n n=2-20	リンカー
329	(AGGGS) _n n=2-20	リンカー
330	GGG-(EGKSSGSGSESKST) _n -GGG n=2-20	リンカー
331	SSSASASSA	リンカー
332	GSPGSPG	リンカー
333	ATTTGSSPGPT	リンカー
334	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)	リンカーコンセンサス

10

20

30

40

50

	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)	
335	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
336	LEAD	グランザイムB基質
337	LEPD	リンカー
338	LEAE	リンカー
339	IEPDI	リンカー
340	LEPDG	リンカー
341	LEADT	リンカー
342	IEPDG	リンカー
343	IEPDV	リンカー
344	IEPDS	リンカー
345	IEPDT	リンカー
346	X1QARX5 (P1QAR↓(A/V)) X1 = 任意のアミノ酸; (P1は任意のアミノ酸である) X5 = A または V	リンカーコンセンサス
347	RQARX5 (RQAR(A/V)) X5 = A または V	リンカー
348	RQAR	マトリプターゼ基質
349	RQARV	リンカー
350	X1X2 X3 X4 (P3 P2 P1 ↓ 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
351	PX2X3X4 (P3 P2 P1 ↓ P1') (P3 = P) X2 = Q または D; (P2 = Q または D) X3 = A または N; (P1 は A または Nである) X4 = L または I (P1' は L または Iである)	リンカーコンセンサス
352	PAGL	MMP 基質
353	TGLEADGSPAGLGRQARVG	リンカー
354	TGLEADGSRQARVGPA GLG	リンカー
355	TGSPAGLEADGSRQARVGS	リンカー
356	TGPAGLGLLEADGSRQARVG	リンカー
357	TGRQARVGLLEADGSPAGLG	リンカー
358	TGSRQARVGPAGLEADGS	リンカー
359	TGPAGLGSRQARVGLLEADGS	リンカー
360	GPAGLGLLEPDGSRQARVG	リンカー
361	GGSGGGGIEPDIGGSGGS	リンカー
362	GGSGGGGLEADTGGSGGS	リンカー
363	GSIEPDIGS	リンカー

10

20

30

40

50

364	GSLEADTGS	リンカー
365	GGSGGGGIEPDGGGSGGS	リンカー
366	GGSGGGGIEPDVGGSGGS	リンカー
367	GGSGGGGIEPDSSGSGGS	リンカー
368	GGSGGGGIEPDTGGSGGS	リンカー
369	GGGSLEPDGSGS	リンカー
370	GPAGLGLEADGSRQARVG	リンカー
371	GGEGGGGSGGSGGGS	リンカー
372	GSSAGSEAGGSGQAGVGS	リンカー
373	GGSGGGGLEAEGSGGGS	リンカー
374	GGSGGGGIEPDGSGSGGS	リンカー
375	TGGSGGGGIEPDIGGSGGS	リンカー
376	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEANSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	41BBL
377	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGK GLEWMGKIYPGDSYTNYSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGTLLTVSS	41BB VH
378	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSP VLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC ATYTGFGSLAVFGGGTKLTVL	41BB VL
379	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQSPE KGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLTVSS	41BB VH
380	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQ QRSNWPPALTFGGGKTKEIK	41BB VL
381	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFSFGYYMHWVRQAP GQGLEWMGWVNPMSGGTNYAQKFQGRVTITRDTASTAYME LSSLRSEDNAVYYCAREGMAMRLELDKWGQGTLLTVSS	41BB VH
382	SYELTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIGSKSVHWYQQKPGQAP VLVIYYDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC QVWDSSSVVFGGGTQLTVL	41BB VL
383	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIKL EDKDPNKMMATIELKEDKSYDVTGVTFDKKCTYAISTFVP GSQPGFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQ NREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	41BB Anticalin
384	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIRL EDKDPNKMMATIELKEDKSYDVTMVKFDDKKCMYDIWTFVP GSQPGFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQ NREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	41BB Anticalin
385	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIRL EDKDPNKMMATIELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTFVP GSQPGFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFVFQ NREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	41BB Anticalin
386	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIKL EDKDPNKMMATIELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTFVP	41BB Anticalin

10

20

30

40

50

	GSQPGFTLGKIKSFPGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQ NREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	
387	QDSTSDLIPA PLSKVPLQQ NFQDNQFHGK WYVVGQAGNI KLREDSKMMMA TIYELKEDKS YDVTGVSFDD KKCTYAIMTF VPGSQPGFT LGKIKSFPGH TSSLVRVST NYNQHAMVFF KFVFQNREEF YITLYGRTKE LTSELKENFI RFSKSLGLPE NHIVFPVPID QCIDG	41BB Anticalin
388	QDSTSDLIPA PLSKVPLQQ NFQDNQFHGK WYVVGQAGNI KLREDKDPVK MMATIELKE DKSVDVTGVT FDDKKCRYDI STFVPGSQPG EFTFGKIKSF PGHTSSLVRV VSTNYNQHAM VFFKFVFQNR EEFYITLYGR TKELTSELKE NFIRFSKSLG LPENHIVFPV PIDQCIDG	41BB Anticalin
389	QDSTSDLIPAPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIRLR EDKDPHKMMATIELKEDKSVDVTGVT FDDKKCTYAISTFVP GSQPGFTLGKIKSFPGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQ NREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	41BB Anticalin
390	QDSTSDLIPAPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIKL EDKDPNKMMAIYELKEDKSVDVTGVT FDDKKCTYAISTLVP GSQPGFTFGKIKSFPGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQ NREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	41BB Anticalin
391	QDSTSDLIPAPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIRLR EDKDPSKMMATIELKEDKSVDVTA VTFDDKKCNYAISTFVP SQPGFTLGKIKSFPGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQ REEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPIDQ CIDG	41BB Anticalin
392	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの71～254
393	DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの85～254
394	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVA KAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SRSE	ヒト41BBLの80～254
395	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの52～254
396	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGL	ヒト41BBLの71～248

10

20

30

40

50

397	LDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの85～248
398	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSL ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの80～248
399	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQ LVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの52～248
400	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMGWYRQAPGK RREFVAAIESGRNTVYAESVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMSSLR AEDTAVYYCGLLKGNRVVSPSVAYWGQGLTVTKP	41BB sdAb
401	QVSHRYPRIQSIKVFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNSVII NCDGFYILSLKGYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL MVASLTYKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFC VL	OX40 リガンド
402	QVSHRYPRFQSIKVFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQN NSVIINCDGFYLISLKGYSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTDDNTSLDDFHVNGGEL ILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
403	QVSHRYPRIQSIKVFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNSVII NCDGFYILSLKGYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL MVASLTYKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFC VL	OX40 リガンド
404	QVSHRYPRIQSIKVFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQN NSVIINCDGFYLISLKGYSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTDDNTSLDDFHVNGGEL ILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
405	VSHRYPRIQSIKVFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNSVII NCDGFYILSLKGYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLM VASLTYKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCV L	OX40 リガンド
406	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVTITRDTSTSTAYLELS SLRSEDVAVYYCVLAPRWYFSVWGQGLTVTVSS	OX40 VH
407	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIKRT	OX40 VL
408	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASG KGLEWVGRIRSKANSYATAYAAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTAVYYCTSGIYDSSGYDYWGQGLTVTVSS	OX40 VH
409	DIVMTQSPSLPVPTEGEPASISCRSSQSLLSNGYNYLDWYLQK PGQSPQLLIYLGSNRASGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCMQALQTPLTFTGGGKVEIK	OX40 VL
410	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAFMYWVRQAPG KGLEWVSSISNRGLKTAAYAESVKGRFTISRDNNAKNTLYLQMS LRAEDTAVYYCSRVDVDGDFRGQGLTVTKP	OX40 sdAb

10

20

30

40

50

411	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQ NGLYLIYGGVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKI QNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGILLANPQFIS	GITR リガンド
412	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVASISSGGTTYYPDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGGYYDSMDYWGQGLTVTVSS	GITR VH
413	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASESDNYGV SFMNWYQQK PGQAPRLLIYAASNQSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQTKEVTWTFGQGTKVEIK	GITR VL
414	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPPG KALEWLAHIWWDDKYYQPSLKSRLTISKDT SKNQVVLMTN MDPVDATATYYCARTRRYFPAYWGQGLTVTVSS	GITR VH
415	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC KASQNVGTNVAWYQQKPGQ APRLLIYSASYRYS GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQYNTDPLTFGGGTKVEIK	GITR VL
416	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPG KQRELVAVLSSGISA KYAASAPGRFTISRDN AKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYADVSTGWGRDAHGYWGQGLTVTV	GITR sdAb
417	QAVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQAFRGLIGGTNKRAPGV PARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL (CON)
418	DIQLTQSPSF LSASVGDRTV ITCKASQNVDTNVAWYQQKP GKAPKALIYSASYRYS GVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQGTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMNWVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGLTVTVSS GGCGGGEVAA LEKEVA ALEK EVA ALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNKKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	B7-H3 x CD3 二重特異性DART-A ダイアボディの 第1のポリペプチド鎖
419	QAVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKP GQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDE ADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPGKGLEWVAY ISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTAVY YCGRGRENIYYGSRLDYWGQGT TVTVSSGGCGGGKVAALKE KVAALKEKVAALKEKVAALKE	B7-H3 x CD3 二重特異性DART-A ダイアボディの 第2のポリペプチド鎖
420	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDEPKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALH NRYTQKSLSLSPGK	B7-H3 x CD3 二重特異性DART-A ダイアボディの 第3のポリペプチド鎖
421	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKGRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTVKPGG	hz18H10v1

10

20

30

40

422	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v2
423	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v3
424	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v4
425	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v5
426	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v6
427	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v7
428	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v8
429	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v9
430	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v10
431	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v11
432	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v12
433	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRELVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v13
434	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v14
435	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v15
436	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v16
437	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMNSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKPGG	hz18H10v17
438	GSMTGANTMG	CDRH1
439	GSVTGANTMG	CDRH1
440	GSITGANTMG	CDRH1
441	LIGNYVTH	CDRH2

10

20

30

40

50

442	YTDNLGTS	CDRH3
443	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYHYADSVKGRFTISRENAKNTVILQMNSLNP EDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	18H10
444	PGGGG	リンカー
445	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV DVSLEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP	ノブFc
446	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCV DVSLEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSP	ホールFc
447	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSP	ノブFc
448	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSP	ホールFc
449	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV DVSLEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NRYTQKSLSLSP	ホールFc
450	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYT QKSLSLSP	ホールFc
451	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCV VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNH YTQKSLSLSP	ノブFc
452	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT P	ノブFc

10

20

30

40

50

	PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNHYT QKSLSLSP	
453	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRY TQKSLSLSP	ホールFc
454	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNRYT QKSLSLSP	ホールFc
455	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPG KGLEWVA YISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRDEDTAVYYCGRGRENIYYGSRLDYWGQGTITVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSC	B7H3-LC
456	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVDTNVAWYQKPGKA PKALIYSASYRYSYGVPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QQYNNYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	B7H3-Fd
457	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGQPENNYKT TPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	Fc-Het-1
458	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREQMTKNQVKLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	Fc-Het-2
459	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKP GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEA DYICALWYSNHWVFVGGGKLTVL	VL21
460	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	VH32
461	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKP GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEA DYICALWYSNHWVFVGGGKLTVL	VL20
462	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADTVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTLLTV	VH34
463	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV	IgG1 ノブ

10

20

30

40

	YTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP	
464	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NHYTQKSLSLSP	IgG1 ノブ
465	GGGSGGGSGGGGS	リンカー
466	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYHMSWFRQAPGK QRELVAATSHHGTTNYAGSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNTL RAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKP	hz58E05v55
467	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSSGTGTGYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LRPEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGLVTVKP	hz1A5v51
468	GFSFSINAMG	41BB CDR1
469	AIESGRNTV	41BB CDR2
470	LKGNRVVSPSVAY	41BB CDR3
471	GFTFNTYAMN	抗 CD3 VH CDR1
472	RIRSKYNNYATY	抗 CD3 VH CDR2
473	HGNFGDSYVSWFAY	CD3-VH7, VH33 CDR3
474	ALWYSNHWV	CD3-VL2, VL21 CDR3
475	VLWYSNRWV	CD3-VL8 CDR3
476	GFTFSTYAMN	CD3 VH33 CDR1
477	RIRSKYNNYATY	CD3 VH33 CDR1
478	GSSTGAVTTSNYAN	CD3 VL21 CDR1
479	GTNKRAP	CD3 VL21 CDR2
480	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLVTVSS	CD3-VH33
481	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMGWYRQAPG KRREFVAAIESGRNTVYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCGLLKGNRVVSPSVAYWGQGLVTVKP	41BB sdAb
482	IEPDP	リンカー
483	RWGSPDYHDDVDY	CDRH3 (57B10)
484	GEPIRVGEKSGYDY	CDRH3 (58B06)
485	GPRDYFSDLEVDFGS	CDRH3 (57B08)
486	GLPIRVGVPGGYDY	CDRH3 (58A08)
487	ASFAYLSTYTHHYDY	CDRH3 (57D1)
488	SRSAISRKATDFGS	CDRH3 (1H5, hz1H5 v1-v4)
489	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSSGTGTGYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LRPEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGLVTVKP	hz1A5v52
490	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGLEWVSTIYSSGTGTGYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LRPEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGLVTVKP	hz1A5v53

10

20

30

40

50

491	GGG(GGS)n, n=0~10	リンカー
492	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSSL RAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v1
493	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRNNANTLYLQMSSL RAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v2
494	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRNNANTLYLQMSSL RAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRGQGTTLVTVKP	hz1A5v3
495	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRNNANTLYLQMSSL KPDDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v7
496	EVQLVESGGGLVQAGDSRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAP GKGPEWVSTIYSSGTGTFYAESVKGRFTISRNNANTLYLQMS SLRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v8
497	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFGSNVMMWVRQAPG KGPEWVSTIYSRGTGTFYAESVKGRFTISRNNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCATSGPVRGWGPRSQGTLVTVKP	hz1A5v9
498	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERTFSTYTMGWFRQAPG KEREFVSVNWSGGSKYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMN SLRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGTTLVTVKP	hz57B04v3
499	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERTFSTYTMGWFRQAPG KEREFVAVVNWSGGSKYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMN SLRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGTTLVTVKP	hz57B04v4
500	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPERTFSTYTMGWFRQAPGK EREFVAVVNWSGGSKYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMNS LRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGTTLVTVKP	hz57B04v8
501	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERTFSTYTMGWFRQAPG KEREFVAVVNWSGGSKYYAESVKGRFTISRDNANTVYLHMN SLRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGTTLVTVKP	hz57B04v9
502	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPERTFSTYTMGWFRQAPGK EREFVAVVNWSGGSKYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSS LRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGTTLVTVKP	hz57B04v23
503	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPERTFSTYTMGWFRQAPGK EREFVAVVNWSGGSKYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSS LRAEDTAVYYCAAGGAYSGPYDTRQYTYWGQGTTLVTVKP	hz57B04v24
504	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KGREPVSTSHHGTTNYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNSL RAEDTAVYYCKADHGYNGRGYWGQGTTLVTVKP	hz58E05v1
505	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVSSTHHGTTNYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNSL RAEDTAVYYCKADHGYNGRGYWGQGTTLVTVKP	hz58E05v2
506	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVSSTHHGTTNYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMNSL RAEDTAVYYCKADHGYNGRGYWGQGTTLVTVKP	hz58E05v3
507	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVSSTHHGTTNYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMNS LRAEDTAVYYCKADHGYNGRGYWGQGTTLVTVKP	hz58E05v4
508	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVSSTHHGTTNYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMNS LRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGTTLVTVKP	hz58E05v5

10

20

30

40

50

509	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAESVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYNARGYWGQGLVTVKP	hz58E05v6
510	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAESVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYNTRGYWGQGLVTVKP	hz58E05v7
511	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNANTVYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYNGRGYWGQGLVTVKP	hz58E05v8
512	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAESVKGRFTISRDNANTLYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYQGRGYWGQGLVTVKP	hz58E05v9
513	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAESVKGRFTISRDNANTLYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYNARGYWGQGLVTVKP	hz58E05v10
514	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSTFSMYHMSWFRQAPG KQREPVATSHHGGTTNYAESVKGRFTISRDNANTLYLMQNS LRAEDTAVYYCKADHGYNTRGYWGQGLVTVKP	hz58E05v11
515	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPG KEREFVA AISSEGGSTYYADNMEGRFTISRDNANTVYLMQSS LRAEDTAVYYCAVKGVGWPQEASDYWGQGLVTVKP	h57B06v5
516	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPG KEREFVA AISSEGGSTYYAESMEGRFTISRDNANTVYLMQSS LRAEDTAVYYCAVKGVGWPQEASDYWGQGLVTVKP	h57B06v6
517	QVQLVQDGSRLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPGKEREFVA AISSEGGSTYYADNMEGRFTISRDNANTVYLMQSSLRAEDTA VYYCAVKGVGWPQEASDYWGQGLVTVKP	h57B06v7
518	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGGTFSSYAMGWFRQAPG QEREFVA AISSEGGSTYYAESVKGRFTISRDNANTVYLMQSSL RAEDTAVYYCAVKGVGWPQEASDYWGQGLVTVKP	h57B06v8
519	QVQLVQSGLLVQPGGSLRLSCVASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYHYADSVKGRFTISRDNANTVILQMNSLNP EDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	18H10
520	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKGRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTLYLMQSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v1
521	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTLYLMQSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v2
522	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLMQSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v3
523	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v4
524	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLMQSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v5
525	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLMQSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v6

10

20

30

40

50

526	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v7
527	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v8
528	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v9
529	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v10
530	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v11
531	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v12
532	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRELVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v13
533	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v14
534	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v15
535	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSLR AEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v16
536	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMNSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKP	hz18H10v17
537	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSGYADSVKGFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH 312557
538	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KCLEWVSGISWNSGSGYADSVKGFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH 312557 G44C
539	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYNNWPWTFGQGTKVEIK	抗CD3 VL 312557
540	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLIIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQYNNWPWTFGCGTKVEIK	抗CD3 VL 312557 Q100C
541	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYSMHWVRQAPG KGLEWVSGISWNSGSKDYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKYGSGYGKIFYHYGLDVWGQGTITVTVSS	CD3-VH-G
542	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYSMHWVRQAPG KCLEWVSGISWNSGSKDYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKYGSGYGKIFYHYGLDVWGQGTITVTVSS	CD3-VH-G

10

20

30

40

50

543	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYSTPPITFGQGTRLEIK	V _{K1} -39Jk5
544	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYSTPPITFGCGTRLEIK	V _{K1} -39Jk5 Q100C
545	(ADAAP)n n=2-20	リンカー
546	(ADAAP)n-G n=2-20	リンカー
547	(GEPQG)n n=2-20	リンカー
548	(GEPQG)n-G n=2-20	リンカー
549	(AGGEP)n n=2-20	リンカー
550	(AGGEP)n-G n=2-20	リンカー
551	(AGSEP)n n=2-20	リンカー
552	(AGSEP)n-G n=2-20	リンカー
553	(GGGEQ)n n=2-20	リンカー
554	(GGGEQ)n-G n=2-20	リンカー
555	ADAAPADAAPG	リンカー
556	GEPQGGEPQGG	リンカー
557	AGGEPAGGEPG	リンカー
558	AGSEPAGSEPG	リンカー
559	GGGEQGGGEQG	リンカー

10

20

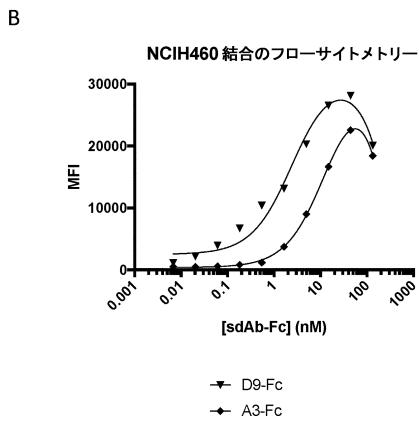
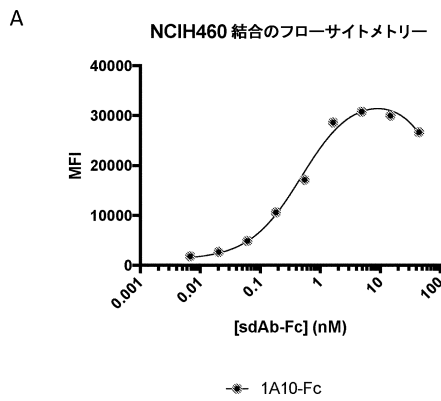
30

40

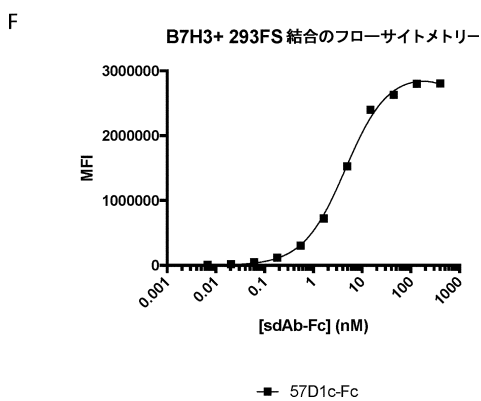
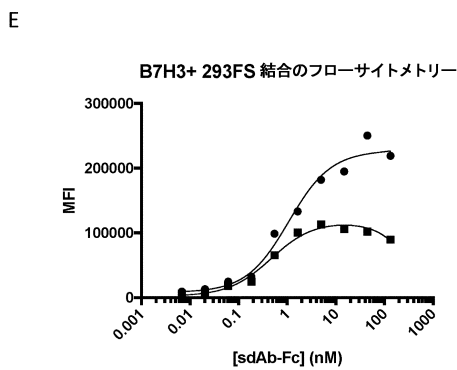
50

【図面】

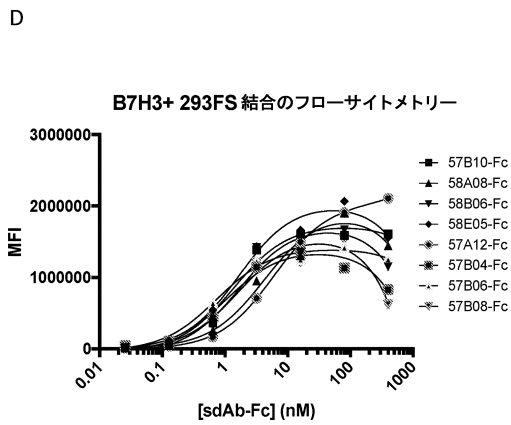
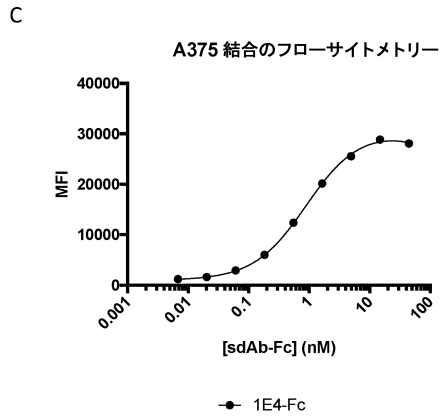
【図 1 - 1】



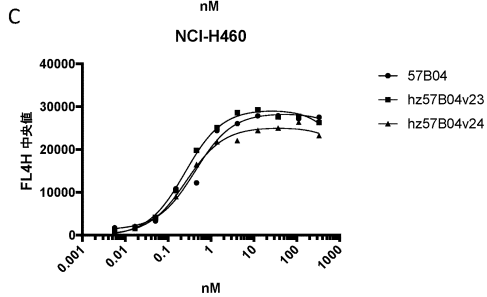
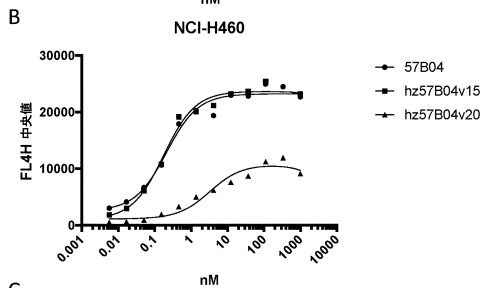
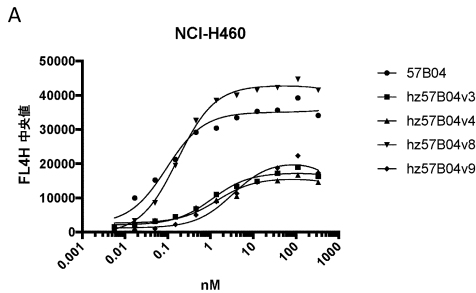
【図 1 - 3】



【図 1 - 2】



【図 2 - 1】



10

20

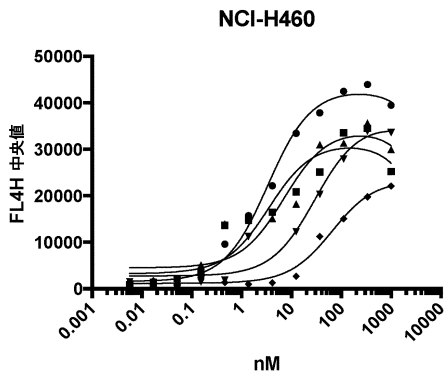
30

40

50

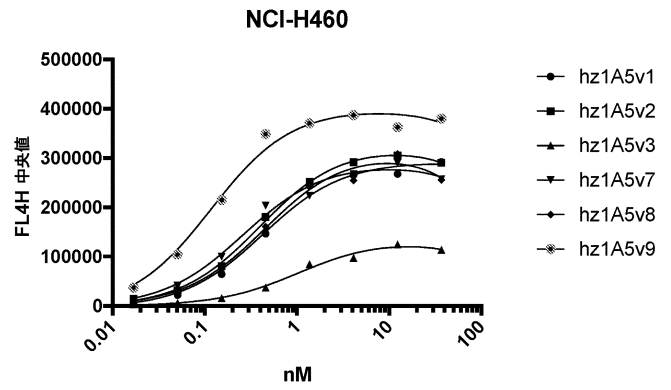
【 図 2 - 2 】

D



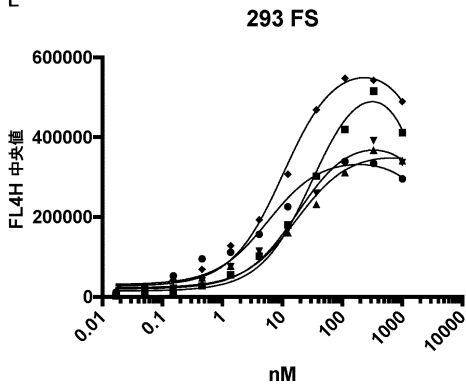
【 図 2 - 3 】

F

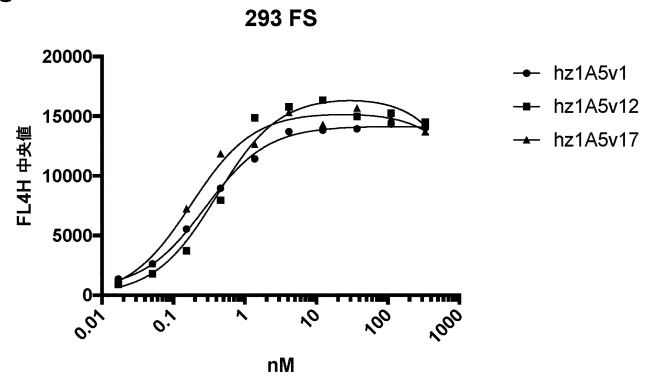


10

E



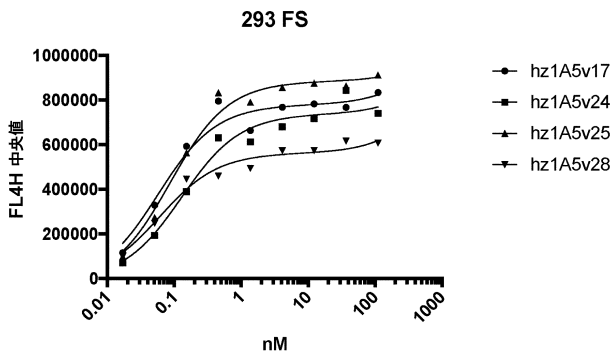
G



20

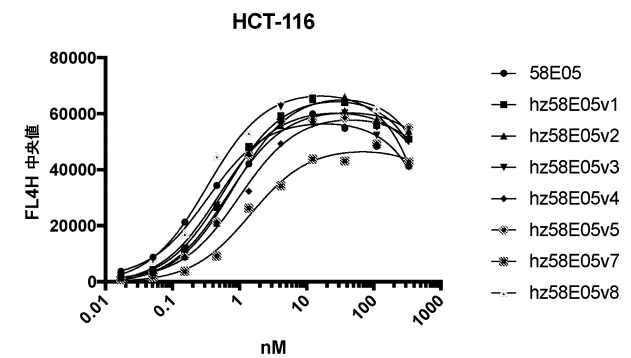
【 図 2 - 4 】

H



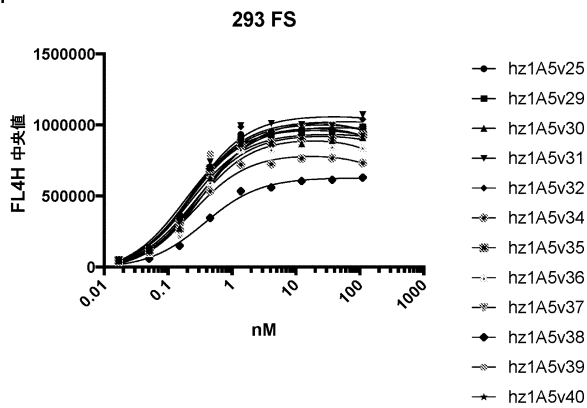
【 図 2 - 5 】

J

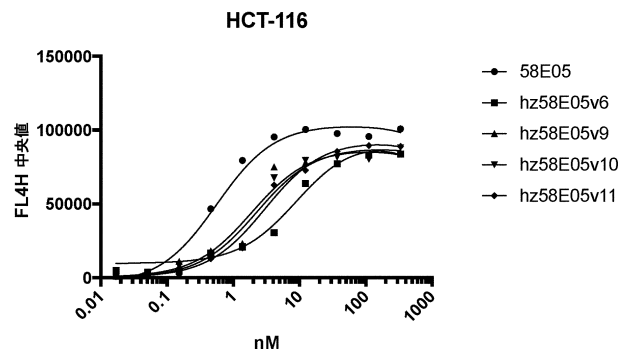


30

I



K

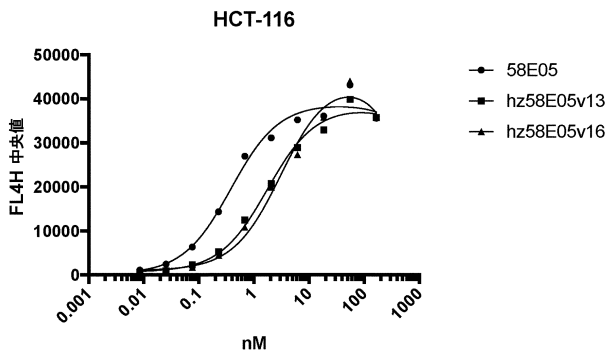


40

50

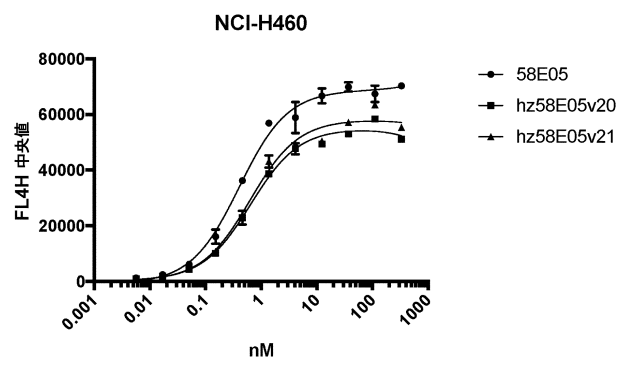
【 図 2 - 6 】

L



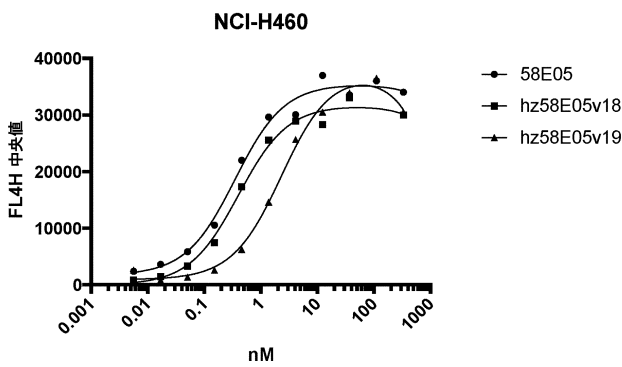
【 図 2 - 7 】

N

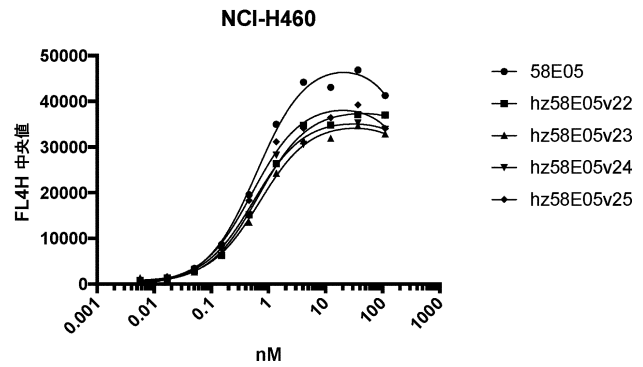


10

M



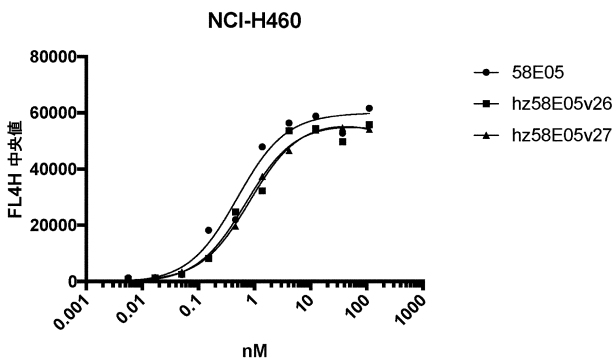
O



20

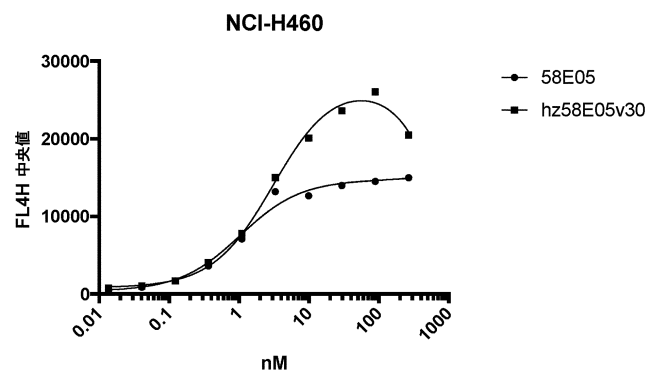
【 図 2 - 8 】

P



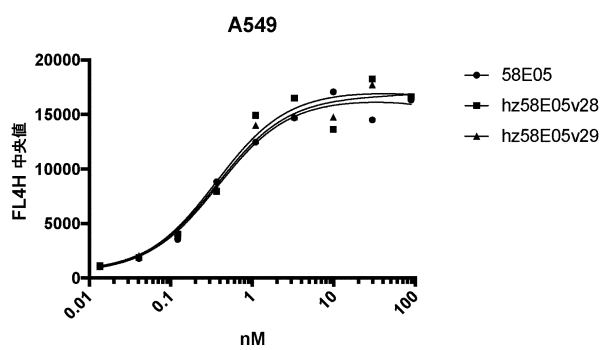
【 図 2 - 9 】

R

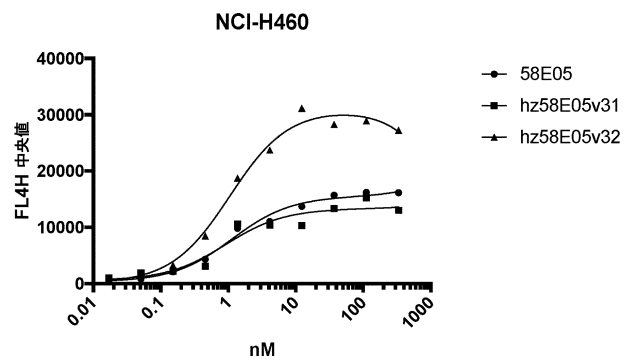


30

Q



S

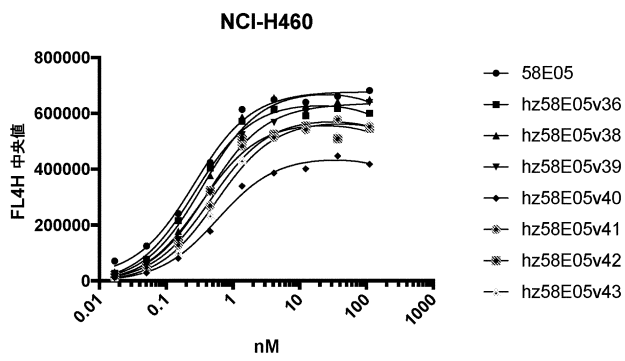


40

50

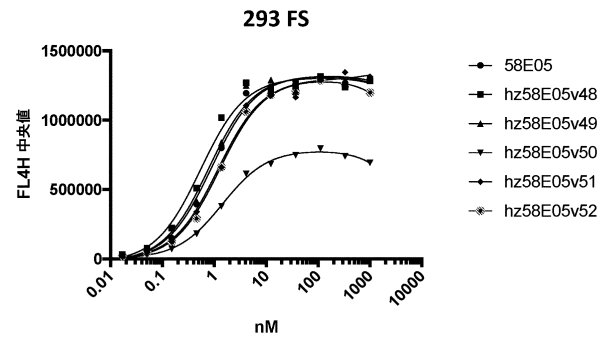
【図 2 - 1 0】

T



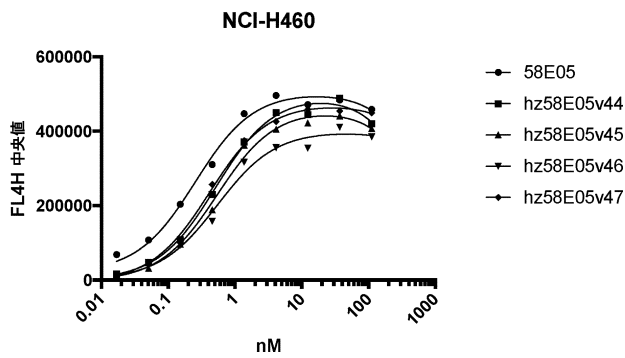
【図 2 - 1 1】

V

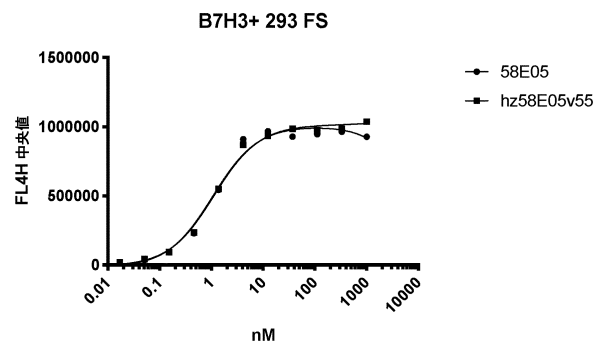


10

U



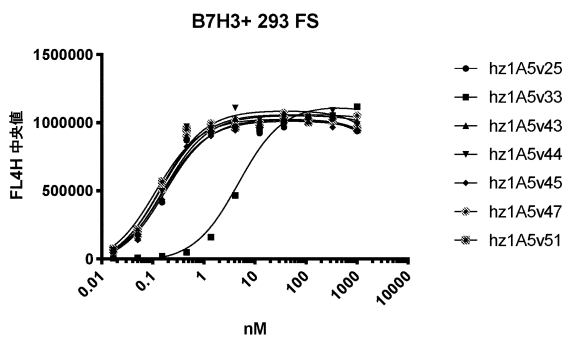
W



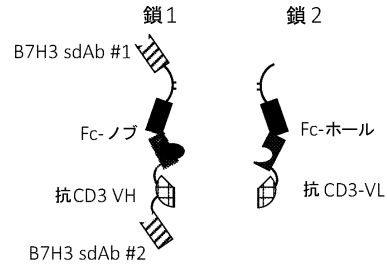
20

【図 2 - 1 2】

X

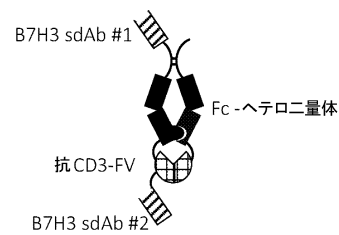
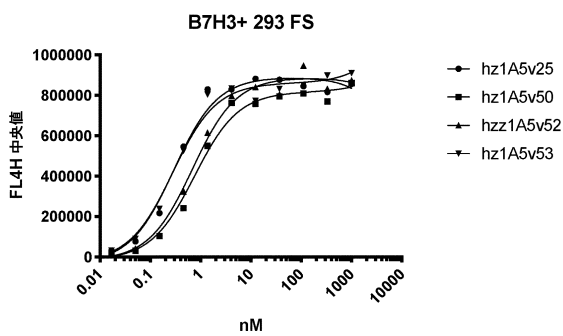


【図 3 A】



30

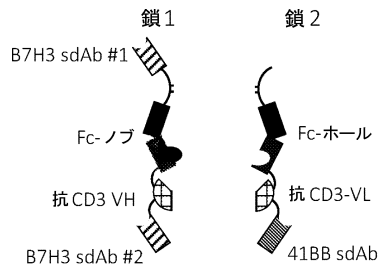
Y



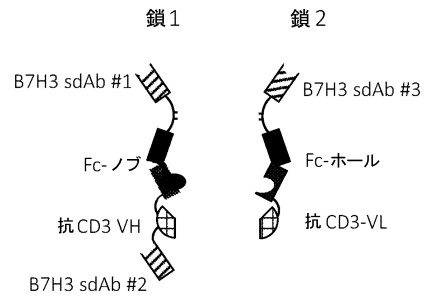
40

50

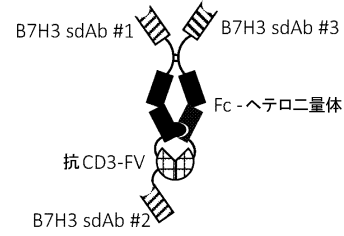
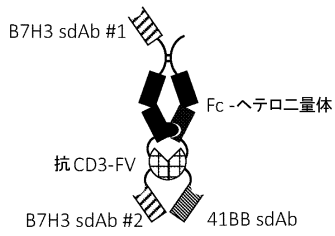
【図 3 B】



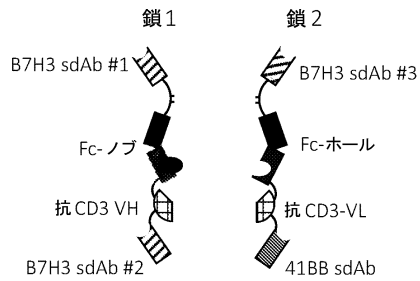
【図 3 C】



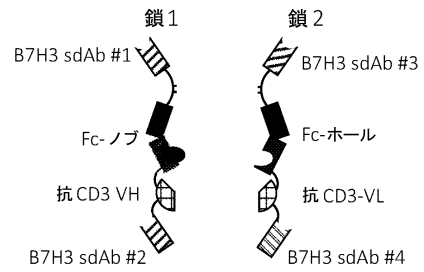
10



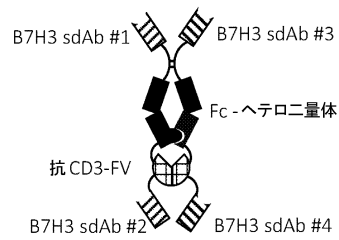
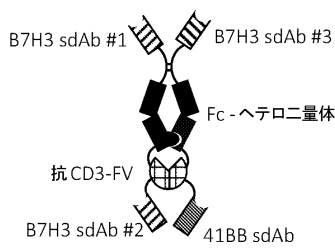
【図 3 D】



【図 3 E】



20

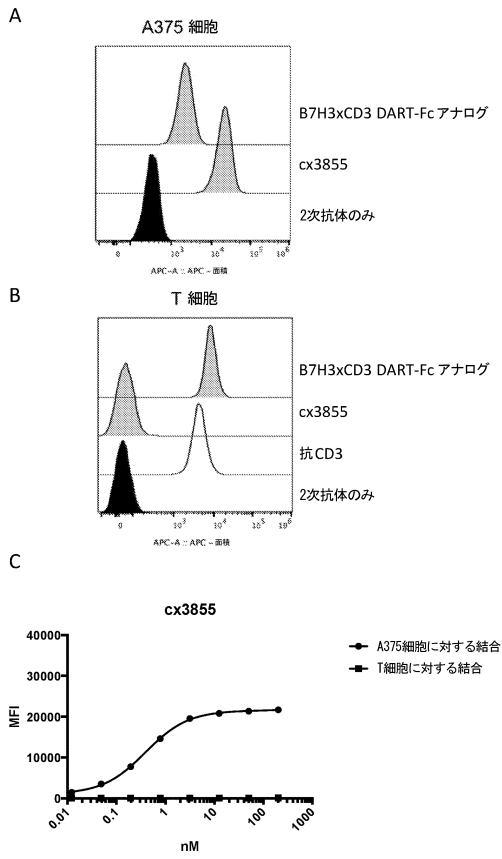


30

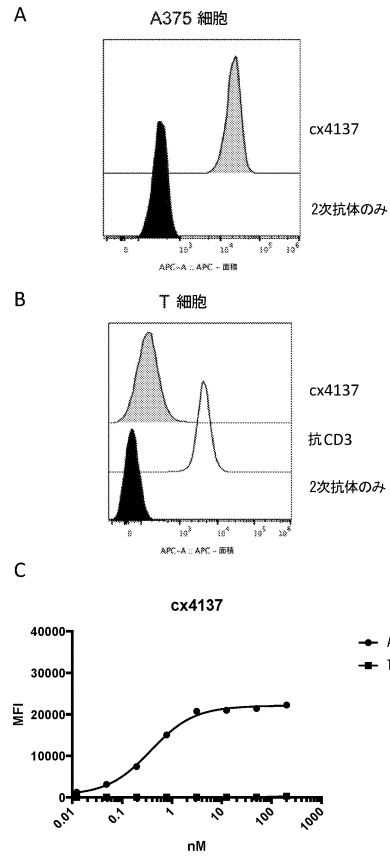
40

50

【 図 4 】



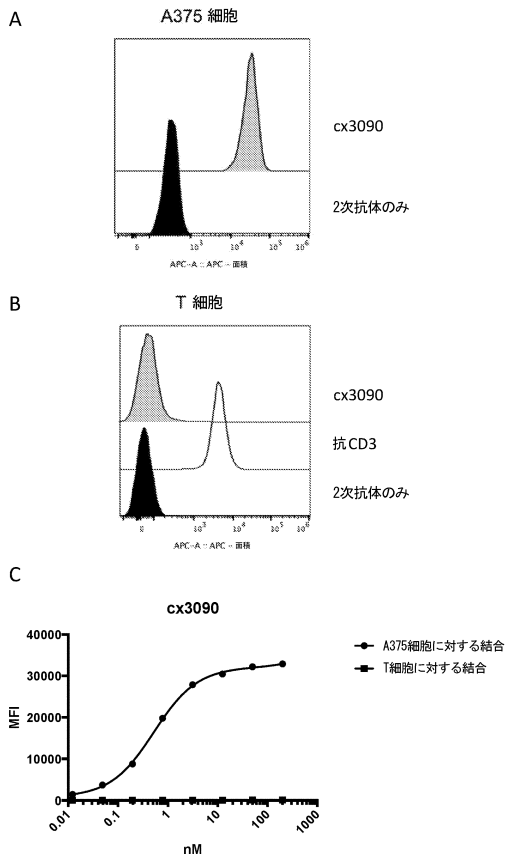
【 図 5 】



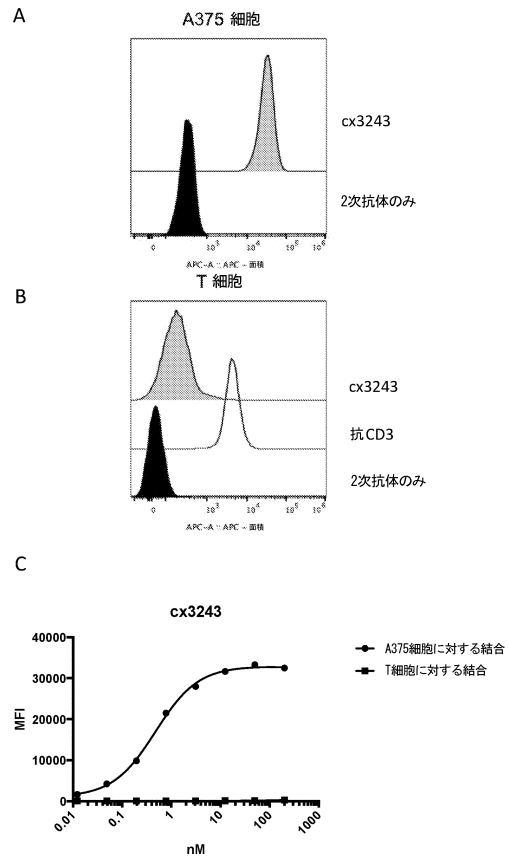
10

20

【 図 6 】



【 図 7 】

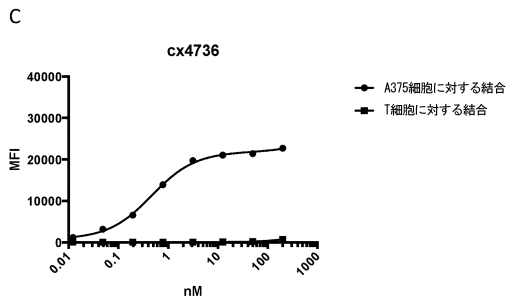
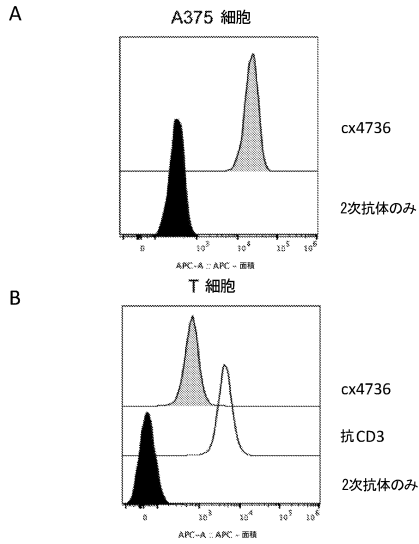


30

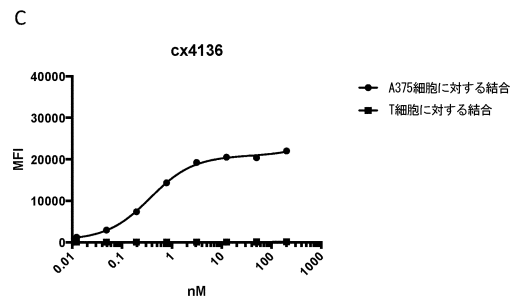
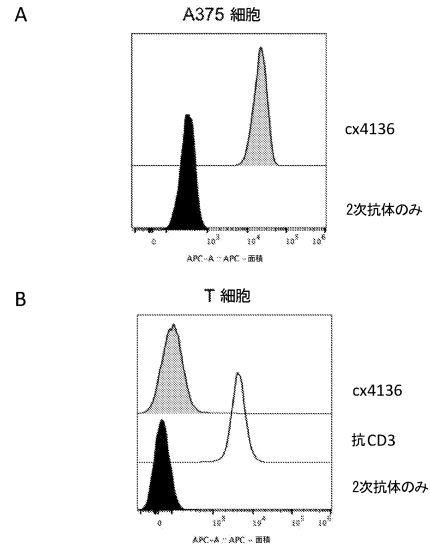
40

50

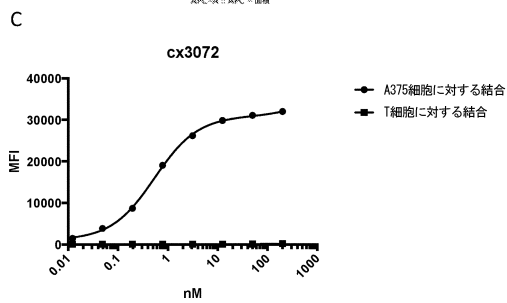
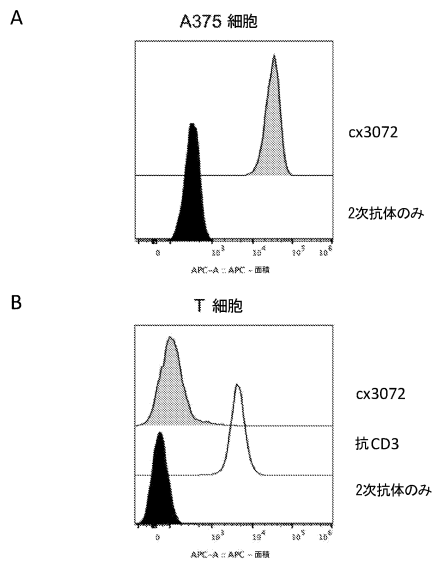
【図 8】



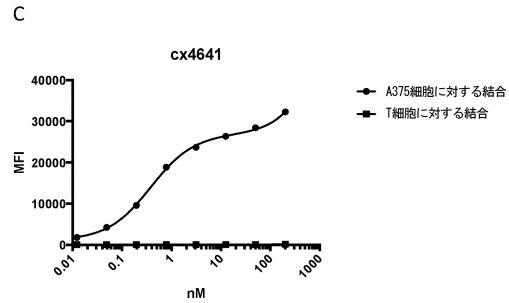
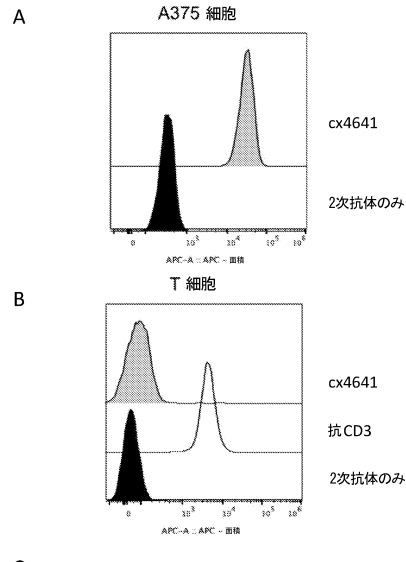
【図 9】



【図 10】



【図 11】



10

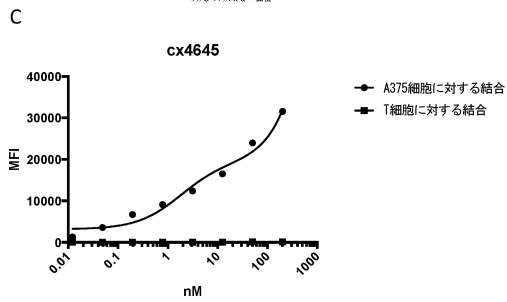
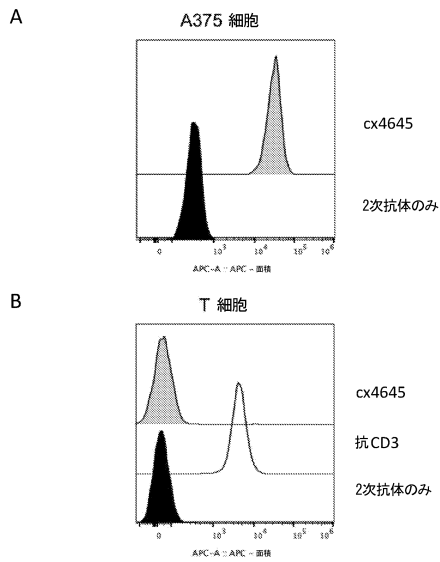
20

30

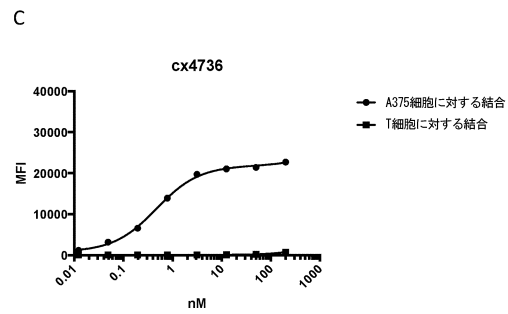
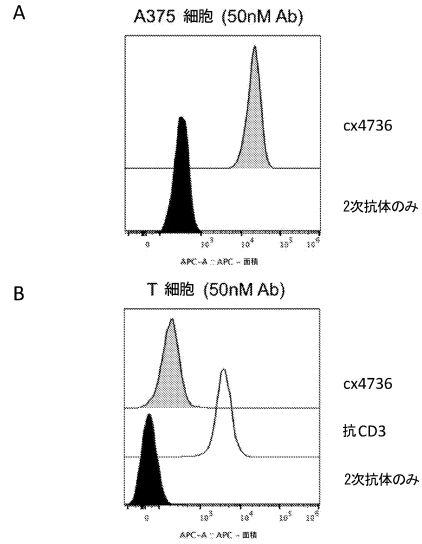
40

50

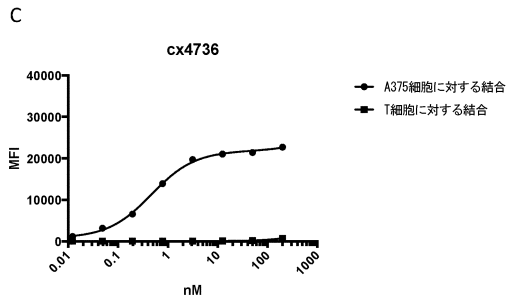
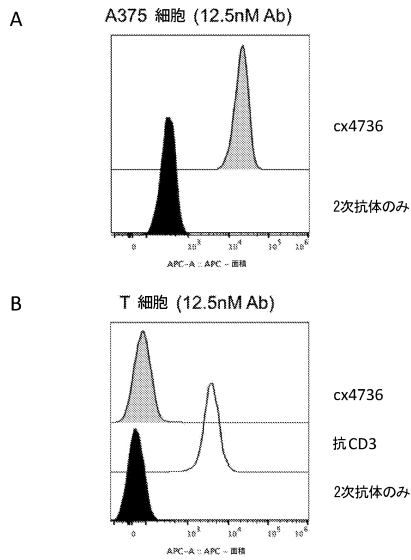
【図 1 2】



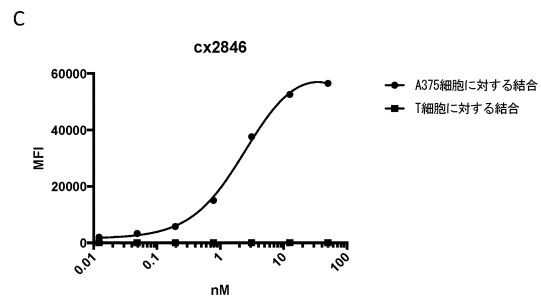
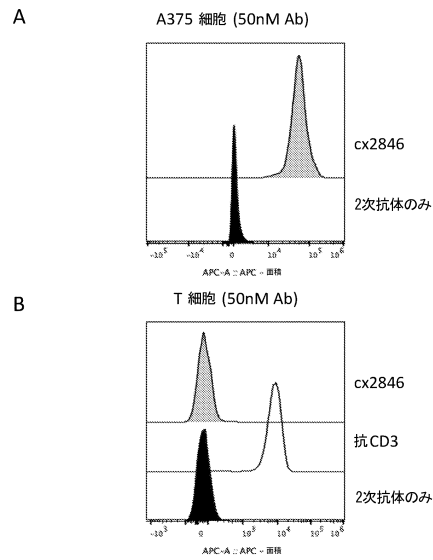
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



10

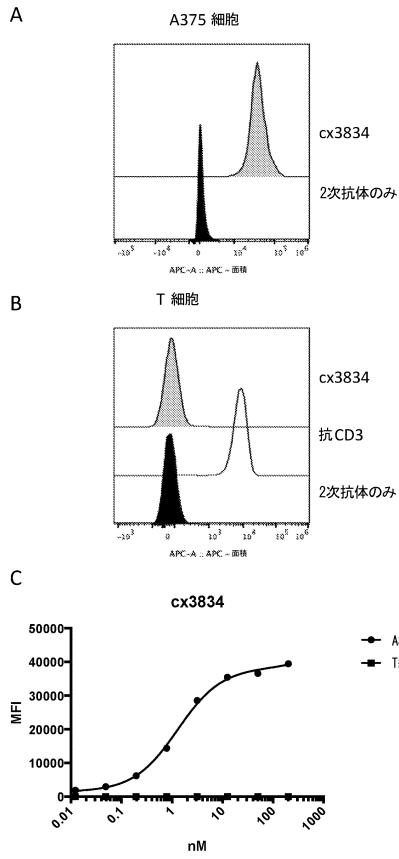
20

30

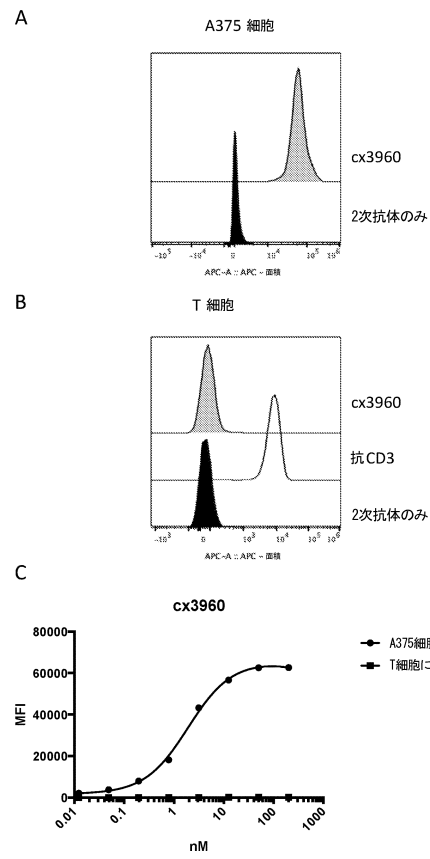
40

50

【図 16】



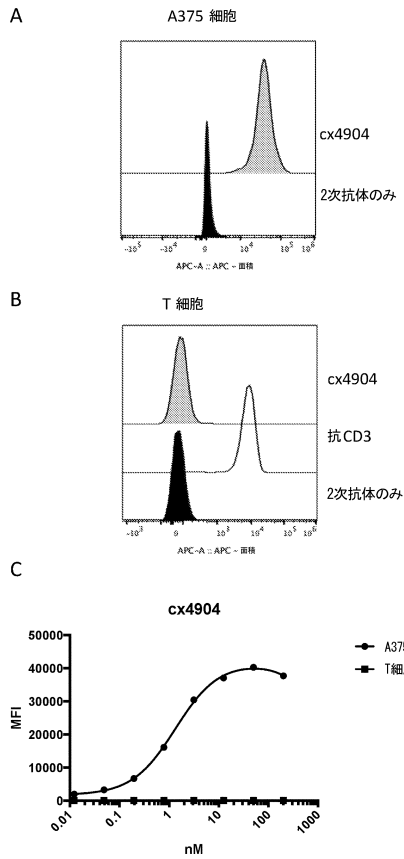
【図 17】



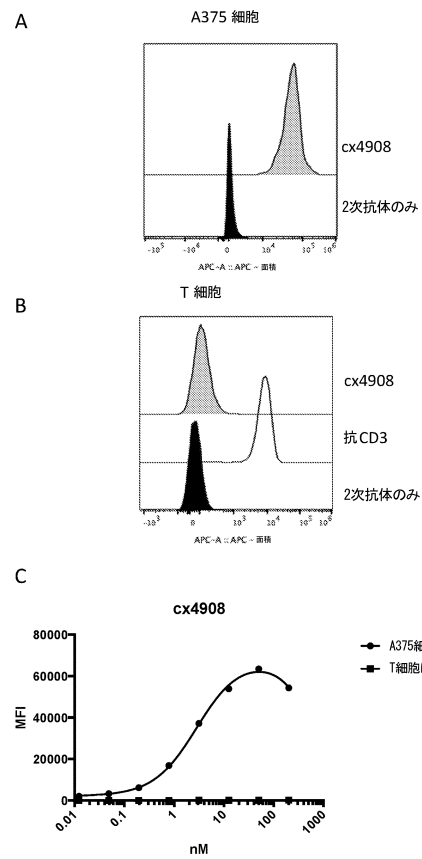
10

20

【図 18】



【図 19】



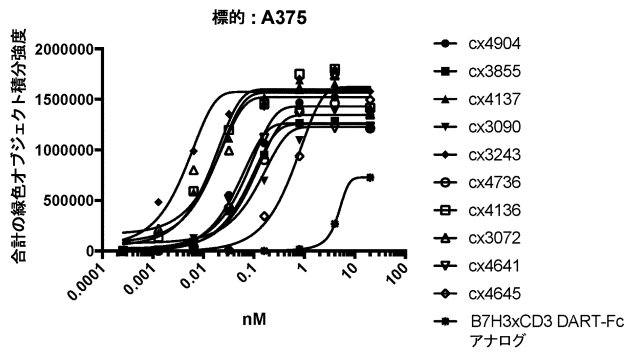
30

40

50

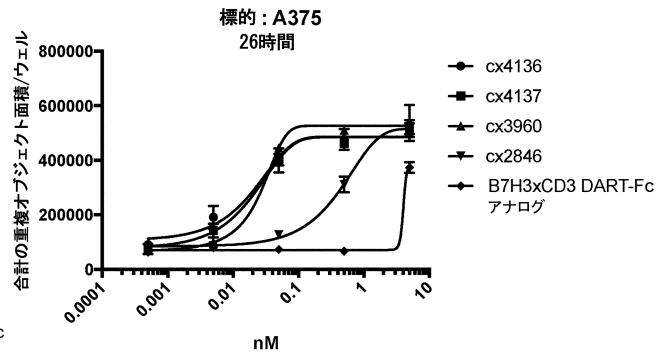
【図 2 0】

A



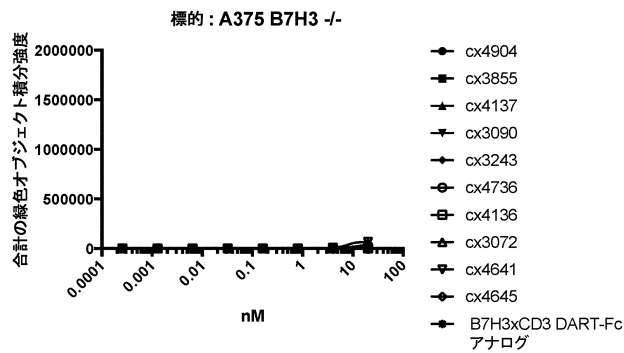
【図 2 1】

A

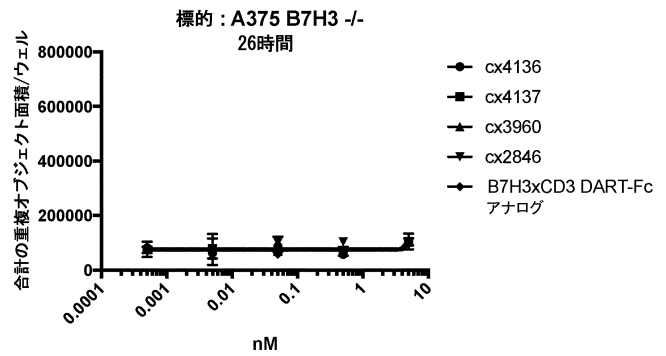


10

B



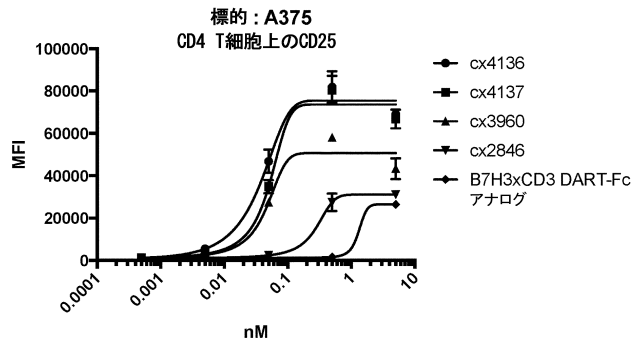
B



20

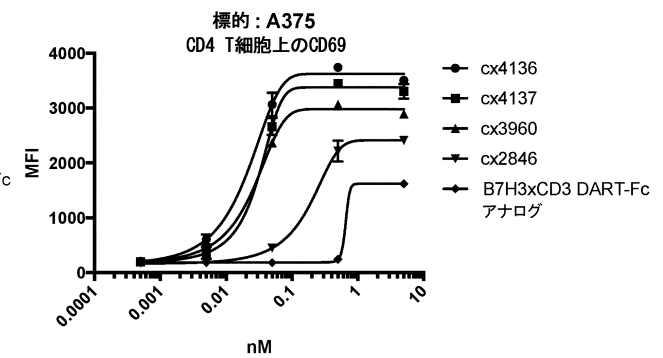
【図 2 2】

A



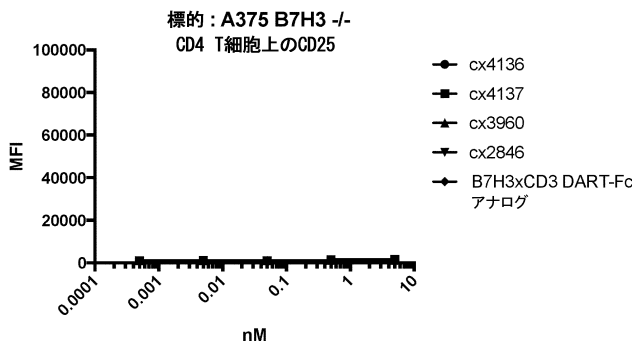
【図 2 3】

A

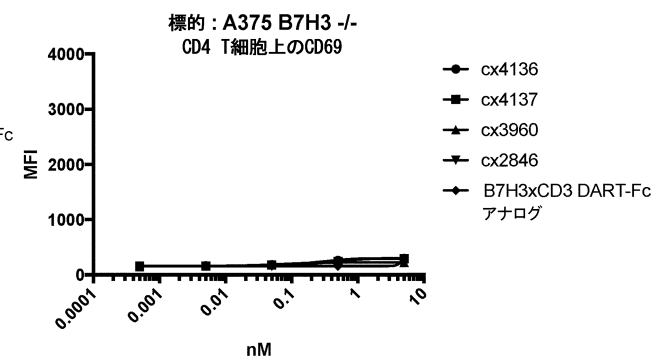


30

B



B

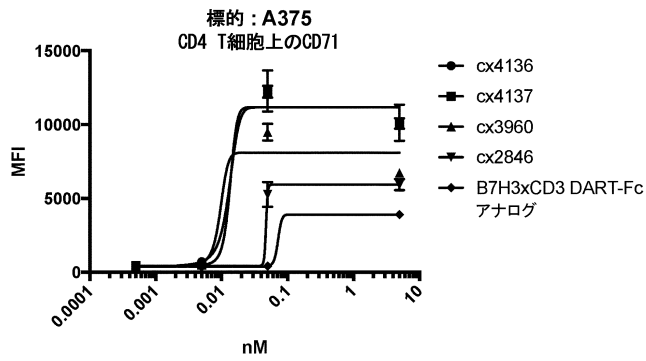


40

50

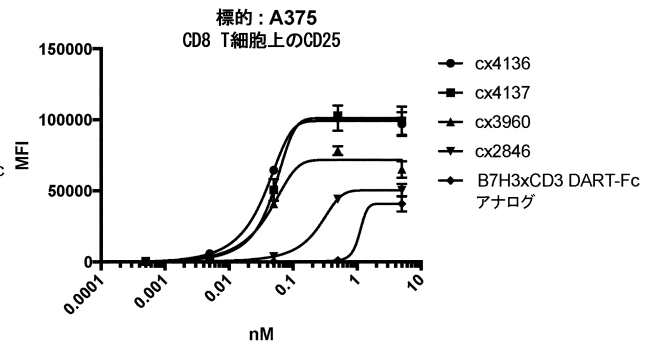
【図 2 4】

A



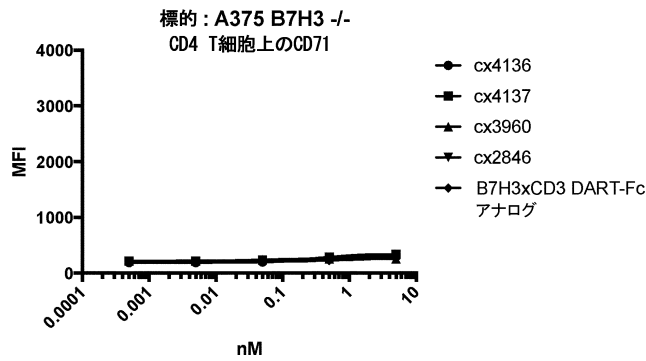
【図 2 5】

A

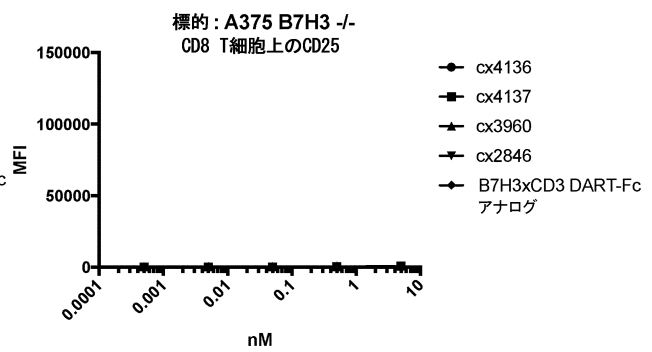


10

B



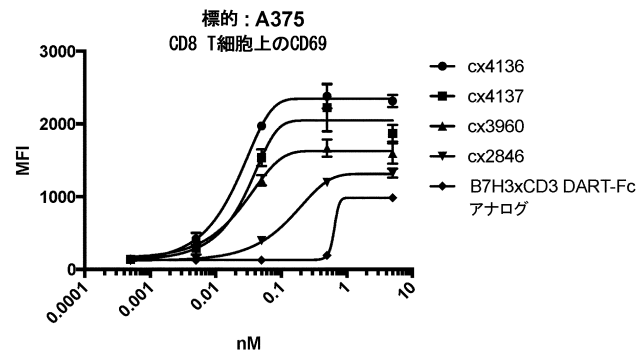
B



20

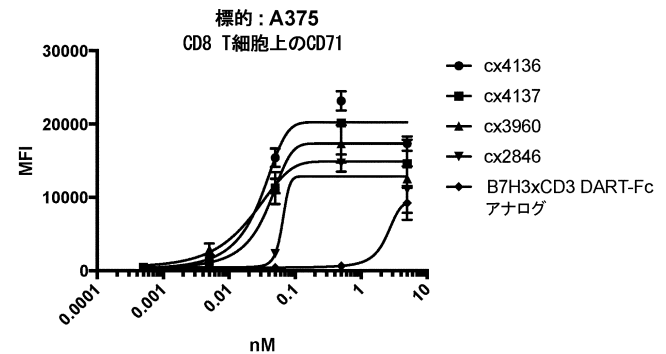
【図 2 6】

A



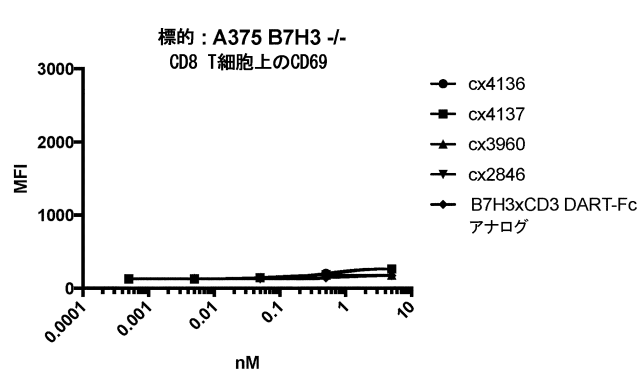
【図 2 7】

A

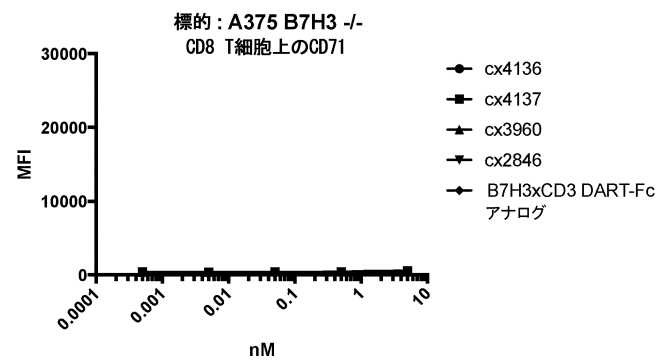


30

B



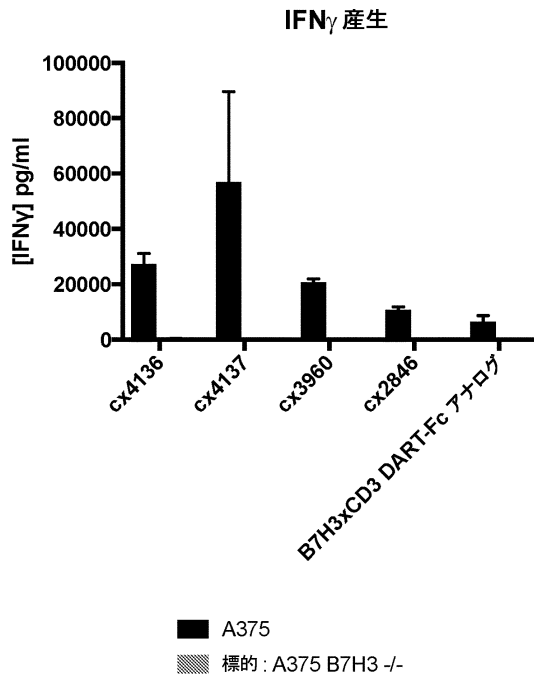
B



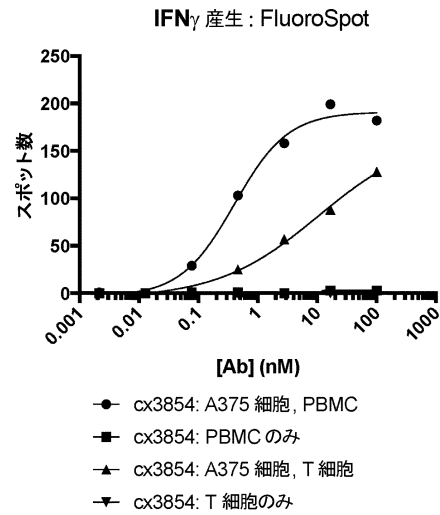
40

50

【図 28 A】



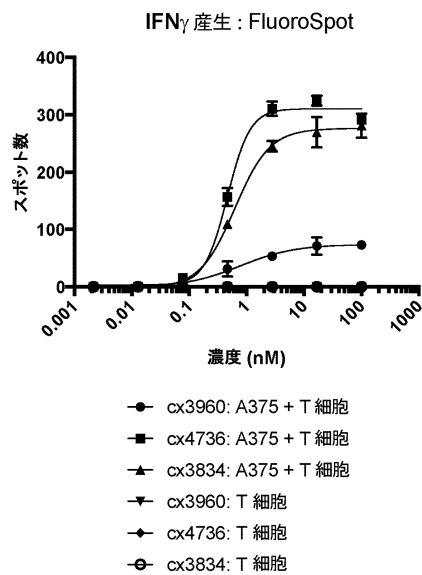
【図 28 B】



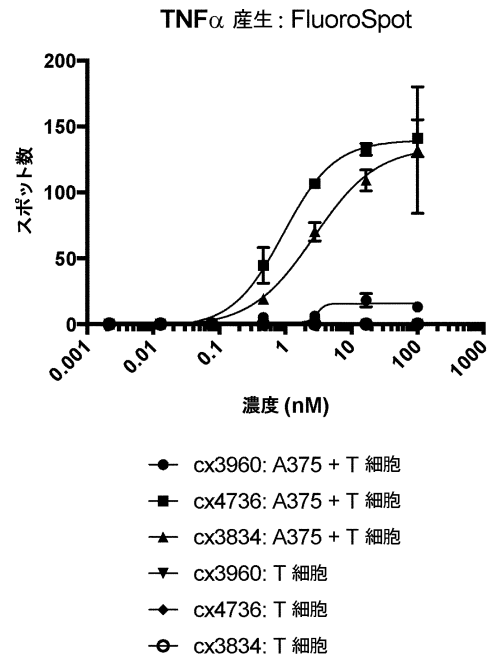
10

20

【図 28 C】



【図 28 D】



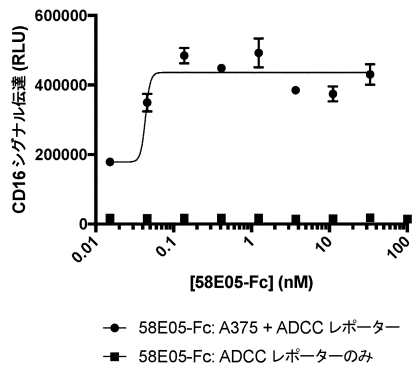
30

40

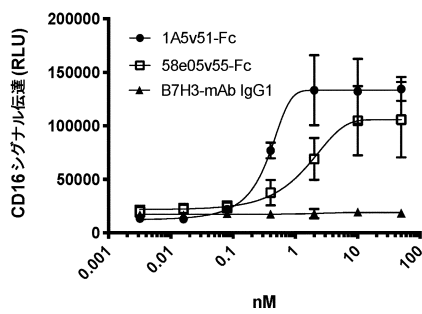
50

【図 29】

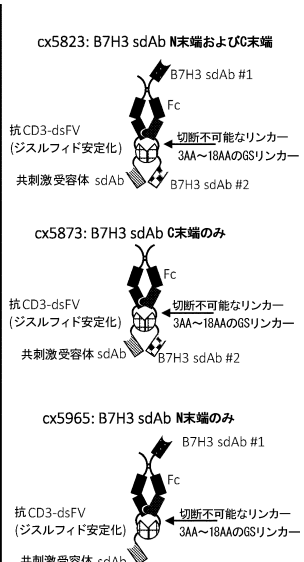
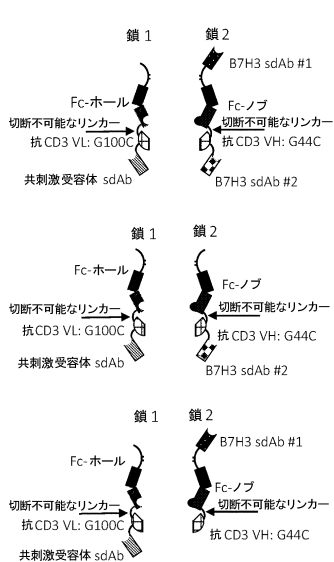
A



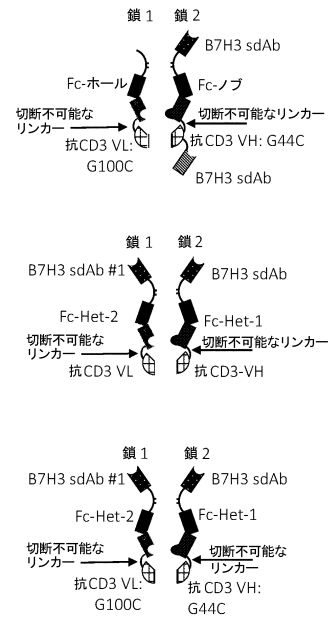
B



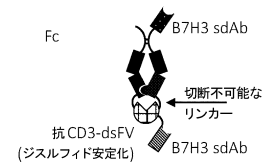
【図 30 B】



【図 30 A】



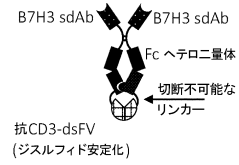
sdAb-Fc-dsFV: cx3072, cx5952



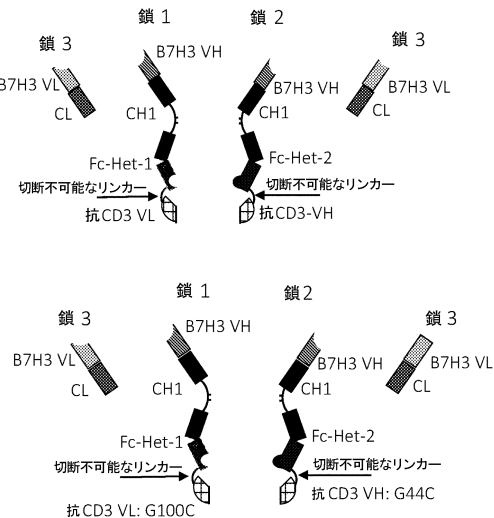
sdAb-Fc-FV: cx6079



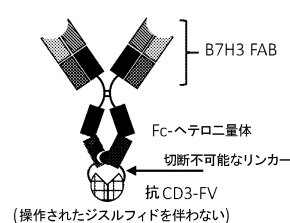
sdAb-Fc-dsFV: cx6080, cx6081



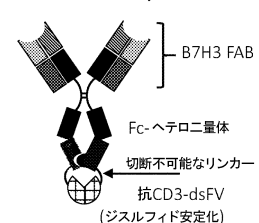
【図 30 C】



MAB-Fv: cx5067



MAB-dsFV: cx6083, cx6084



10

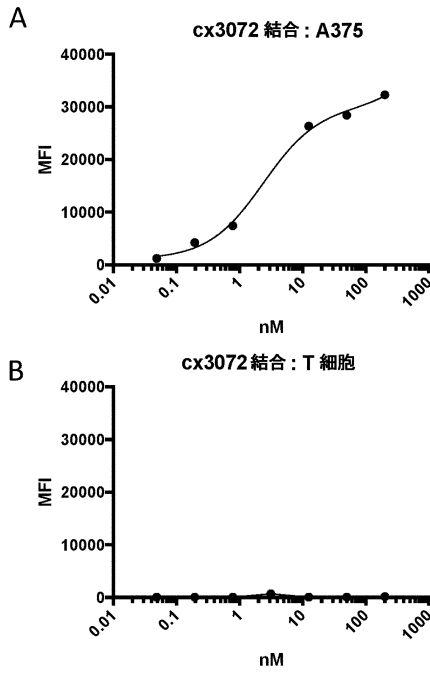
20

30

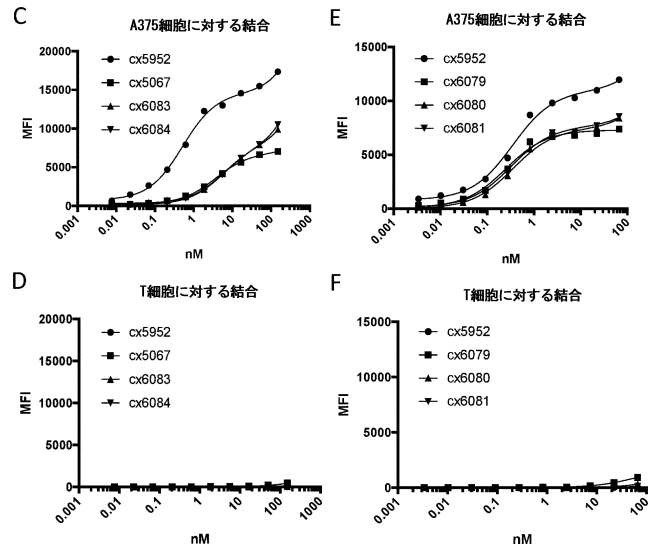
40

50

【図 3 1 - 1】



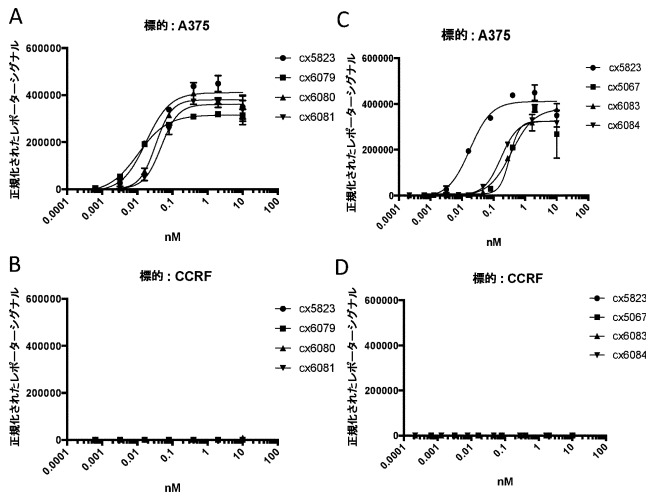
【図 3 1 - 2】



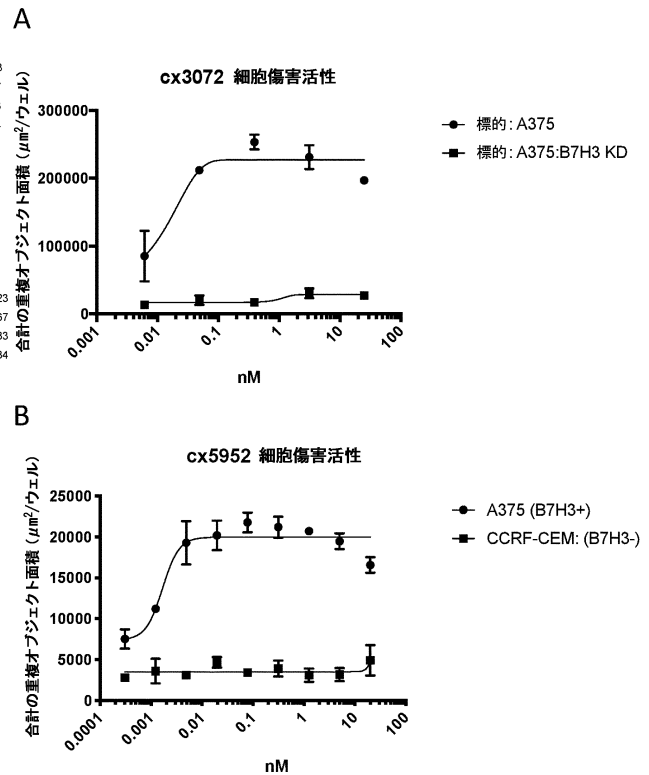
10

20

【図 3 2】



【図 3 3】

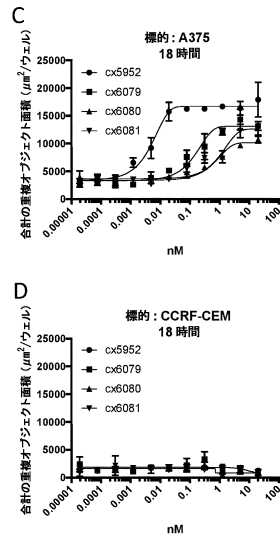
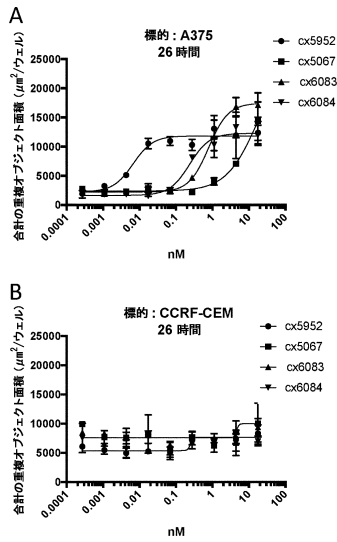


30

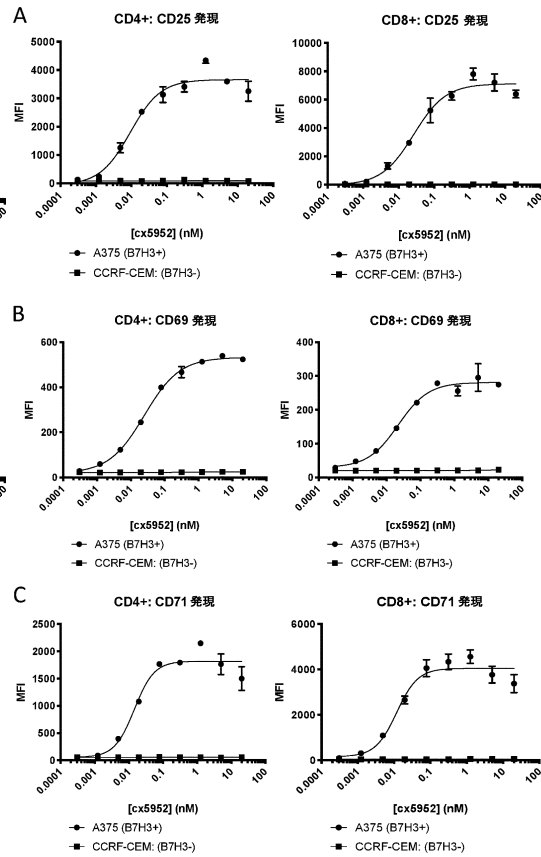
40

50

【図 3 4】



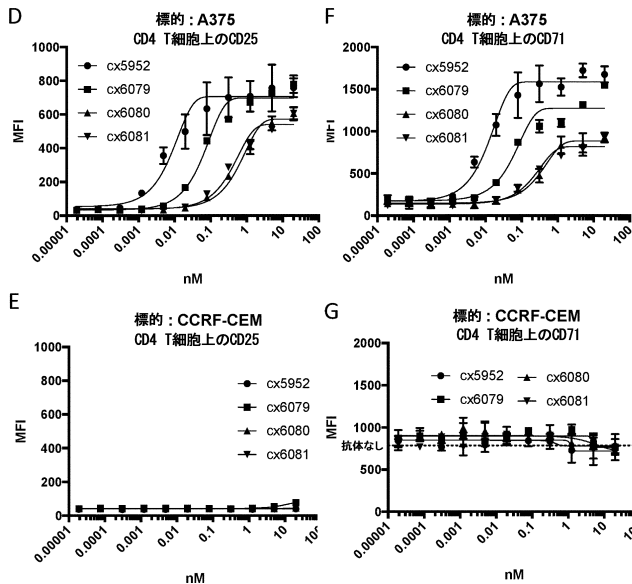
【図 3 5 - 1】



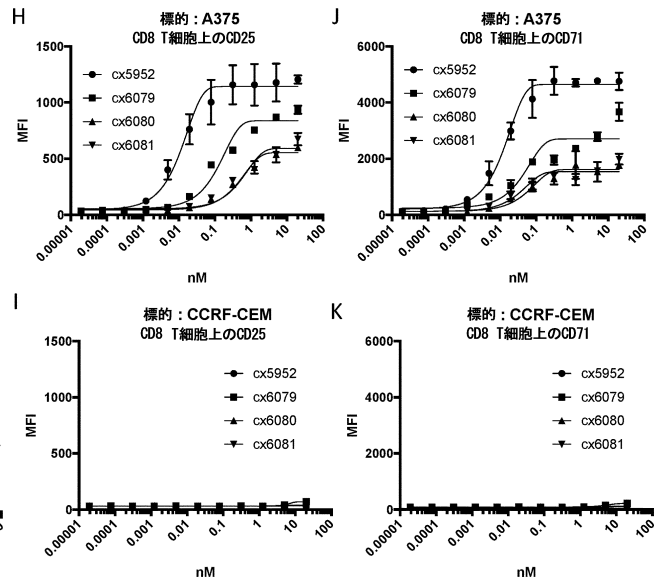
10

20

【図 3 5 - 2】



【図 3 5 - 3】

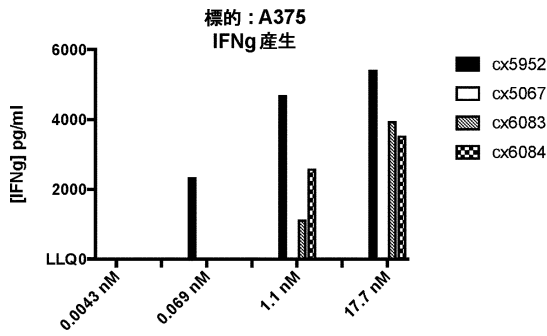


30

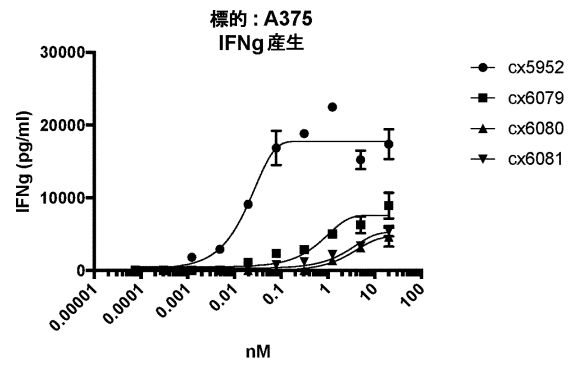
40

50

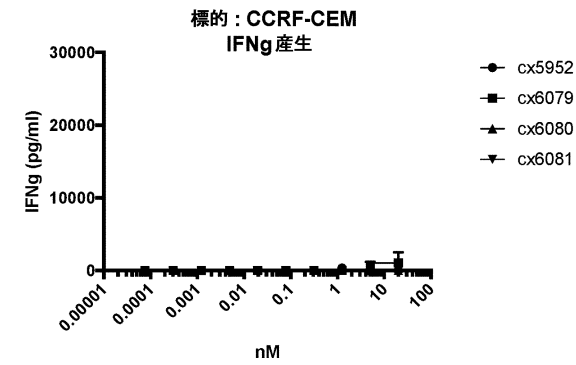
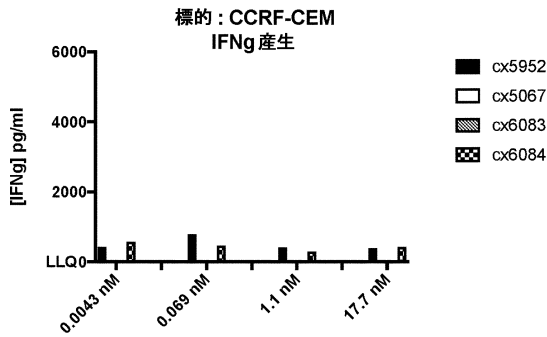
【図 3 6 A】



【図 3 6 B】



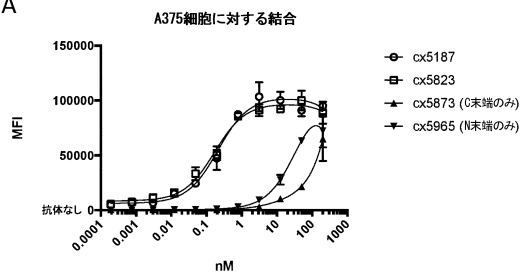
10



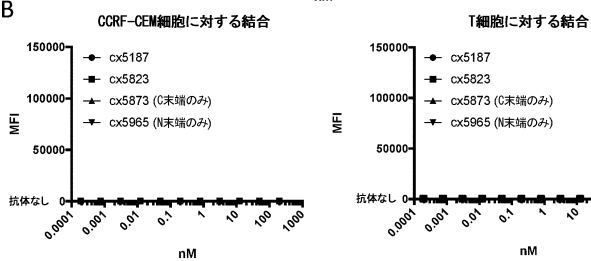
20

【図 3 7】

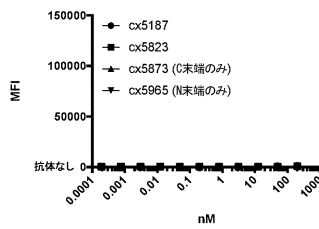
A



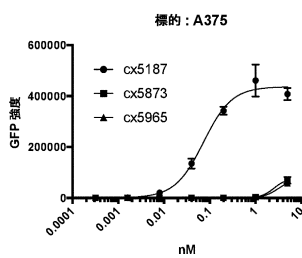
B



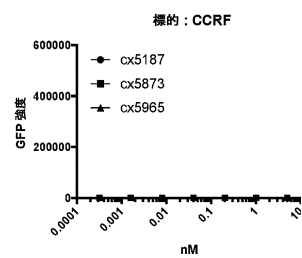
T細胞に対する結合



C

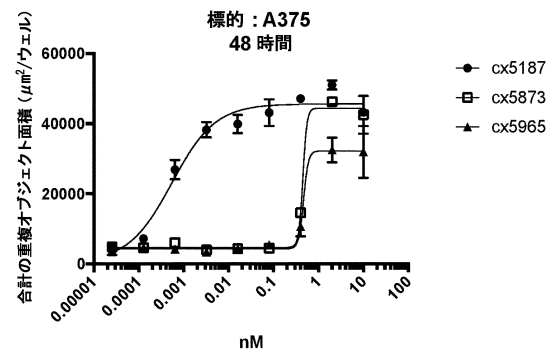


D



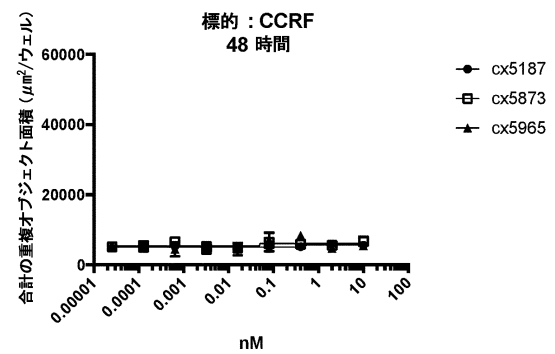
【図 3 8】

A



30

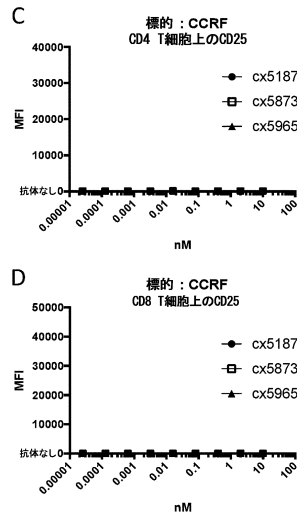
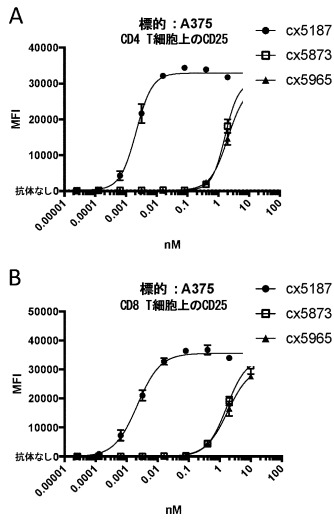
B



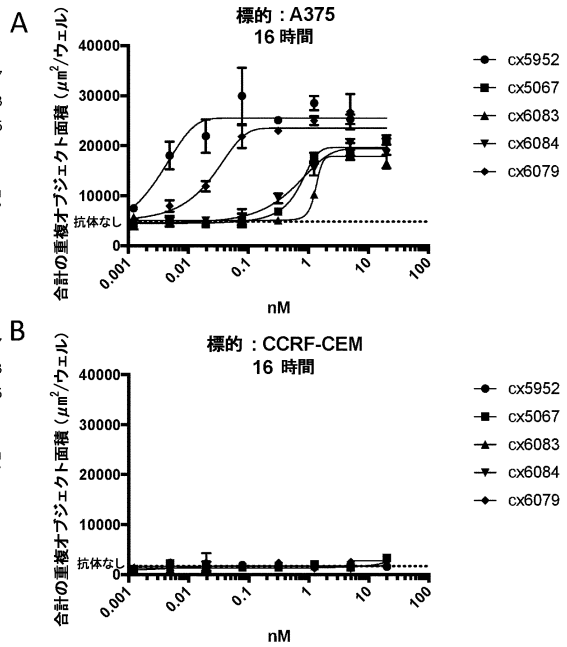
40

50

【図 39】



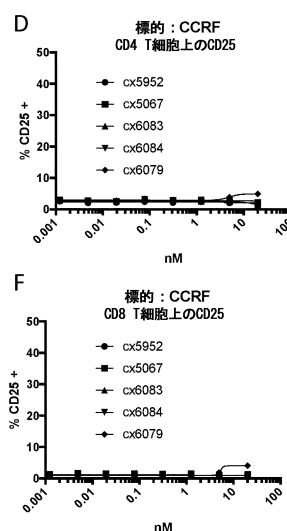
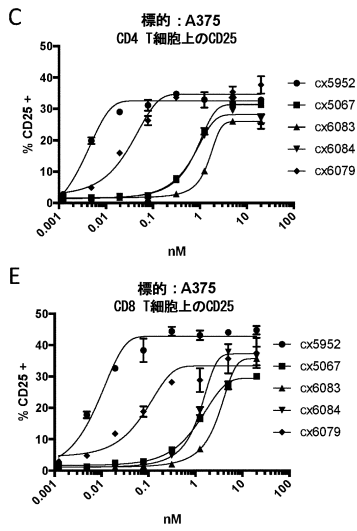
【図 40 - 1】



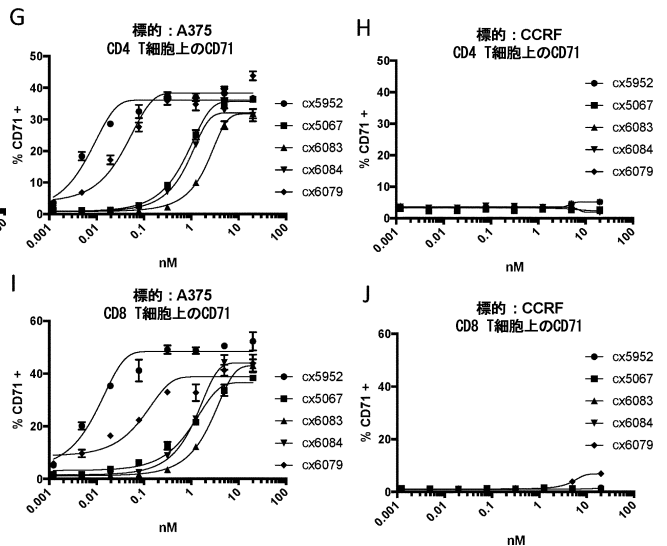
10

20

【図 40 - 2】



【図 40 - 3】

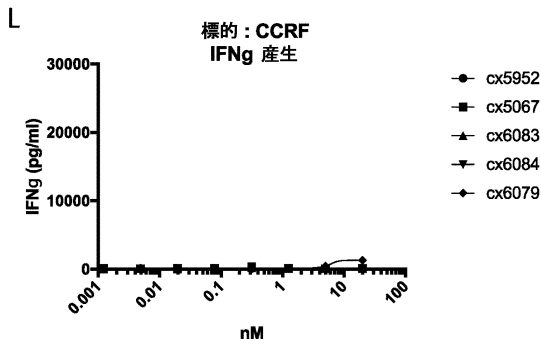
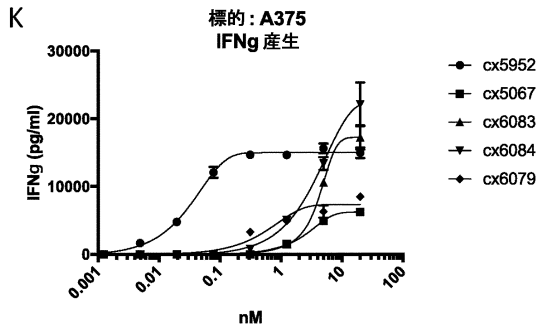


30

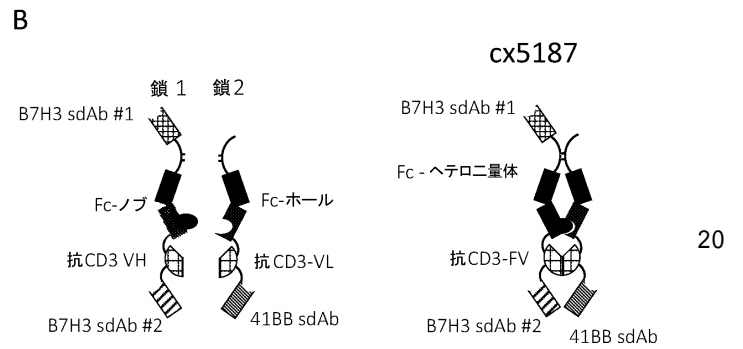
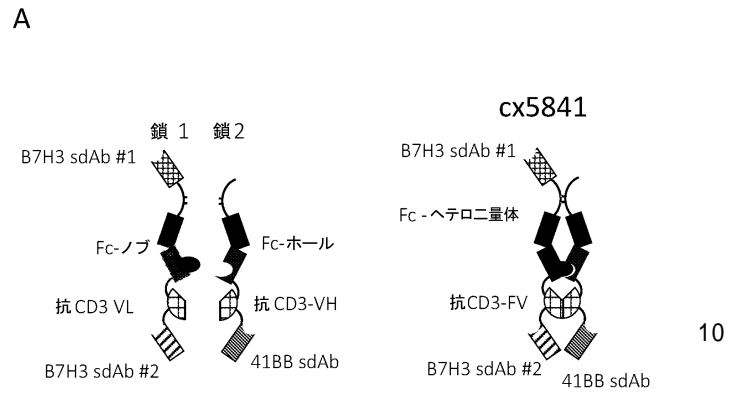
40

50

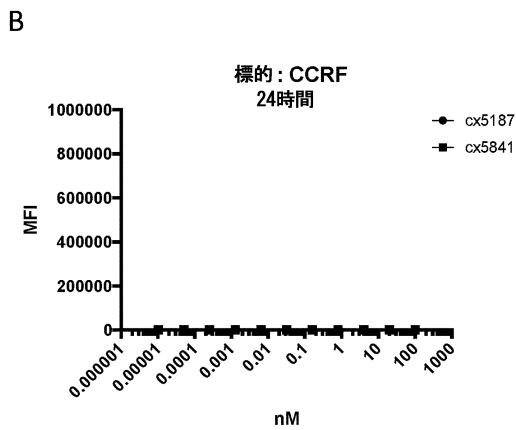
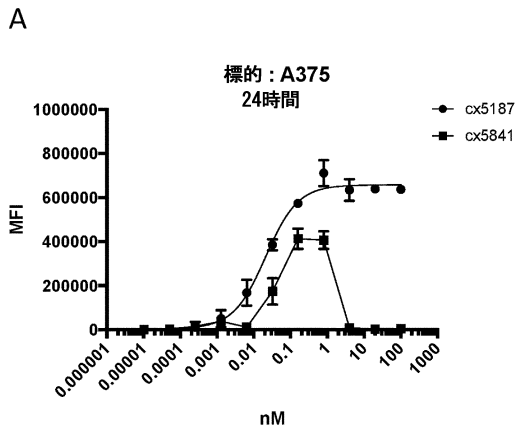
【図 4 0 - 4】



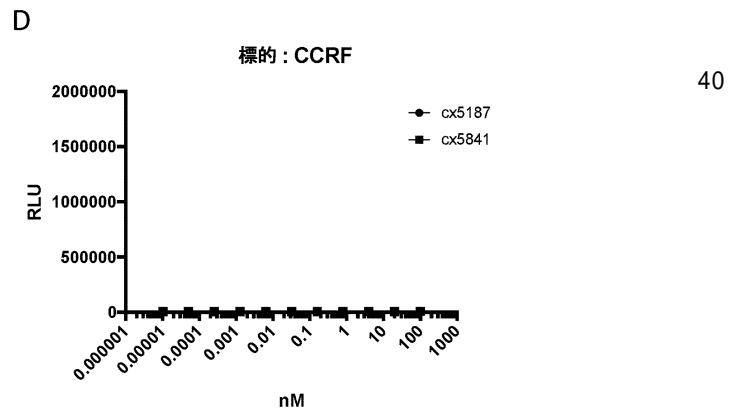
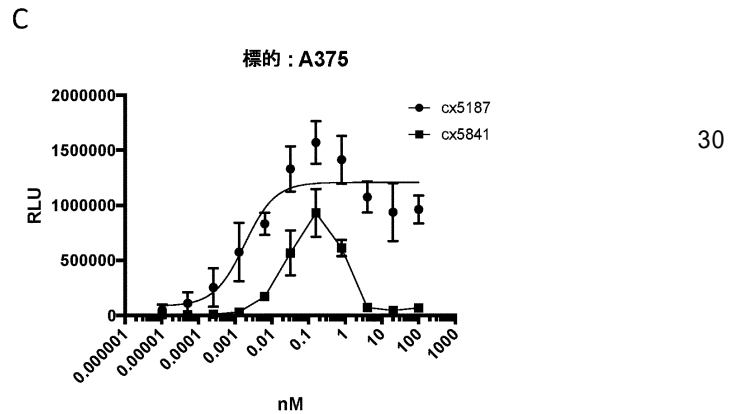
【図 4 1】



【図 4 2 - 1】



【図 4 2 - 2】



【配列表】

2022512684000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/055427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61P35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/033225 A2 (SLOAN KETTERING INST CANCER [US]) 3 March 2016 (2016-03-03) paragraphs [0334], [0003] - [0005], [0310] - [0412]; claims 1-88 -----	1-221
X	WO 2012/162067 A2 (MACROGENICS INC [US]; HUANG LING [US]; JOHNSON LESLIE S [US]) 29 November 2012 (2012-11-29) paragraphs [0025], [0040], [0049], [0050], [0138], [0168]; examples 8,11 ----- -/--	1-221
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 January 2020		Date of mailing of the international search report 21/01/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Marinoni J-C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/055427

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HEATHER A HUET ET AL: "Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction", MABS, vol. 6, no. 6, 30 October 2014 (2014-10-30), pages 1560-1570, XP055532133, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/19420862.2014.975099 -----	1-221
A	WO 2018/014260 A1 (NANJING LEGEND BIOTECH CO LTD [CN]) 25 January 2018 (2018-01-25) -----	1-221
A	WO 2016/192613 A1 (SUN YAT-SEN UNIV [CN]) 8 December 2016 (2016-12-08) example 1 -----	1-221

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/055427

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016033225	A2	03-03-2016	AU 2015306621 A1	16-03-2017
			BR 112017003582 A2	27-02-2018
			CA 2959356 A1	03-03-2016
			CN 106715469 A	24-05-2017
			EP 3186277 A2	05-07-2017
			JP 2017532952 A	09-11-2017
			KR 20170042786 A	19-04-2017
			US 2017240637 A1	24-08-2017
			WO 2016033225 A2	03-03-2016

WO 2012162067	A2	29-11-2012	AU 2012259161 A1	12-12-2013
			AU 2017204545 A1	20-07-2017
			AU 2019200159 A1	31-01-2019
			BR 112013029893 A2	30-05-2017
			BR 122016016837 A2	27-08-2019
			CA 2836857 A1	29-11-2012
			CL 2013003329 A1	04-07-2014
			CL 2016001254 A1	02-12-2016
			CN 103703024 A	02-04-2014
			CN 107722124 A	23-02-2018
			CN 107827985 A	23-03-2018
			CO 6970560 A2	13-06-2014
			DK 2714733 T3	06-05-2019
			EA 201391735 A1	31-03-2014
			EC SP13013101 A	31-01-2014
			EP 2714733 A2	09-04-2014
			EP 3492494 A1	05-06-2019
			ES 2732213 T3	21-11-2019
			HR P20190756 T1	14-06-2019
			HU E044209 T2	28-10-2019
			IL 229575 A	31-05-2018
			IL 259187 A	28-02-2019
			JP 6141831 B2	07-06-2017
			JP 6496349 B2	03-04-2019
			JP 2014517844 A	24-07-2014
			JP 2017206505 A	24-11-2017
			JP 2019142866 A	29-08-2019
			KR 20140033107 A	17-03-2014
			KR 20190105112 A	11-09-2019
			LT 2714733 T	10-06-2019
			MA 35174 B1	02-06-2014
			NZ 618021 A	27-02-2015
			NZ 703939 A	29-01-2016
			PL 2714733 T3	30-08-2019
			PT 2714733 T	23-05-2019
			SG 195072 A1	30-12-2013
			SG 10201509588T A	30-12-2015
			SG 10201703425R A	30-05-2017
			SI 2714733 T1	28-06-2019
			UA 115122 C2	25-09-2017
			UA 115402 C2	25-10-2017
			UA 117072 C2	11-06-2018
			US 2014099318 A1	10-04-2014
			US 2017137519 A1	18-05-2017
			US 2019040135 A1	07-02-2019
			WO 2012162067 A2	29-11-2012
			ZA 201308602 B	30-07-2014

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/055427

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018014260 A1	25-01-2018	AU 2017300349 A1	14-02-2019
		BR 112019000970 A2	30-04-2019
		CA 3030933 A1	25-01-2018
		CN 109476762 A	15-03-2019
		EA 201990331 A1	28-06-2019
		EP 3487887 A1	29-05-2019
		JP 2019524693 A	05-09-2019
		KR 20190040483 A	18-04-2019
		SG 11201811640S A	27-02-2019
		US 2019202935 A1	04-07-2019
		WO 2018014260 A1	25-01-2018
		WO 2018014855 A1	25-01-2018

WO 2016192613 A1	08-12-2016	NONE	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 39/395	U
C 0 7 K 14/56 (2006.01)	A 6 1 K 35/17	A
C 0 7 K 14/565 (2006.01)	C 0 7 K 14/56	
C 0 7 K 14/57 (2006.01)	C 0 7 K 14/565	
	C 0 7 K 14/57	

(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)

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, D, J, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 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 ジョーンズ カイル エス .

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
- (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
- F ターム (参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
 4C085 AA14 AA16 BB11 BB36 BB42 CC01 CC07 CC08 DD23 DD31
 DD62 EE01
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA05 NA14 ZB09 ZB26
 4H045 AA11 BA41 CA40 DA16 DA17 DA18 DA76 EA20 FA74

【要約の続き】

FIG. 3A

