

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7651450号
(P7651450)

(45)発行日 令和7年3月26日(2025.3.26)

(24)登録日 令和7年3月17日(2025.3.17)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13 Z N A
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
請求項の数 31 (全201頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-503831(P2021-503831)	(73)特許権者	524252194
(86)(22)出願日	令和1年7月23日(2019.7.23)		インヒブルクス バイオサイエンシズ インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2021-531785(P2021-531785 A)		アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア ラ ホーヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1 0 2 5 스위트 1 4 0
(43)公表日	令和3年11月25日(2021.11.25)	(74)代理人	100102978
(86)国際出願番号	PCT/US2019/043115		弁理士 清水 初志
(87)国際公開番号	WO2020/023553	(74)代理人	100205707
(87)国際公開日	令和2年1月30日(2020.1.30)		弁理士 小寺 秀紀
審査請求日	令和4年7月21日(2022.7.21)	(74)代理人	100160923
(31)優先権主張番号	62/702,888		弁理士 山口 裕孝
(32)優先日	平成30年7月24日(2018.7.24)	(74)代理人	100119507
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 刑部 俊
(31)優先権主張番号	62/744,641	(74)代理人	100142929
(32)優先日	平成30年10月11日(2018.10.11)		
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 制約されたCD3結合ドメインおよび受容体結合領域を含有する多重特異性ポリペプチド構築物ならびにそれを使用する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫グロブリンFc領域を含む第1の成分およびCD3結合領域を含む第2の成分を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

CD3結合領域が、可変重鎖領域（VH）および可変軽鎖領域（VL）を含むジスルフィド安定化抗CD3結合Fv断片（dsFv）であり；

Fc領域が、ヘテロ二量体Fc領域であり、かつ抗CD3 dsFvのVHおよびVLが、ヘテロ二量体Fcの対向するポリペプチドに連結されており；

第1および第2の成分が、3～18アミノ酸長でありかつ少なくとも80%のグリシン残基またはセリン残基で構成されるポリペプチドリンカーによってカップリングされており、Fc領域がCD3結合領域に対してN末端側に位置付けられており；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み、少なくとも1つの抗原結合ドメインの各々がsdAbであり；

第2の成分が、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）を含み、少なくとも1つのCRBRの各々がsdAbである、多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項2】

少なくとも1つの抗原結合ドメインが、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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられてい

る、請求項1記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項3】

少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）が、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側およびCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、請求項1または請求項2記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項4】

第1の成分が第1の抗原結合ドメインを含み、第2の成分が第2の抗原結合ドメインを含み、抗原結合ドメインの各々が腫瘍関連抗原（TAA）に結合する、請求項1～3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5】

N末端からC末端へ順に、

腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン；

第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドを含む、ヘテロ二量体免疫グロブリンFc領域；

3～18アミノ酸長でありかつ少なくとも80%のグリシン残基で構成されるポリペプチドリンカー；

可変重鎖領域（VH）および可変軽鎖領域（VL）を含む、CD3（CD3ε）に結合する抗CD3 dsFvであって、抗CD3 dsFvのVHおよびVLが、ヘテロ二量体Fcの対向するポリペプチドに連結されている、抗CD3 dsFv；ならびに

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/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン

を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

sdAbである少なくとも1つのCRBRおよびsdAbである少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項6】

Fc領域が、

SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:1との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列、

SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:2との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列、

SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:4との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列、または

SEQ ID NO:5に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:5との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列

を含むポリペプチドを含む、請求項1～5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7】

Fc領域が、FcRn結合を増強するための少なくとも1つの修飾を含むポリペプチドを含む、かつ/または

Fc領域が、エフェクター機能を低下させ、かつ/もしくはFcγ受容体もしくはC1qより選択されるエフェクター分子との結合を低下させる、少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むポリペプチドを含む、

請求項1～6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8】

抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つがそのTAAに結合しない限り、CD3結合領域がCD3に結合または係合することができない、請求項1～7のいずれか一項記載の多重特異

10

20

30

40

50

性ポリペプチド構築物。

【請求項 9】

ポリペプチドリンカーが、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、8～18アミノ酸、8～14アミノ酸、8～12アミノ酸、8～10アミノ酸、10～18アミノ酸、10～14アミノ酸、10～12アミノ酸、12～18アミノ酸、12～14アミノ酸、または14～18アミノ酸長である、

請求項1～8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 10】

ポリペプチドリンカーが、12～18アミノ酸長である、または

ポリペプチドリンカーが、15～18アミノ酸長である、

請求項1～8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 11】

ポリペプチドリンカーが非切断可能リンカーである、請求項1～10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 12】

非切断可能リンカーが、
GGS、GGGGS (SEQ ID NO:149)、GGGGGS (SEQ ID NO:135)、およびそれらの組み合わせを含む、

(GGS)_nを含み、nは1～6である、

(GGGGS)_n (SEQ ID NO:173)を含み、nは1～3である、かつ／または

(GGGGGS)_n (SEQ ID NO:172)を含み、nは1～3である、

請求項11記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 13】

非切断可能リンカーが、
GGS、
GGGGS (SEQ ID NO:149)、
GGGGGS (SEQ ID NO:135)、
(GGS)₂ (SEQ ID NO:10)、
GGS GGS GGS (SEQ ID NO:11)、
GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:12)、
GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:13)、
GGGGGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:119)、
GGS GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:147)、または
GGGGGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:170)
を含む、請求項11または12記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 14】

リンカーが切断可能リンカーである、請求項1～10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 15】

ヘテロ二量体Fc領域を含む第1の成分と、可変重鎖領域 (VH) および可変軽鎖領域 (VL) を含む抗CD3 dsFvを含む第2の成分とを含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

抗CD3 dsFvを構成するVHおよびVLが、ヘテロ二量体Fcの対向するポリペプチドに連結されており；

第1および第2の成分が、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より選択されるプロテアーゼの基質である切断可能リンカーによってカップリングされており、切断可能リンカーは、6～24アミノ酸長であり、かつSEQ ID NO:150、151、154、155、157、または158に示されるアミノ酸配列を含み；

ヘテロ二量体Fc領域が抗CD3抗体に対してN末端側に位置付けられており；

10

20

30

40

50

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み、少なくとも1つの抗原結合ドメインの各々がsdAbであり；

第2の成分が、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）を含み、少なくとも1つのCRBRの各々がsdAbである、

多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項16】

sdAbが、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、請求項1～15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17】

抗原結合ドメインが、または抗原結合ドメインの各々が独立に、1-92-LFA-3、5T4、 $\alpha 4$ インテグリン、 αV インテグリン、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン、AGR2、抗ルイスY、アペリンJ受容体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5補体、C-242、CA9、CA19-9（ルイスa）、炭酸脱水酵素9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132（IL-2RG）、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5（CEA）、CEACAM6（NCA-90）、クローディン3、クローディン4、cMet、コラーゲン、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、エンドセリンB受容体（ETBR）、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSVのFタンパク質、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、葉酸受容体 α （FR α ）、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-CSF、GM-CSFR、GP IIb/IIIa受容体、Gp130、GPIIB/IIIA、GPNMB、GRP78、HER2/neu、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、ヒアルロニダーゼ、ICOS、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IgE、IgE受容体（Fc ϵ RI）、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12R β 1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27/IL27R（wsx1）、IL29、IL-31R、IL31/IL31R、IL2R、IL4、IL4R、IL6、IL6R、インスリン受容体、Jaggedリガンド、Jagged1、Jagged2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、ルイスX、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、メソテリン、MRP4、MUC1、ムチン16（MUC16、CA-125）、Na/K ATPアーゼ、NGF、ニカストリン（Nicastrin）、ノッチ受容体、ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFR α 、PDGFR β 、PD-1、PD-L1、PD-L2、ホスファチジルセリン、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、スフィンゴシン1リン酸、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGF β 、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNF α 、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、トランスフェリン、トランスフェリン受容体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2、およびWISP-3より選択される腫瘍抗原に結合する、請求項1～16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18】

（a）多重特異性ポリペプチド構築物が、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を少なくとも含み、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が、同一のTAAに結合する、または

（b）多重特異性ポリペプチド構築物が、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を少なくとも含み、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が、異なるTAAに結合する、

請求項1～17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

20

30

40

50

【請求項 19】

少なくとも1つの共刺激受容体結合領域 (CRBR) が、41BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD27、グルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質 (GITR)、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体 (BAFF-R)、B細胞成熟抗原 (BCMA)、膜貫通型活性化因子およびCAML相互作用因子 (Transmembrane activator and CAML interactor) (TACI)、ならびにNKG2Dより選択される共刺激受容体に結合する、請求項1～18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 20】

抗CD3 dsFvが、

(a) アミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 312)を含むVH CDR1；アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 313)を含むVH CDR2；アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18)を含むVH CDR3；アミノ酸配列GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 319)を含むVL CDR1；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:320)を含むVL CDR2；およびアミノ酸配列ALWYSNHWW (SEQ ID NO: 315)を含むVL CDR3、ならびに／または

(b) SEQ ID NO:14、32～62、287、290、および311のうちのいずれかのアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:14、32～62、287、290、および311のうちのいずれかとの少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有する、VH；ならびに

SEQ ID NO:15、63～81、241、288、および289のうちのいずれかのアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:15、63～81、241、288、および289のうちのいずれかとの少なくとも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、請求項1～19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 21】

ヘテロ二量体Fcの第1のポリペプチドが、SEQ ID NO: 82、84、86、88、94～97、291、293、297、298、または285のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつヘテロ二量体Fcの第2のポリペプチドが、SEQ ID NO:83、85、87、89～93、98～101、292、294～296、295、299、300、または286のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項1～20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 22】

作用物質にコンジュゲートされている、請求項1～21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 23】

請求項1～22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 24】

請求項1～22のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物の第1のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、多重特異性ポリペプチド構築物の第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、

第1および第2の核酸配列が、配列内リボソーム進入部位 (IRES) によって、または自己切断ペプチドもしくはリボソームスキッピングを引き起こすペプチドをコードする核酸によって、分離されている、ポリヌクレオチド。

【請求項 25】

請求項23または24記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 26】

請求項23もしくは24記載の1種もしくは複数種のポリヌクレオチドまたは請求項25記載の1種もしくは複数種のベクターを含む、細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

請求項23もしくは24記載の1種もしくは複数種のポリヌクレオチドまたは請求項25記載の1種もしくは複数種のベクターを、細胞に導入する工程、および

多重特異性ポリペプチド構築物が産生される条件の下で、該細胞を培養する工程を含む、または

細胞によって多重特異性ポリペプチドが産生される条件の下で、請求項26記載の細胞を培養する工程を含む、

多重特異性ポリペプチド構築物を作製する方法。

【請求項 28】

請求項1～22のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

10

【請求項 29】

請求項1～22のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物または請求項28記載の薬学的組成物を含む、疾患または状態を有する対象における免疫応答の刺激または誘導に使用するための組成物。

【請求項 30】

請求項1～22のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物または請求項28記載の薬学的組成物を含む、対象における疾患または状態の処置に使用するための組成物。

【請求項 31】

対象における疾患または状態の処置において使用するための医薬の製造のための、請求項1～22のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物または請求項28記載の薬学的組成物の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、「制約CD3結合ドメインおよび共刺激受容体結合領域を含有する多重特異性ポリペプチド構築物ならびにそれを使用する方法 (MULTISPECIFIC POLYPEPTIDE CONSTRUCTS CONTAINING A CONSTRAINED CD3 BINDING DOMAIN AND A CO-STIMULATORY RECEPTOR BINDING REGION AND METHODS OF USING THE SAME)」という名称の2018年7月24日に出願された米国仮出願第62/702,888号；「制約CD3結合ドメインおよび共刺激受容体結合領域を含有する多重特異性ポリペプチド構築物ならびにそれを使用する方法」という名称の2018年10月11日に提出された米国仮出願第62/744,641号；「制約CD3結合ドメインおよび受容体結合領域を含有する多重特異性ポリペプチド構築物ならびにそれを使用する方法 (MULTISPECIFIC POLYPEPTIDE CONSTRUCTS CONTAINING A CONSTRAINED CD3 BINDING DOMAIN AND A RECEPTOR BINDING REGION AND METHODS OF USING THE SAME)」という名称の2019年4月10日に提出された米国仮出願第62/832,268号に基づく優先権を主張するものであり、それらの各々の内容は、参照によって事実上その全体が組み入れられる。

30

【0002】

配列表の参照による組み入れ

本願は、電子フォーマットで配列表と共に提出されている。配列表は、311キロバイトのサイズの2019年7月23日に作成された744952000840SeqList.TXTという名称のファイルとして提供される。配列表の電子フォーマットでの情報は、参照によってその全体が組み入れられる。

40

【0003】

分野

本発明は概して、CD3、第2の抗原、および共刺激受容体または抑制性受容体のようなT細胞の受容体に少なくとも結合する多重特異性ポリペプチドに関し、多重特異性ポリペプチドは、CD3に係合することができるものである。いくつかの態様において、多重特異性

50

ポリペプチド構築物は、共刺激受容体に結合し、共刺激結合活性を提供する。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、抑制性受容体に結合し、抑制活性を阻止する。いくつかの局面において、多重特異性ポリペプチドは、制約されたCD3結合を有し、腫瘍関連抗原のような第2の抗原に結合した時にのみ、CD3に結合するかまたは係合する。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、切断された時に二重エフェクター機能をもたらす切断可能リンカーを含有している。これらの多重特異性ポリペプチドを作製し、多様な治療的適用、診断的適用、および予防的適用において使用する方法も、提供される。

【背景技術】

【0004】

10

背景

標的細胞枯渇を引き起こす治療用抗体は、一般に、Fcγ受容体（FcγR）および補体タンパク質との相互作用を介して媒介されるエフェクター機能に頼っている。FcγRを発現しているエフェクター細胞は、主に、自然免疫系のものである。T細胞は、抗体によって媒介される標的細胞枯渇に関与する直接エフェクター細胞ではない。

【0005】

CD3（表面抗原分類3）T細胞共受容体は、ε鎖、γ鎖、δ鎖、およびζ鎖と呼ばれる4種の異なるポリペプチド鎖から構成される多量体タンパク質である。CD3複合体は、T細胞受容体（TCR）の抗原結合α/β鎖と非共有結合的に会合する、T細胞受容体のシグナリングモジュールとして役立つ。

20

【0006】

CD3の直接係合はT細胞活性化をもたらすため、多様な治療的適用および/または診断的適用のための望ましい標的である。従って、CD3/TCR経路を標的とする抗体および治療薬が必要とされている。

【発明の概要】

【0007】

概要

免疫グロブリンFc領域を含む第1の成分およびCD3結合領域を含む第2の成分を含有している多重特異性ポリペプチド構築物であって、第1および第2の成分がリンカーによってカップリングされており、Fc領域がCD3結合領域に対してN末端側に位置付けられており；第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含有しており；第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、多重特異性ポリペプチド構築物が、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、CD3結合領域は、CD3（CD3ε）に結合する。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、TAAに結合する少なくともまたは約または2つの抗原結合ドメインおよびCRBRを含有している。例示的な構築物が本明細書中に記載される。

30

【0008】

免疫グロブリンFc領域を含む第1の成分およびCD3結合領域を含む第2の成分を含有している多重特異性ポリペプチド構築物であって、第1および第2の成分がリンカーによってカップリングされており、Fc領域がCD3結合領域に対してN末端側に位置付けられており；第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含有しており；第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、多重特異性ポリペプチド構築物も、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、CD3結合領域は、CD3（CD3ε）に結合する。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、TAAに結合する少なくともまたは約または2つの抗原結合ドメインおよびIRBRを含有している。例示的な構築物が本明細書中に記載される。

40

【0009】

免疫グロブリンFc領域を含む第1の成分およびCD3結合領域を含む第2の成分を含有して

50

いる多重特異性ポリペプチド構築物であって、第1および第2の成分がリンカーによってカップリングされており、Fc領域がCD3結合領域に対してN末端側に位置付けられており；第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含有しており；第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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）を含み；第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、多重特異性ポリペプチド構築物も、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、CD3結合領域は、CD3（CD3 ϵ ）に結合する。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、TAAに結合する少なくともまたは約または2つの抗原結合ドメイン、CRBR、およびIRBRを含有している。例示的な構築物が本明細書中に記載される。

10

【0010】

いくつかの態様において、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。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、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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。

【0011】

いくつかの態様において、第1の成分は、第1の抗原結合ドメインを含み、第2の成分は、第2の抗原結合ドメインを含み、抗原結合ドメインの各々が腫瘍関連抗原（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は、多重特異性構築物のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、第2の抗原結合ドメインは、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側に位置付けられている。いくつかの態様において、第1または第2の成分は、共刺激受容体結合領域（CRBR）をさらに含有している。

20

【0012】

N末端からC末端へ順に、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/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3 ϵ ）に結合するCD3結合領域；ならびに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/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインを含有している多重特異性ポリペプチド構築物であって、少なくとも1つのCRBRおよび少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む多重特異性ポリペプチド構築物が、本明細書中に提供される。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、1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）のみを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含有している。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、同一の腫瘍関連抗原（TAA）に結合する。いくつかの態様において、1つの抗原結合ドメインは、Fc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、1つの抗原結合ドメインは、CD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。

30

【0013】

N末端からC末端へ順に、免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3 ϵ ）に結合するCD3結合領域；ならびに腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン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）を含有している多重特異性ポリペプチド構築物が、本明細書中に提供される。N末端からC末端へ順に、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン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）；免疫グロブリンFc領域；リンカー；ならびにCD3（CD3 ϵ ）に結合するCD3結合領域を含む多重特異性ポリペプチド構築物が、本明細書中に提供される。

40

【0014】

そのような態様のうちのいくつかにおいて、Fc領域は、ホモ二量体Fc領域である。いくつかの例において、Fc領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、もしくはヒトIgG4のF

50

c領域であるか、またはそれらの免疫活性断片である。いくつかのケースにおいて、Fc領域は、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:1との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列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、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:2との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチドを含むか；Fc領域は、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:4との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチドを含むか；またはFc領域は、SEQ ID NO:5に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:5との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチドを含む。

10

【0015】

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、ヘテロ二量体Fc領域の一方または両方のFcポリペプチドは、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:1に示されるFcポリペプチドまたはその免疫活性断片と比較して、ヘテロ二量体化を誘導するための少なくとも1つの修飾を含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体FcのFcポリペプチドの各々は独立に、少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体FcのFcポリペプチドの各々は、ノブイントゥホール (knob-into-hole) 修飾を含むか、またはポリペプチドの静電的相補性を増加させるための電荷変異を含む。いくつかのケースにおいて、アミノ酸修飾は、ノブイントゥホール修飾である。

20

【0016】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fc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より選択される修飾を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のFcポリペプチドは、修飾Thr366Trpを含む。いくつかの態様において、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修飾をさらに含み、第1のポリペプチドの修飾は、位置Ser354およびTyr349のうちの一方にあり、第2のFcポリペプチドの修飾は、位置Ser354およびTyr349のうちの他方にある。いくつかの態様において、アミノ酸修飾は、ポリペプチドの静電的相補性を増加させるための電荷変異である。

30

【0017】

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、相補的な位置に修飾を含み、修飾は、他方のポリペプチドの相補的なアミノ酸と反対の電荷を有するアミノ酸への置換である。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの第1または第2のFcポリペプチドのうちの一方は、残基Ile253における修飾をさらに含む。いくつかのケースにおいて、修飾はIle253Argである。いくつかの事例において、ヘテロ二量体Fcの第1または第2のFcポリペプチドのうちの一方は、残基His435における修飾をさらに含む。いくつかの例において、修飾はHis435Argである。いくつかの態様において、Fc領域は、Lys447を欠くポリペプチドを含む。

40

【0018】

いくつかの態様において、Fc領域は、FcRn結合を増強するための少なくとも1つの修飾を含有しているポリペプチドを含む。いくつかの例において、修飾は、Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される位置にある。いくつかの態様において、修飾は、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位置にある。いくつかの態様において、修飾は、位置Met252および位置Met428にある。いくつかの態様において、修飾は、Met252YおよびMet428Lである。いくつかの態様において、修飾は、Met252YおよびMet428Vである。

【0019】

50

いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの第1のポリペプチドは、SEQ ID NO:82、86、94、または96のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のポリペプチドは、SEQ ID NO:83、87、90、92、98、または100のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様において、Fc領域は、エフェクター機能を低下させ、かつ/またはFcγ受容体もしくはC1qより選択されるエフェクター分子との結合を低下させる少なくとも1つのアミノ酸修飾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修飾は、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、ヘテロ二量体Fcの第1のポリペプチドは、SEQ ID NO:84、88、95、または97のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のポリペプチドは、SEQ ID NO:85、89、91、93、99、または101のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様において、Fc領域は、FcγR結合を増強するための少なくとも1つの修飾を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様において、修飾は、Ser239またはIle332における修飾である。いくつかの態様において、Fc領域のグリコシル化は、未修飾のFc領域と比較して、FcγR結合を増強するために修飾されている。いくつかの態様において、Fc領域は、フコースを欠くか、または低下したフコース含量を有する。

【0020】

そのような態様のうちのいくつかにおいて、CD3結合領域は、抗CD3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、抗CD3抗体または抗原結合断片は、可変重鎖領域（VH）および可変軽鎖領域（VL）を含む。いくつかの態様において、CD3結合領域は、1価である。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）を含む可変断片（Fv）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、単鎖抗体ではなく、任意で、単鎖可変断片（scFv）ではない。いくつかの態様において、Fcは、ヘテロ二量体Fcであり、抗CD3抗体または抗原結合断片を構成するVHおよびVLは、ヘテロ二量体Fcの対向するポリペプチドに連結されている。

【0021】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つがそのTAAに結合しない限り、CD3結合領域は、CD3に結合もしくは係合することができないかまたは実質的にできない。いくつかの態様において、抗原結合ドメインのうちの少なくとも2つがそのTAAに結合しない限り、CD3結合領域は、CD3に結合もしくは係合することができないかまたは実質的にできない。

【0022】

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。いくつかの例において、リンカーは、25アミノ酸長までのポリペプチドである。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アミノ酸のポリペプチドである。いくつかの態様において、リンカーは、3ア

10

20

30

40

50

ミノ酸長、4アミノ酸長、5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長、10アミノ酸長、11アミノ酸長、12アミノ酸長、13アミノ酸長、14アミノ酸長、15アミノ酸長、16アミノ酸長、17アミノ酸長、18アミノ酸長、19アミノ酸長、または20アミノ酸長であるポリペプチドである。いくつかの事例において、リンカーは、3～18アミノ酸長であるポリペプチドである。いくつかの態様において、リンカーは、12～18アミノ酸長であるポリペプチドである。いくつかの態様において、リンカーは、15～18アミノ酸長であるポリペプチドである。

【0023】

いくつかの態様において、リンカーは、非切断可能リンカーである。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、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有していない。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、GS、GGG、GGGG (SEQ ID NO:149)、GGGGG (SEQ ID NO:135)、およびそれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、(GGG)_n (nは1～10である)を含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、(GGGG)_n (SEQ ID NO:173) (nは1～10である)を含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、(GGGGG)_n (SEQ ID NO:172) (nは1～4である)を含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、GGGを含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、GGGG (SEQ ID NO:149)を含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、GGGGG (SEQ ID NO:135)を含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、(GGG)₂ (SEQ ID NO:10)を含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、GGSGGGSGGS (SEQ ID NO:11)を含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、GGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO:12)を含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、GGSGGGSGGGSGGS (SEQ ID NO:13)

を含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、GGGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:119)

を含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、GGSGGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:147)

を含む。いくつかの態様において、非切断可能リンカーは、GGGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:170)

を含む。

【0024】

いくつかの態様において、リンカーは、切断可能リンカーである。

【0025】

ヘテロ二量体Fc領域を含む第1の成分ならびに可変重鎖領域 (VH) および可変軽鎖領域 (VL) を含む抗CD3抗体または抗原結合断片を含む第2の成分を含有している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の対向するポリペプチドに連結されており；第1および第2の成分が切断可能リンカーによってカップリングされており、ヘテロ二量体Fc領域が抗CD3抗体に対してN末端側に位置付けられており；第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原 (TAA) に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み；第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、多重特異性ポリペプチド構築物が、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、CD3結合領域のCD3との結合は、多重特異性ポリペプチド構築物が未切断状態にある時、切断状態と比較して実質的に低下する。いくつかの態様において、切断状態において、第1および第2の成分は連結されていない。

【0026】

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

【0027】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、一般式P4 P3 P2 P1↓P1'（SEQ ID NO:150）（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；P1'はアミノ酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G、またはAである）を含む。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、一般式P4 P3 P2 P1↓P1'（SEQ ID NO:151）（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；P1'はアミノ酸I、V、T、S、またはGである）を含む。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、アミノ酸配列IEPDI（SEQ ID NO:136）、LEPDG（SEQ ID NO:152）、LEADT（SEQ ID NO:137）、IEPDG（SEQ ID NO:138）、IEPDV（SEQ ID NO:139）、IEPDS（SEQ ID NO:140）、IEPDT（SEQ ID NO:141）、またはLEADG（SEQ ID NO:153）を含む。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、SEQ ID NO:22、105～112、136～141、148、150～153からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの例において、切断可能リンカーは、SEQ ID NO:105に示されるアミノ酸配列を含む。

【0028】

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である。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、配列P1QAR↓(A/V)（SEQ ID NO:154）（P1は任意のアミノ酸である）を含むか；または切断可能リンカーは、配列RQAR(A/V)（SEQ ID NO:155）を含む。いくつかの例において、切断可能リンカーは、配列RQARV（SEQ ID NO:156）を含む。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、SEQ ID NO:23、154～156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、プロテアーゼはMMPである。いくつかの態様において、MMPはMMP-2である。いくつかの例において、切断可能リンカーは、一般式P3 P2 P1↓P1'（SEQ ID NO:157）（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；P1'はL、I、またはMである）を含有している。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、一般式P3 P2 P1↓P1'（SEQ ID NO:158）（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；P1'はLまたはIである）を含有している。いくつかの事例において、切断可能リンカーは、配列PAGL（SEQ ID NO:24）を含む。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、SEQ ID NO:22～31、104～114、117～118、136～144、148、150～158からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0029】

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、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHドメインまたは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ドメインまたはVLドメインのうちの他方を含む第2のポリペプチドを少なくとも含み、第1および第2の成分のうち的一方または両方は、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み、第1および第2の成分のうち的一方または両方は、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）を含み、多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも1つのCRBRおよ

10

20

30

40

50

び少なくとも1つの抗原結合ドメインを含有している。

【0030】

いくつかの態様において、第1または第2のポリペプチドのうち的一方のみが、TAAに結合する少なくとも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、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、多重特異性ポリペプチド構築物の第1または第2のポリペプチドのうち一方のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、かつ/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、多重特異性構築物のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、第2の抗原結合ドメインは、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側に位置付けられている。いくつかの態様において、第1または第2のポリペプチドのうち一方のみが、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。いくつかの態様において、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第1または第2のポリペプチドのうち一方のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられているか、またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。

10

【0031】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、N末端からC末端へ順に、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第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のVLまたはVH、および腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第2の抗原結合ドメインを含有しており；第2のポリペプチドは、N末端からC末端へ順に、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のうちの他方、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）を含有している。

20

【0032】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、または抗原結合ドメインの各々は独立に、TAAのネイティブ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TAAとの結合活性を示すそれらのバリエーションを含有している。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、または抗原結合ドメインの各々は独立に、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。

30

【0033】

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、共刺激受容体のネイティブ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、もしくは共刺激受容体との結合活性を示すそれらのバリエーションであるか、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（sdAb）、VNAR、またはVHHである。いくつかの例において、抗体またはその抗原結合断片は、sdAbである。いくつかの態様において、sdAbは、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである。いくつかの態様において、sdAbは、VHH、VNAR、改変型VHドメイン、または改変型VKドメインである。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、scFv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、Fabである。

40

【0034】

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、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHドメインを含む第1のポリペプチド；ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVLドメインを含む第2のポリペプチド、腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1（Fd）またはVL-CLを含有している第3のポリペプチド

50

、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を含有している第4のポリペプチドを含有しており、第1および/または第2のポリペプチドは、(1) 腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方、および(2) 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のうちの他方をさらに含有している。

【0035】

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、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHドメインを含有している第1のポリペプチド；ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVLドメインを含む第2のポリペプチド；ならびに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を含有している第3のポリペプチドを含有しており、第1および/または第2のポリペプチドは、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のうちの他方をさらに含有しており、第1および/または第2のポリペプチドは、腫瘍関連抗原 (TAA) に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインをさらに含有している。

【0036】

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、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHドメインを含有している第1のポリペプチド；ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVLドメインを含有している第2のポリペプチド、腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLを含有している第3のポリペプチドを含有しており、第1および/または第2のポリペプチドは、腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方をさらに含有しており、第1および/または第2のポリペプチドは、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) をさらに含有している。

【0037】

いくつかの態様において、第1または第2のポリペプチドのうちの一方のみが、Fab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方を含有している。いくつかの態様において、第1または第2のポリペプチドの両方が、Fab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方を含有している。いくつかの態様において、Fab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方は、多重特異性ポリペプチド構築物の第1または第2のポリペプチドのうちの一方のFc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、Fab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方は、第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのFc領域に対してアミノ末端側および第1または第2のポリペプチドのうちの他方のCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。

【0038】

そのような態様のうちのいくつかにおいて、抗原結合ドメインは、または抗原結合ドメインの各々は独立に、1-92-LFA-3、5T4、 $\alpha 4$ インテグリン、 αV インテグリン、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン、AGR2、抗ルイスY、アペリンJ受容体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5補体、C-242、CA9、CA19-9 (ルイスa)、炭酸脱水酵素9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132 (IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5 (CEA)、CEACAM6 (NCA-90)、クロードイン3、クロードイン4、cMet、コラーゲン、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、エンドセリンB受容体 (ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSVのFタンパク質、FAP、FG

10

20

30

40

50

F-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、葉酸受容体 α (FR α)、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-CSF、GM-CSFR、GP IIb/IIIa受容体、Gp130、GPIIB/IIIA、GPNMB、GRP78、HER2/neu、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、ヒアルロニダーゼ、ICOS、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IgE、IgE受容体 (Fc ϵ RI)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12R β 1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27/IL27R (wsx1)、IL29、IL-31R、IL31/IL31R、IL2R、IL4、IL4R、IL6、IL6R、インスリン受容体、Jaggedリガンド、Jagged1、Jagged2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、ルイスX、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、メソテリン、MRP4、MUC1、ムチン16 (MUC16、CA-125)、Na/K ATPアーゼ、NGF、ニカストリン (Nicastrin)、ノッチ受容体、ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFR α 、PDGFR β 、PD-1、PD-L1、PD-L2、ホスファチジルセリン、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、スフィンゴシン1リン酸、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGF β 、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNF α 、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、トランスフェリン、トランスフェリン受容体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2、およびWISP-3より選択される腫瘍抗原に結合する。

【0039】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、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を少なくとも含有しており、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、同一の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、同一のTAA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、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、同一のTAAの同一のエピトープに結合する。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、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を少なくとも含有しており、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。

【0040】

いくつかの態様において、共刺激受容体結合領域 (CRBR) は、第1のCRBRおよび第2のCRBRを少なくとも含有しており、第1のCRBRおよび第2のCRBRは、同一の共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、第1の共刺激受容体結合領域 (CRBR) および第2のCRBRは、同一の共刺激受容体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、第1の共刺激受容体結合領域 (CRBR) および第2のCRBRは、同一の共刺激受容体の同一のエピトープに結合する。いくつかの態様において、共刺激受容体結合領域 (CRBR) は、第1のCRBRおよび第2のCRBRを少なくとも含有している。いくつかの態様において、第1のCRBRおよび第2のCRBRは、異なる共刺激受容体に結合する。

【0041】

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)、CD27、グルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質 (GITR)、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体 (BAFF-R)、B細胞成熟抗原 (BCMA)、膜貫通型活性化因子およびCAML相互作用因子 (Transmembrane activator and CAML interactor) (TACI)、ならびにNKG2Dより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) より選択される共刺激受容体に結合する。

【0042】

提供された態様のうちのいずれかにおいて、少なくとも1つの抑制性受容体結合領域 (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

10

20

30

40

50

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 (sdAb)、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、sdAbである。いくつかの態様において、sdAbは、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである。いくつかの態様において、sdAbは、VHH、VNAR、改変型VHドメイン、または改変型VKドメインである。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、scFv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、Fabである。少なくとも1つの抑制性受容体結合ドメインを含有している構築物を含む本明細書中に提供された態様のうちのいずれかにおいて、抑制性受容体は、T細胞、例えば、ヒトT細胞において発現されるようなPD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、またはTIM3より選択される。いくつかの態様において、T細胞は活性化T細胞である。提供された態様のうちのいずれかにおいて、少なくとも1つの抑制性受容体結合領域 (IRBR) は、PD-1に結合する。

10

【0043】

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の抗原結合ドメインとFc領域との間の第1の連結ペプチド (LP1) を含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3結合領域と第2の抗原結合ドメインとの間の第2の連結ペプチド (LP2) を含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、第1の共刺激受容体結合領域 (CRBR) とFc領域との間の第1の連結ペプチド (LP1) を含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3結合領域と第2の共刺激受容体結合領域 (CRBR) との間の第2の連結ペプチド (LP2) を含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、抗原結合ドメインまたは共刺激受容体結合領域とFc領域との間の第1の連結ペプチド (LP1) およびCD3結合領域と抗原結合ドメインまたはCRBRとの間の第2の連結ペプチド (LP2) を含み、N末端からC末端へ、第1の抗原結合ドメインまたはCRBR - LP1 - Fc領域 - リンカー - CD3結合領域 - LP2 - 第2の抗原結合ドメインまたはCRBRという構造的配置を有する。

20

【0044】

いくつかの態様において、リンカーは切断可能リンカーである。いくつかの態様において、2つの連結ペプチドは、相互に同一ではない。いくつかの態様において、LP1またはLP2は、独立に、約1~20アミノ酸長のペプチドである。いくつかの態様において、LP1またはLP2は、独立に、SEQ ID NO:10~13、119、135、147、149に示されるGly-SerリンカーもしくはGGGであるか、またはそれを含むペプチドを含有している。

30

【0045】

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 (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、アミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO:16) を含むVH CDR1；

RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 17)

を含むVH CDR2；アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18) を含むVH CDR3、アミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:19) を含むVL CDR1；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:20) を含むVL CDR2；およびアミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO:21) を含むVL CDR3を含む。

40

【0046】

いくつかの例において、抗CD3 Fvは、SEQ ID NO:14および32~62のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:14および32~62のうちのいずれかとの少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有するVH；ならびにSEQ ID NO:15および63~81のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:15および63~81のうちのいずれかとの少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一

50

性を示す配列を有するVLを含む。

【0047】

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である。いくつかの態様において、抗CD3 Fvは、SEQ ID NO:14、32～43、45～47、48、および287のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:14、32～43、45～47、48、および287のうちのいずれかとの少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有するVH；ならびにSEQ ID NO:15、63、65～71、73、75、77、および288のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:15、63、65～71、73、75、77、および288のうちのいずれかとの少なくとも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 Fvは、SEQ ID NO:14のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含む。他の場合において、抗CD3 Fvは、SEQ ID NO:287のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:288のアミノ酸配列を含む。

10

【0048】

いくつかの態様において、CD3結合ドメインのVH鎖領域およびVL鎖領域は、各々独立に、少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。いくつかの態様において、CD3結合ドメインのVH鎖領域およびVL鎖領域の少なくとも1つのアミノ酸修飾は、CD3結合ドメインの安定性を増加させる。いくつかの態様において、CD3結合ドメインのVH鎖領域およびVL鎖領域の少なくとも1つのアミノ酸修飾は、CD3結合ドメインのCD3に結合する能力を増加させる。いくつかの態様において、CD3結合ドメインのVH鎖領域およびVL鎖領域の少なくとも1つのアミノ酸修飾は、VH鎖領域とVL鎖領域との間にジスルフィド連結を作出することによって、CD3結合ドメインの安定性を増加させる。

20

【0049】

いくつかの態様において、CD3結合領域は、VH領域とVL領域との間にジスルフィドによって安定化された結合を有する。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、ジスルフィド安定化Fv (dsFv) である。いくつかの態様において、ジスルフィド安定化抗CD3 Fvは、カバットナンバリングによって、44位におけるCysへの変異を含む抗CD3 VHおよび100位におけるCysへの変異を含む抗CD3 VLを含む。いくつかの態様において、ジスルフィド安定化抗CD3 Fvは、カバットナンバリングによって、変異G44Cを含む抗CD3 VHおよび変異G100Cを含む抗CD3 VLを含む。いくつかの態様において、ジスルフィド安定化抗CD3 Fvは、カバットナンバリングによって、105位におけるCysへの変異を含む抗CD3 VHおよび43位におけるCysへの変異を含む抗CD3 VLを含む。いくつかの態様において、抗CD3 dsFvは、SEQ ID NO:44、49～62、290、および311のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:44、49～62、290、および311のうちのいずれかとの少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有するVH；ならびにSEQ ID NO:64、72、74、76、78～81、241、および289のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:64、72、74、76、78～81、241、および289のうちのいずれかとの少なくとも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 dsFvは、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:72のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗CD3 dsFvは、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:241のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、その抗CD3 ε 結合ドメインは、SEQ ID NO:290のアミノ酸配列を含む可変重鎖 (VH) およびSEQ ID NO:289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 ε 結合ドメインは、SEQ ID NO:311のアミノ酸配列を含む可変重鎖 (VH) およびSEQ ID NO:289のアミノ酸配列を含む可変軽鎖 (VL) を含む。

30

40

【0050】

そのような態様のうちのいくつかにおいて、多重特異性ポリペプチド構築物は、作用物

50

質にコンジュゲートされている。いくつかの態様において、作用物質は、治療剤、抗腫瘍剤、毒素もしくはその断片、検出可能部分、または診断剤である。いくつかの態様において、作用物質は、リンカーを介して多重特異性ポリペプチド構築物にコンジュゲートされている。

【0051】

提供された多重特異性ポリペプチド構築物のうちのいずれかをコードするポリヌクレオチドが、本明細書中に提供される。提供された多重特異性ポリペプチド構築物のうちのいずれかの提供されたポリペプチド鎖のうちのいずれかをコードするポリヌクレオチドが、本明細書中に提供される。提供された多重特異性構築物のうちのいずれかの第1のポリペプチドをコードする第1の核酸配列および多重特異性構築物の提供された第2のポリペプチドのうちのいずれかをコードする第2の核酸配列を含有しているポリヌクレオチドであって、第1および第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分離されている、ポリヌクレオチドが、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、第1の核酸配列および第2の核酸配列は、同一のプロモーターに機能的に連結されている。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、第3のポリペプチド鎖を含有しており、ポリヌクレオチドは、多重特異性構築物の第3のポリペプチドをコードする第3の核酸をさらに含有している。いくつかの態様において、第3の核酸は、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、第1および/または第2のポリペプチドから分離されており、かつ/または第3の核酸配列は、第1および/または第2の核酸配列と同一のプロモーターに機能的に連結されている。いくつかの態様において、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核酸は、T2A、P2A、E2A、またはF2Aより選択される。

【0052】

提供されたポリヌクレオチドのうちのいずれかを含有しているベクターが、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、ベクターは発現ベクターである。いくつかの態様において、ベクターは、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、真核生物ベクターは哺乳動物ベクターである。

【0053】

ポリヌクレオチドまたは提供されたポリヌクレオチドのうちのいずれか、ベクターまたは提供されたベクターのうちのいずれかを含有している細胞が、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、細胞は、組換えであるかまたは単離されている。いくつかの態様において、細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの態様において、細胞は、HEK293細胞またはCHO細胞である。

【0054】

ポリヌクレオチドもしくは提供されたポリヌクレオチドのうちのいずれか、またはベクターもしくは提供されたベクターのうちのいずれかを細胞に導入する工程、および多重特異性ポリペプチド構築物が産生される条件の下で細胞を培養する工程を含む、多重特異性ポリペプチド構築物を作製する方法が、本明細書中に提供される。

【0055】

細胞によって多重特異性ポリペプチドが産生される条件の下で、提供された細胞のうちのいずれかを培養する工程を含む、多重特異性ポリペプチド構築物を作製する方法が、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの態様において、細胞は、HEK293細胞またはCHO細胞である。いくつかの態様において、方法は、多重特異性ポリペプチド構築物を細胞から単離するかまたは精製する工程をさらに含む。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ヘテロ二量体である。

【0056】

提供された方法のうちのいずれかによって作製された多重特異性ポリペプチド構築物が

、本明細書中に提供される。

【0057】

提供された多重特異性ポリペプチド構築物のうちのいずれかと薬学的に許容される担体とを含有している薬学的組成物が、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、薬学的組成物は無菌である。

【0058】

標的細胞およびT細胞を、提供された多重特異性ポリペプチド構築物または薬学的組成物のうちのいずれかと接触させる工程を含む、免疫応答を刺激するかまたは誘導する方法であって、標的細胞が、多重特異性ポリペプチド構築物によって認識される腫瘍関連抗原を発現している、方法が、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、標的細胞は、腫瘍関連抗原（TAA）を発現している腫瘍細胞である。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、プロテアーゼの基質として機能する切断可能リンカーを含み、免疫応答の誘導または刺激は、プロテアーゼの存在下で増加する。いくつかの態様において、プロテアーゼは、免疫エフェクター細胞によって、腫瘍によって、または腫瘍微小環境に存在する細胞によって産生される。いくつかの態様において、プロテアーゼは、免疫エフェクター細胞によって産生され、免疫エフェクター細胞は、活性化T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、またはNK T細胞である。いくつかの態様において、免疫エフェクター細胞は、抗原を発現する細胞の近傍にある。いくつかの態様において、プロテアーゼは、組織内のTAAを発現している細胞の近傍にある腫瘍によって産生され、かつ/または組織内のTAAと共局在している腫瘍によって産生され、多重特異性ポリペプチド構築物がプロテアーゼに曝された時に、プロテアーゼは、多重特異性ポリペプチド構築物内の切断可能リンカーを切断する。

【0059】

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、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、プロテアーゼはグランザイムBである。いくつかの態様において、接触は、エキスピボまたはインビトロで実施される。いくつかの態様において、接触は、対象においてインビボで実施される。

【0060】

提供された多重特異性コンジュゲートまたは薬学的組成物のうちのいずれかを、治療的に有効な量、それを必要とする対象へ投与する工程を含む、対象における免疫応答を刺激するかまたは誘導する方法が、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、方法は、細胞性免疫を増加させる。いくつかの態様において、方法は、T細胞活性を増加させる。いくつかの態様において、方法は、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、腫瘍または癌に対する免疫応答が増加する。いくつかの態様において、方法は、対象における疾患または状態を処置する。

【0061】

提供された多重特異性コンジュゲートのうちのいずれかまたは提供された薬学的組成物のうちのいずれかを、治療的に有効な量、それを必要とする対象へ投与する工程を含む、対象における疾患または状態を処置する方法が、本明細書中に提供される。いくつかの態様において、疾患または状態は、腫瘍または癌である。いくつかの態様において、対象はヒトである。

【0062】

当業者は、本開示の抗体が多様な用途を有することを認識するであろう。例えば、本開示のタンパク質は、多様な障害のための治療剤として使用される。本開示の抗体は、診断キット中の試薬として、もしくは診断ツールとしても使用され、またはこれらの抗体は、治療用試薬を生成するため、競合アッセイにおいて使用されてもよい。

[本発明1001]

免疫グロブリンFc領域を含む第1の成分およびCD3結合領域を含む第2の成分を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

10

20

30

40

50

第1および第2の成分がリンカーによってカップリングされており、Fc領域がCD3結合領域に対してN末端側に位置付けられており；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、
多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1002]

免疫グロブリンFc領域を含む第1の成分およびCD3結合領域を含む第2の成分を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

第1および第2の成分がリンカーによってカップリングされており、Fc領域がCD3結合領域に対してN末端側に位置付けられており；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、
多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1003]

免疫グロブリンFc領域を含む第1の成分およびCD3結合領域を含む第2の成分を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

第1および第2の成分がリンカーによってカップリングされており、Fc領域がCD3結合領域に対してN末端側に位置付けられており；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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）を含み；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、
多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1004]

CD3結合領域がCD3（CD3ε）に結合する、本発明1001～1003のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1005]

少なくとも1つの抗原結合ドメインが、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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、本発明1001～1004のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1006]

第1の成分が第1の抗原結合ドメインを含み、第2の成分が第2の抗原結合ドメインを含み、抗原結合ドメインの各々が腫瘍関連抗原（TAA）に結合する、本発明1001～1005のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1007]

第1の抗原結合ドメインが、多重特異性構築物のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、第2の抗原結合ドメインが、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側に位置付けられている、本発明1006の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1008]

少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）が、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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、本発明1001および1003～1007のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1009]

少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）が、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側に位置付けられている、本発明1001および1003～1008のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1010]

少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）が、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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、本発明1002～1007のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1011]

少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）が、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側に位置付けられている、本発明1002～1007および1010のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

[本発明1012]

第1の成分が第1の抗原結合ドメインを含み、第2の成分が第2の抗原結合ドメインを含み、抗原結合ドメインの各々が腫瘍関連抗原（TAA）に結合する、本発明1001～1011のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1013]

第1の抗原結合ドメインが、多重特異性構築物のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、第2の抗原結合ドメインが、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側に位置付けられている、本発明1012の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1014]

第1または第2の成分が共刺激受容体結合領域（CRBR）をさらに含む、本発明1012または本発明1013の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

[本発明1015]

第1または第2の成分が抑制性受容体結合領域（IRBR）をさらに含む、本発明1012または本発明1013の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1016]

N末端からC末端へ順に、
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/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン；

免疫グロブリンFc領域；

30

リンカー；

CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；ならびに

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/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン

を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

少なくとも1つのCRBRおよび少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1017]

1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）のみを含む、本発明1016の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

[本発明1018]

N末端からC末端へ順に、
抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）および/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン；

免疫グロブリンFc領域；

リンカー；

CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；ならびに

抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）および/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン

を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

50

少なくとも1つのIRBRおよび少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1019]

1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）のみを含む、本発明1018の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1020]

N末端からC末端へ順に、
抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）もしくは共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）のうちの一方、および/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン；
免疫グロブリンFc領域；
リンカー；
CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；ならびに
IRBRもしくはCRBRのうちの他方、および/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン

を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

少なくとも1つのIRBR、少なくとも1つのCRBR、および少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1021]

TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含む、本発明1016～1020のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1022]

抗原結合ドメインが同一の腫瘍関連抗原（TAA）に結合する、本発明1021の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1023]

1つの抗原結合ドメインがFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、1つの抗原結合ドメインがCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、本発明1021または本発明1022の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1024]

N末端からC末端へ順に、
免疫グロブリンFc領域；
リンカー；
CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；ならびに
腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン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、多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1025]

N末端からC末端へ順に、
腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン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）；
免疫グロブリンFc領域；
リンカー；ならびに
CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域
を含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1026]

N末端からC末端へ順に、
免疫グロブリンFc領域；
リンカー；
CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；ならびに
腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインおよび抑制性受容体に結合する抑制

10

20

30

40

50

性受容体結合領域（IRBR）

を含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1027]

N末端からC末端へ順に、

腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン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）；

免疫グロブリンFc領域；

リンカー；ならびに

CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域

を含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

10

[本発明1028]

Fc領域がホモ二量体Fc領域である、本発明1001～1027のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1029]

Fc領域が、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、もしくはヒトIgG4のFc領域であるか、またはそれらの免疫活性断片である、本発明1001～1028のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1030]

Fc領域が、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:1との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチドを含む、本発明1001～1029のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

[本発明1031]

Fc領域が、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:2との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチドを含むか；

Fc領域が、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:4との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチドを含むか；または

Fc領域が、SEQ ID NO:5に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:5との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチドを含む、本発明1001～1029のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

[本発明1032]

Fc領域がヘテロ二量体Fc領域である、本発明1001～1023、1029～1031のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1033]

ヘテロ二量体Fc領域の一方または両方のFcポリペプチドが、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:1に示されるFcポリペプチドまたはその免疫活性断片と比較して、ヘテロ二量体化を誘導するための少なくとも1つの修飾を含む、本発明1032の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

[本発明1034]

ヘテロ二量体FcのFcポリペプチドの各々が独立に少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む、本発明1033の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1035]

ヘテロ二量体FcのFcポリペプチドの各々が、ノブイントゥホール（knob-into-hole）修飾を含むか、またはポリペプチドの静電的相補性を増加させるための電荷変異を含む、本発明1034の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1036]

アミノ酸修飾がノブイントゥホール修飾である、本発明1035の多重特異性ポリペプチド

50

構築物。

[本発明1037]

CD3結合領域が可変重鎖領域（VH）および可変軽鎖領域（VL）を含み、VLがヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドに対してC末端側にあり、VHがヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチドに対してC末端側にあり、第1のFcポリペプチドがホール変異を含み、第2のFcポリペプチドがノブ変異を含む、本発明1032～1036のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1038]

ヘテロ二量体Fcの第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より選択される修飾を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のFcポリペプチドが修飾Thr366Trpを含む、本発明1032～1037のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

[本発明1039]

第1および第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修飾をさらに含み、第1のポリペプチドの修飾が、位置Ser354およびTyr349のうちの一方にあり、第2のFcポリペプチドの修飾が、位置Ser354およびTyr349のうちの他方にある、本発明1038の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1040]

アミノ酸修飾が、ポリペプチドの静電的相補性を増加させるための電荷変異である、本発明1035の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

[本発明1041]

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が、相補的な位置に修飾を含み、修飾が、他方のポリペプチドの相補的なアミノ酸と反対の電荷を有するアミノ酸への置換である、本発明1032～1035および1040のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1042]

ヘテロ二量体Fcの第1または第2のFcポリペプチドのうちの一方が、残基Ile253における修飾をさらに含む、本発明1033～1041のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1043]

前記修飾がIle253Argである、本発明1042の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

[本発明1044]

ヘテロ二量体Fcの第1または第2のFcポリペプチドのうちの一方が残基His435における修飾をさらに含む、本発明1033～1043のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1045]

前記修飾がHis435Argである、本発明1044の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1046]

Fc領域が、Lys447を欠くポリペプチドを含む、本発明1001～1045のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1047]

Fc領域が、FcRn結合を増強するための少なくとも1つの修飾を含むポリペプチドを含む、本発明1001～1046のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

[本発明1048]

前記修飾が、Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される位置にある、本発明1047の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1049]

前記修飾が、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位置にある、本発明1048の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1050]

50

前記修飾が位置Met252および位置Met428にある、本発明1048の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1051]

前記修飾がMet252YおよびMet428Lである、本発明1050の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1052]

前記修飾がMet252YおよびMet428Vである、本発明1050の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1053]

ヘテロ二量体Fcの第1のポリペプチドが、SEQ ID NO:82、86、94、または96のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のポリペプチドが、SEQ ID NO:83、87、90、92、98、または100のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、本発明1032～1052のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1054]

ヘテロ二量体Fcの第1のポリペプチドが、SEQ ID NO:291、293、297、または298のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のポリペプチドが、SEQ ID NO:292、294、295、296、299、または300のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、本発明1032～1053のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1055]

Fc領域が、
エフェクター機能を低下させ、かつ/またはFcγ受容体もしくはC1qより選択されるエフェクター分子との結合を低下させる、少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むポリペプチドを含む、本発明1001～1054のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1056]

1つまたは複数のアミノ酸修飾が、Glu233、Leu234、またはLeu235のうちの1つまたは複数の欠失である、本発明1055の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1057]

ヘテロ二量体Fcの第1のポリペプチドが、SEQ ID NO:84、88、95、または97のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のポリペプチドが、SEQ ID NO:85、89、91、93、99、または101のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、本発明1032～1056のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1058]

ヘテロ二量体Fcの第1のポリペプチドが、SEQ ID NO:291、293、297、または298のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のポリペプチドが、SEQ ID NO:292、294、295、296、299、または300のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、本発明1032～1056のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1059]

Fc領域が、FcγR結合を増強するための少なくとも1つの修飾を含むポリペプチドを含む、本発明1001～1054のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1060]

前記修飾がSer239またはIle332における修飾である、本発明1059の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1061]

Fc領域のグリコシル化が、未修飾のFc領域と比較して、FcγR結合を増強するために修飾される、本発明1001～1054および1059のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1062]

Fc領域がフコースを欠くかまたは低下したフコース含量を有する、本発明1061の多重特

10

20

30

40

50

異性ポリペプチド構築物。

[本発明1063]

CD3結合領域が抗CD3抗体または抗原結合断片である、本発明1001～1062のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1064]

抗CD3抗体または抗原結合断片が可変重鎖領域（VH）および可変軽鎖領域（VL）を含む、本発明1063の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1065]

抗CD3抗体または抗原結合断片のVLが、Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val、およびそれらの組み合わせより選択される修飾を含むヘテロ二量体Fcの第1のFcポリペプチドに連結されており、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHが、修飾Thr366Trpを含むヘテロ二量体Fcの第2のFcポリペプチドに連結されている、本発明1064の多重特異性構築物。

10

[本発明1066]

CD3結合領域が1価である、本発明1001～1065のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1067]

CD3結合領域が、可変重鎖領域（VH）および可変軽鎖領域（VL）を含む可変断片（Fv）である、本発明1001～1066のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1068]

抗CD3抗体または抗原結合断片が単鎖抗体ではなく、任意で、単鎖可変断片（scFv）ではない、本発明1063～1066のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

[本発明1069]

Fcがヘテロ二量体Fcであり、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の対向するポリペプチドに連結されている、本発明1064～1068のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1070]

抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つがそのTAAに結合しない限り、CD3結合領域がCD3に結合もしくは係合することができないかまたは実質的にできない、本発明1001～1069のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1071]

抗原結合ドメインのうちの少なくとも2つがそのTAAに結合しない限り、CD3結合領域がCD3に結合もしくは係合することができないかまたは実質的にできない、本発明1001～1070のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

[本発明1072]

リンカーがポリペプチドリンカーである、本発明1001～1071のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1073]

リンカーが、最大25アミノ酸長のポリペプチドである、本発明1072の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1074]

リンカーが、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

40

50

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アミノ酸のポリペプチドである、本発明1072または本発明1073の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1075]

リンカーが、3アミノ酸長、4アミノ酸長、5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長、10アミノ酸長、11アミノ酸長、12アミノ酸長、13アミノ酸長、14アミノ酸長、15アミノ酸長、16アミノ酸長、17アミノ酸長、18アミノ酸長、19アミノ酸長、または20アミノ酸長であるポリペプチドである、本発明1072～1074のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

[本発明1076]

リンカーが、3～18アミノ酸長であるポリペプチドである、本発明1072～1075のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1077]

リンカーが、12～18アミノ酸長であるポリペプチドである、本発明1072～1075のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1078]

20

リンカーが、15～18アミノ酸長であるポリペプチドである、本発明1072～1075のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1079]

リンカーが非切断可能リンカーである、本発明1001～1078のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1080]

非切断可能リンカーが、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有していない、本発明1079の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1081]

非切断可能リンカーが、GS、GGG、GGGG (SEQ ID NO:149)、GGGGG (SEQ ID NO:135)、およびそれらの組み合わせを含む、本発明1079または本発明1080の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

[本発明1082]

非切断可能リンカーが、(GGG)_nを含み、nは1～10である、本発明1079～1081のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1083]

非切断可能リンカーが、(GGGG)_n (SEQ ID NO:173)を含み、nは1～10である、本発明1079～1082のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1084]

非切断可能リンカーが、(GGGGG)_n (SEQ ID NO:172)を含み、nは1～4である、本発明1079～1083のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

[本発明1085]

非切断可能リンカーが、GGGを含む、本発明1079～1084のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1086]

非切断可能リンカーが、GGGG (SEQ ID NO:149)を含む、本発明1079～1084のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1087]

非切断可能リンカーが、GGGGG (SEQ ID NO:135)を含む、本発明1079～1084のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

50

[本発明1088]

非切断可能リンカーが、(GGS)₂ (SEQ ID NO:10) を含む、本発明1079～1084のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1089]

非切断可能リンカーが、GGSGGSGGS (SEQ ID NO:11) を含む、本発明1079～1084のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1090]

非切断可能リンカーが、GGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:12) を含む、本発明1079～1084のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1091]

非切断可能リンカーが、
GGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 13)

10

を含む、本発明1079～1084のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1092]

非切断可能リンカーが、
GGGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 119)

を含む、本発明1079～1084のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1093]

非切断可能リンカーが、
GGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 147)

20

を含む、本発明1079～1084のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1094]

非切断可能リンカーが、
GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:170)

を含む、本発明1079～1084のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1095]

リンカーが切断可能リンカーである、本発明1001～1078のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

[本発明1096]

ヘテロ二量体Fc領域を含む第1の成分と、可変重鎖領域 (VH) および可変軽鎖領域 (VL) を含む抗CD3抗体または抗原結合断片を含む第2の成分とを含む、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の対向するポリペプチドに連結されており；

第1および第2の成分が切断可能リンカーによってカップリングされており、ヘテロ二量体Fc領域が抗CD3抗体に対してN末端側に位置付けられており；

40

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原 (TAA) に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、
多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1097]

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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) をさらに含む、本発明1096の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1098]

50

ヘテロ二量体Fc領域を含む第1の成分と、可変重鎖領域（VH）および可変軽鎖領域（VL）を含む抗CD3抗体または抗原結合断片を含む第2の成分とを含む、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の対向するポリペプチドに連結されており；

第1および第2の成分が切断可能リンカーによってカップリングされており、ヘテロ二量体Fc領域が抗CD3抗体に対してN末端側に位置付けられており；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1099]

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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）をさらに含む、本発明1098の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1100]

多重特異性ポリペプチド構築物が未切断状態にある時、切断状態と比較して、CD3結合領域のCD3との結合が実質的に低下する、本発明1096～1099のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1101]

切断状態において、第1および第2の成分が連結されていない、本発明1096～1100のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1102]

切断可能リンカーが、プロテアーゼの基質として機能するポリペプチドである、本発明1096～1101のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1103]

免疫エフェクター細胞によって、腫瘍によって、または腫瘍微小環境に存在する細胞によって、プロテアーゼが産生される、本発明1102の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1104]

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、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、本発明1103の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1105]

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より選択される、本発明1102～1104のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1106]

プロテアーゼがグランザイムBである、本発明1105の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1107]

切断可能リンカーが、一般式P4 P3 P2 P1↓P1'（SEQ ID NO:150）の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；P1'はアミノ酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G、またはAである、本発明1096～1106のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1108]

切断可能リンカーが、一般式P4 P3 P2 P1↓P1'（SEQ ID NO:151）の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；P1'はアミノ酸I、V、T、S、またはGである、本発明1096～1107のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1109]

切断可能リンカーが、アミノ酸配列IEPDI (SEQ ID NO:136)、LEPDG (SEQ ID NO:152)、LEADT (SEQ ID NO:137)、IEPDG (SEQ ID NO:138)、IEPDV (SEQ ID NO:139)、IEPDS (SEQ ID NO:140)、IEPDT (SEQ ID NO:141)、またはLEADG (SEQ ID NO:153)を含む、本発明1096~1108のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1110]

切断可能リンカーが、SEQ ID NO:22、105~112、136~141、148、150~153からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1096~1109のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

[本発明1111]

切断可能リンカーが、SEQ ID NO:105に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1096~1110のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1112]

プロテアーゼがマトリプターゼである、本発明1111の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1113]

切断可能リンカーが、配列P1QAR↓(A/V) (SEQ ID NO:154) (P1は任意のアミノ酸である)を含むか；または

切断可能リンカーが、配列RQAR(A/V) (SEQ ID NO:155)を含む、本発明1096~1112のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

[本発明1114]

切断可能リンカーが、配列RQARV (SEQ ID NO:156)を含む、本発明1096~1113のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1115]

切断可能リンカーが、SEQ ID NO:23、154~156からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1096~1114のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1116]

プロテアーゼがMMPである、本発明1105の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1117]

MMPがMMP-2である、本発明1116の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

[本発明1118]

切断可能リンカーが、一般式P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:157)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；P1'はL、I、またはMである、本発明1096~1117のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1119]

切断可能リンカーが、一般式P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:158)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；P1'はLまたはIである、本発明1096~1118のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1120]

切断可能リンカーが、配列PAGL (SEQ ID NO:24)を含む、本発明1096~1119のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

[本発明1121]

切断可能リンカーが、SEQ ID NO:22~31、104~114、117~118、136~144、148、150~158からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1096~1120のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1122]

多重特異性ポリペプチド構築物が、

(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ドメインまたは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

50

プチドに存在するのと同じのリンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHドメインまたはVLドメインのうちの他方を含む、第2のポリペプチドを少なくとも含む、

第1および第2のポリペプチドのうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み、第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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）を含み、

多重特異性ポリペプチド構築物が、少なくとも1つのCRBRおよび少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、

本発明1069～1121のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1123]

TAAに結合する1つまたは複数の抗原結合ドメインが、TAAとの1価、2価、3価、または4価の結合をもたらす、本発明1001～1122のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1124]

第1または第2のポリペプチドのうち的一方のみが、TAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、本発明1122または本発明1123の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1125]

少なくとも1つの抗原結合ドメインが、多重特異性ポリペプチド構築物の第1または第2のポリペプチドのうちの方のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、かつ/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、本発明1122～1124のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1126]

少なくとも1つの抗原結合ドメインが、多重特異性構築物のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、第2の抗原結合ドメインが、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側に位置付けられている、本発明1122～1124のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1127]

第1または第2のポリペプチドのうちの方のみが、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、本発明1122～1126のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1128]

共刺激受容体結合領域（CRBR）が、多重特異性ポリペプチド構築物の第1または第2のポリペプチドのうちの方のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられているか、またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、本発明1122～1127のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1129]

第1のポリペプチドが、N末端からC末端へ順に、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第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のVLまたはVH、および腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第2の抗原結合ドメインを含み、

第2のポリペプチドが、N末端からC末端へ順に、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のポリペプチドに存在するのと同じのリンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVLまたはVHのうちの他方、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、

本発明1122～1128のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1130]

ヘテロ二量体Fc領域がFcホールポリペプチドおよびFcノブポリペプチドを含み、抗CD3抗体または抗原結合断片のVLがFcホールに対してC末端側に位置付けられており、抗CD3

10

20

30

40

50

抗体または抗原結合断片のVHがFcノブに対してC末端側に位置付けられている、本発明1122～1129のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1131]

抗原結合ドメインが、または抗原結合ドメインの各々が独立に、TAAのネイティブ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TAAとの結合活性を示すそれらのバリエーションを含む、本発明1001～1130のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1132]

抗原結合ドメインが、または抗原結合ドメインの各々が独立に、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、本発明1001～1131のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

[本発明1133]

少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）が、共刺激受容体のネイティブ同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、または共刺激受容体との結合活性を示すそれらのバリエーションであるかまたはそれを含む、本発明1001～1132のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1134]

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、本発明1001～1132のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

[本発明1135]

抗体またはその抗原結合断片が、Fv、scFv、Fab、またはシングルドメイン抗体（sdAb）である、本発明1132または本発明1134の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1136]

抗体または抗原結合断片がsdAbである、本発明1132、本発明1134、または本発明1122の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1137]

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインを含み、抗原結合ドメインが単鎖抗体断片である、本発明1001～1136のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

[本発明1138]

単鎖抗体断片が、シングルドメイン抗体であるかまたは単鎖可変断片（scFv）である、本発明1137の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1139]

sdAbが、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、本発明1136～1138のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1140]

sdAbが、VHH、VNAR、改変型VHドメイン、または改変型VKドメインである、本発明1136～1139のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

[本発明1141]

抗体またはその抗原結合断片がscFvである、本発明1132、本発明1134、または本発明1135の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1142]

抗体またはその抗原結合断片がFabである、本発明1132、本発明1134、または本発明1135の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1143]

多重特異性ポリペプチド構築物が、

(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

50

抗原結合断片のVHドメインを含む、第1のポリペプチド；

(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、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVLドメインを含む、第2のポリペプチド；

(iii) 腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLを含む、第3のポリペプチド、

(iv) 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4のポリペプチド

を含み、

第1および/または第2のポリペプチドが、

(1) 腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方、および

(2) 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のうちの他方をさらに含む、

本発明1001～1132および1134～1142のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1144]

多重特異性ポリペプチド構築物が、

(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ドメインを含む、第1のポリペプチド；

(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、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVLドメインを含む、第2のポリペプチド；ならびに

(iii) 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3のポリペプチド

を含み、

第1および/または第2のポリペプチドが、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のうちの他方をさらに含み、

第1および/または第2のポリペプチドが、腫瘍関連抗原 (TAA) に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインをさらに含む、

本発明1001～1132および1134～1142のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1145]

多重特異性ポリペプチド構築物が、

(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ドメインを含む、第1のポリペプチド；

(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、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVLドメインを含む、第2のポリペプチド；ならびに

(iii) 腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLを含む、第3のポリペプチド

を含み、

第1および/または第2のポリペプチドが、腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方をさらに含み、

第1および/または第2のポリペプチドが、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) をさらに含む、

本発明1001～1132および1134～1142のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1146]

第1または第2のポリペプチドのうちの一方のみが、Fab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方を含む、本発明1144または本発明1145の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1147]

第1または第2のポリペプチドの両方が、Fab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方を含む、本発明1144または本発明1145の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1148]

10

20

30

40

50

Fab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方が、多重特異性ポリペプチド構築物の第1または第2のポリペプチドのうちの一方のFc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、本発明1146または本発明1147の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1149]

Fab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方が、第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのFc領域に対してアミノ末端側および第1または第2のポリペプチドのうちの他方のCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、本発明1146~1148のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1150]

抗原結合ドメインが、または抗原結合ドメインの各々が独立に、1-92-LFA-3、5T4、 α 4インテグリン、 α Vインテグリン、 α 4 β 1インテグリン、 α 4 β 7インテグリン、AGR2、抗ルイスY、アペリンJ受容体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5補体、C-242、CA9、CA19-9 (ルイスa)、炭酸脱水酵素9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132 (IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5 (CEA)、CEACAM6 (NCA-90)、クローディン3、クローディン4、cMet、コラーゲン、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、エンドセリンB受容体 (ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSVのFタンパク質、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、葉酸受容体 α (FR α)、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-CSF、GM-CSFR、GP IIb/IIIa受容体、Gp130、GPIIB/IIIA、GPNMB、GRP78、HER2/neu、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、ヒアルロニダーゼ、ICOS、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IgE、IgE受容体 (Fc ϵ RI)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12R β 1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27/IL27R (wsx1)、IL29、IL-31R、IL31/IL31R、IL2R、IL4、IL4R、IL6、IL6R、インスリン受容体、Jaggedリガンド、Jagged1、Jagged2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、ルイスX、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、メソテリン、MRP4、MUC1、ムチン16 (MUC16、CA-125)、Na/K ATPアーゼ、NGF、ニカストリン (Nicastrin)、ノッチ受容体、ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFR α 、PDGFR β 、PD-1、PD-L1、PD-L2、ホスファチジルセリン、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、スフィンゴシン1リン酸、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGF β 、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNF α 、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、トランスフェリン、トランスフェリン受容体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2、およびWISP-3より選択される腫瘍抗原に結合する、本発明1001~1149のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1151]

抗原結合ドメインが、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を少なくとも含み、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が、同一のTAAに結合する、本発明1001~1150のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1152]

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が、同一のTAAの異なるエピトープに結合する、本発明1151の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1153]

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が、同一のTAAの同一のエピトープに結合する、本発明1151の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1154]

抗原結合ドメインが、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を少なくとも含み、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が、異なるTAAに結合する、本発明1001～1153のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1155]

共刺激受容体結合領域（CRBR）が、第1のCRBRおよび第2のCRBRを少なくとも含み、第1のCRBRおよび第2のCRBRが、同一の共刺激受容体に結合する、本発明1001、1003～1017、1020～1025、1028～1097、および1099～1154のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

[本発明1156]

第1の共刺激受容体結合領域（CRBR）および第2のCRBRが、同一の共刺激受容体の異なるエピトープに結合する、本発明1155の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1157]

第1の共刺激受容体結合領域（CRBR）および第2のCRBRが、同一の共刺激受容体の同一のエピトープに結合する、本発明1155の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1158]

共刺激受容体結合領域（CRBR）が、第1のCRBRおよび第2のCRBRを少なくとも含む、本発明1001、1003～1017、1020～1025、1028～1097、および1099～1157のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

[本発明1159]

第1のCRBRおよび第2のCRBRが、異なる共刺激受容体に結合する、本発明1155～1158のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1160]

少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）が、41BB（CD137）、OX40（CD134）、CD27、グルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質（GITR）、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体（BAFF-R）、B細胞成熟抗原（BCMA）、膜貫通型活性化因子およびCAML相互作用因子（Transmembrane activator and CAML interactor）（TACI）、ならびにNKG2Dより選択される共刺激受容体に結合する、本発明1001、1003～1017、1020～1025、1028～1097、および1099～1159のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

[本発明1161]

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）より選択される共刺激受容体に結合する、本発明1001、1003～1017、1020～1025、1028～1097、および1099～1160のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1162]

少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）が、41BB（CD137）に結合する、本発明1001、1003～1017、1020～1025、1028～1097、および1099～1161のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

[本発明1163]

少なくとも1つの共刺激受容体が、SEQ ID NO:215に示されるアミノ酸配列を含むか、またはSEQ ID NO:215に示されるアミノ酸配列との少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、本発明1001、1003～1017、1020～1025、1028～1097、および1099～1162のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1164]

少なくとも1つの共刺激受容体が、SEQ ID NO:321に示されるアミノ酸配列を含む、本発明1001、1003～1017、1020～1025、1028～1097、および1099～1163のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

50

[本発明1165]

少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）が、共刺激受容体のネイティブ同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、または共刺激受容体との結合活性を示すそれらのバリエーションであるかまたはそれを含む、本発明1002～1015、1018～1023、1026～1095、1097～1121、1123～1164のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1166]

少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（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、本発明1002～1015、1018～1023、1026～1095、1097～1121、1123～1164のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

[本発明1167]

抗体またはその抗原結合断片が、Fv、scFv、Fab、またはシングルドメイン抗体（sdAb）である、本発明1166の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1168]

抗体またはその抗原結合断片がsdAbである、本発明1166または本発明1122の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1169]

sdAbがヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、本発明1168の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

[本発明1170]

sdAbが、VHH、VNAR、改変型VHドメイン、または改変型VKドメインである、本発明1168または本発明1169の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1171]

抗体またはその抗原結合断片がscFvである、本発明1166または本発明1167の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1172]

抗体またはその抗原結合断片がFabである、本発明1166または本発明1167の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

[本発明1173]

抑制性受容体結合領域（IRBR）が、第1のIRBRおよび第2のIRBRを少なくとも含み、第1のIRBRおよび第2のIRBRが、同一の抑制性受容体に結合する、本発明1002～1015、1018～1023、1026～1095、1097～1121、1123～1172のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1174]

第1の抑制性受容体結合領域（IRBR）および第2のIRBRが、同一の抑制性受容体の異なるエピトープに結合する、本発明1173の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1175]

第1の抑制性受容体結合領域（IRBR）および第2のIRBRが、同一の抑制性受容体の同一のエピトープに結合する、本発明1173の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

[本発明1176]

抑制性受容体結合領域（IRBR）が、第1のIRBRおよび第2のIRBRを少なくとも含む、本発明1002～1015、1018～1023、1026～1095、1097～1121、1123～1175のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1177]

第1のIRBRおよび第2のIRBRが、異なる抑制性受容体に結合する、本発明1173～1176のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1178]

少なくとも1つの受容体結合領域（IRBR）が、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、また

50

はTIM3より選択される抑制性受容体に結合する、本発明1002～1015、1018～1023、1026～1095、1097～1121、1123～1177のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1179]

少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）がPD-1に結合する、本発明1002～1015、1018～1023、1026～1095、1097～1121、1123～1178のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1180]

第1の抗原結合ドメインとFc領域との間の第1の連結ペプチド（LP1）を含む、本発明1001～1179のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1181]

CD3結合領域と第2の抗原結合ドメインとの間の第2の連結ペプチド（LP2）を含む、本発明1001～1180のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1182]

共刺激受容体結合領域（CRBR）とFc領域との間の第1の連結ペプチド（LP1）を含む、本発明1001～1180のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1183]

CD3結合領域と第2の共刺激受容体結合領域（CRBR）との間の第2の連結ペプチド（LP2）を含む、本発明1001～1182のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1184]

抗原結合ドメインまたは共刺激受容体結合領域とFc領域との間の第1の連結ペプチド（LP1）およびCD3結合領域と抗原結合ドメインまたはCRBRとの間の第2の連結ペプチド（LP2）を含み、

N末端からC末端へ、第1の抗原結合ドメインまたはCRBR - LP1 - Fc領域 - リンカー - CD3結合領域 - LP2 - 第2の抗原結合ドメインまたはCRBRという構造的配置を有する、本発明1001～1183のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1185]

リンカーが切断可能リンカーである、本発明1184の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1186]

リンカーが非切断可能リンカーである、本発明1184の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1187]

2つの連結ペプチドが相互に同一ではない、本発明1184～1186のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1188]

LP1またはLP2が独立に約1～20アミノ酸長のペプチドである、本発明1180～1187のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1189]

LP1またはLP2が独立に、SEQ ID NO:10～13、119、135、147、149に示されるGly-SerリンカーもしくはGGGであるかまたはそれを含むペプチドを含む、本発明1188の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1190]

抗CD3抗体または抗原結合断片がFv抗体断片である、本発明1001～1189のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1191]

Fv抗体断片が、ジスルフィド安定化抗CD3結合Fv断片（dsFv）である、本発明1190の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1192]

抗CD3抗体または抗原結合断片が、

アミノ酸配列TYAMN（SEQ ID NO:16）を含むVH CDR1；アミノ酸配列RIRSKYNNYATYYADSVKD（SEQ ID NO: 17）

10

20

30

40

50

を含むVH CDR2；アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18) を含むVH CDR3；アミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:19) を含むVL CDR1；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:20) を含むVL CDR2；およびアミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO:21) を含むVL CDR3を含む、本発明1001～1191のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1193]

抗CD3 dsFvが、SEQ ID NO:14、32～62、287、290、および311のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:14、32～62、287、290、および311のうちのいずれかとの少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有する、VH；ならびに

SEQ ID NO:15、63～81、241、288、および289のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:15、63～81、241、288、および289のうちのいずれかとの少なくとも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、本発明1160または本発明1161の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1194]

抗CD3 dsFvが、SEQ ID NO:14のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含む、本発明1190～1193のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1195]

抗CD3 dsFvが、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:72のアミノ酸配列を含むか；抗CD3 dsFvが、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:241のアミノ酸配列を含むか；抗CD3 dsFvが、SEQ ID NO:287のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:288のアミノ酸配列を含むか；または抗CD3 dsFvが、SEQ ID NO:311のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:289のアミノ酸配列を含む、本発明1190～1194のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1196]

作用物質にコンジュゲートされている、本発明1001～1195のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1197]

作用物質が、治療剤、抗腫瘍剤、毒素もしくはその断片、検出可能部分、または診断剤である、本発明1196の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1198]

作用物質が、リンカーを介して多重特異性ポリペプチド構築物にコンジュゲートされている、本発明1197の多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1199]

本発明1001～1198のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物をコードする、ポリヌクレオチド。

[本発明1200]

本発明1001～1198のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物のうちのいずれかのポリペプチド鎖をコードする、ポリヌクレオチド。

[本発明1201]

本発明1001～1198のいずれかの多重特異性構築物の第1のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、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、

第1および第2の核酸配列が、配列内リボソーム進入部位 (IRES) によって、または自己切断ペプチドもしくはリボソームスキッピングを引き起こすペプチドをコードする核酸によって、分離されている、

ポリヌクレオチド。

[本発明1202]

10

20

30

40

50

第1の核酸配列および第2の核酸配列が同一のプロモーターに機能的に連結されている、本発明1201のポリヌクレオチド。

[本発明1203]

多重特異性ポリペプチド構築物が第3のポリペプチド鎖を含み、ポリヌクレオチドが、多重特異性構築物の第3のポリペプチドをコードする第3の核酸をさらに含む、本発明1201または本発明1202のポリヌクレオチド。

[本発明1204]

第3の核酸が、配列内リボソーム進入部位（IRES）によって、または自己切断ペプチドもしくはリボソームスキッピングを引き起こすペプチドをコードする核酸によって、第1および/または第2のポリペプチドから分離されており、かつ/または

第3の核酸配列が、第1および/または第2の核酸配列と同一のプロモーターに機能的に連結されている、

本発明1203のポリヌクレオチド。

[本発明1205]

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核酸が、T2A、P2A、E2A、またはF2Aより選択される、本発明1201～1204のいずれかのポリヌクレオチド。

[本発明1206]

本発明1199～1205のいずれかのポリヌクレオチドを含む、ベクター。

[本発明1207]

発現ベクターである、本発明1206のベクター。

[本発明1208]

ウイルスベクターまたは真核生物ベクターであるベクターであって、任意で、真核生物ベクターが哺乳動物ベクターである、本発明1206または1207のベクター。

[本発明1209]

本発明1199～1205のいずれかの1種または複数種のポリヌクレオチドまたは本発明1206～1208のいずれかの1種または複数種のベクターを含む、細胞。

[本発明1210]

組換えであるかまたは単離されている、本発明1209の細胞。

[本発明1211]

哺乳動物細胞である、本発明1210の細胞。

[本発明1212]

HEK293細胞またはCHO細胞である、本発明1211の細胞。

[本発明1213]

本発明1199～1205のいずれかの1種または複数種のポリヌクレオチドまたは本発明1206～1208のいずれかの1種または複数種のベクターを、細胞に導入する工程、および多重特異性ポリペプチド構築物が産生される条件の下で、該細胞を培養する工程を含む、多重特異性ポリペプチド構築物を作製する方法。

[本発明1214]

細胞によって多重特異性ポリペプチドが産生される条件の下で、本発明1209～1213のいずれかの細胞を培養する工程を含む、多重特異性ポリペプチド構築物を作製する方法。

[本発明1215]

哺乳動物細胞である、本発明1213または本発明1214の細胞。

[本発明1216]

HEK293細胞またはCHO細胞である、本発明1215の細胞。

[本発明1217]

多重特異性ポリペプチド構築物を細胞から単離するかまたは精製する工程をさらに含む、本発明1213または本発明1214の方法。

[本発明1218]

多重特異性ポリペプチド構築物がヘテロ二量体である、本発明1213～1217のいずれか

10

20

30

40

50

の方法。

[本発明1219]

本発明1213～1218のいずれかの方法によって作製された、多重特異性ポリペプチド構築物。

[本発明1220]

本発明1001～1198または本発明1219のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

[本発明1221]

無菌である、本発明1220の薬学的組成物。

[本発明1222]

標的細胞およびT細胞を本発明1001～1198もしくは本発明1219のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物または本発明1220もしくは本発明1221の薬学的組成物と接触させる工程を含む、免疫応答を刺激するかまたは誘導する方法であって、標的細胞が、多重特異性ポリペプチド構築物によって認識される腫瘍関連抗原を発現している、方法。

[本発明1223]

標的細胞が、腫瘍関連抗原（TAA）を発現している腫瘍細胞である、本発明1222の方法。

[本発明1224]

多重特異性ポリペプチド構築物が、プロテアーゼの基質として機能する切断可能リンカーを含み、免疫応答の誘導または刺激がプロテアーゼの存在下で増加する、本発明1222または本発明1223の方法。

[本発明1225]

免疫エフェクター細胞によって、腫瘍によって、または腫瘍微小環境に存在する細胞によって、プロテアーゼが産生される、本発明1224の方法。

[本発明1226]

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、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、本発明1224または本発明1225の方法。

[本発明1227]

免疫エフェクター細胞が、抗原を発現する細胞の近傍にある、本発明1226の方法。

[本発明1228]

プロテアーゼが、組織内のTAAを発現する細胞の近傍にある腫瘍によって産生され、かつ/または組織内のTAAと共局在している腫瘍によって産生され、

多重特異性ポリペプチド構築物がプロテアーゼに曝された時に、プロテアーゼが多重特異性ポリペプチド構築物内の切断可能リンカーを切断する、
本発明1222～1227のいずれかの方法。

[本発明1229]

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より選択される、本発明1222～1228のいずれかの方法。

[本発明1230]

プロテアーゼがグランザイムBである、本発明1229の方法。

[本発明1231]

接触させる工程が、エキスピボまたはインビトロで実施される、本発明1222～1230のいずれかの方法。

[本発明1232]

接触させる工程が、対象においてインビボで実施される、本発明1222～1231のいずれかの方法。

[本発明1233]

本発明1001～1198もしくは本発明1219のいずれかの多重特異性コンジュゲートまた

10

20

30

40

50

は本発明1220もしくは本発明1221の薬学的組成物を治療的に有効な量で、それを必要とする対象へ投与する工程を含む、対象における免疫応答を刺激するかまたは誘導する方法。

[本発明1234]

細胞性免疫を増加させる、本発明1222～1233のいずれかの方法。

[本発明1235]

T細胞活性を増加させる、本発明1222～1234のいずれかの方法。

[本発明1236]

細胞溶解性T細胞（CTL）活性を増加させる、本発明1222～1235のいずれかの方法。

[本発明1237]

腫瘍または癌に対する免疫応答が増加する、本発明1222～1236のいずれかの方法。

[本発明1238]

対象における疾患または状態を処置する、本発明1222～1236のいずれかの方法。

[本発明1239]

本発明1001～1198のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物または本発明1220もしくは本発明1221の薬学的組成物を治療的に有効な量で、それを必要とする対象へ投与する工程を含む、対象における疾患または状態を処置する方法。

[本発明1240]

疾患または状態が腫瘍または癌である、本発明1238または本発明1239の方法。

[本発明1241]

疾患または状態が腫瘍関連抗原（TAA）を発現する、本発明1238～1240のいずれかの方法。

[本発明1242]

対象がヒトである、本発明1222～1241のいずれかの方法。

[本発明1243]

対象における疾患または状態の処置において使用するための、本発明1001～1198のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物または本発明1220もしくは本発明1221の薬学的組成物。

[本発明1244]

対象における疾患または状態の処置において使用するための医薬の製造のための、本発明1001～1198のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物または本発明1220もしくは本発明1221の薬学的組成物の使用。

[本発明1245]

疾患または状態が腫瘍または癌である、本発明1243の使用のための多重特異性ポリペプチド構築物もしくは薬学的組成物、または本発明1244の使用。

[本発明1246]

疾患または状態が腫瘍関連抗原（TAA）を発現する、本発明1243もしくは本発明1245の使用のための多重特異性ポリペプチド構築物もしくは薬学的組成物、または本発明1244もしくは本発明1245の使用。

[本発明1247]

対象がヒトである、本発明1243、本発明1245、もしくは本発明1246の使用のための多重特異性ポリペプチド構築物もしくは薬学的組成物、または本発明1244、本発明1245、もしくは本発明1246の使用。

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】図1は、制約されたCD3結合を有する本開示の多重特異性ポリペプチド構築物の基本成分の模式図である。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付けられる。ヘテロ二量体Fc領域のようなFc領域は、CD3結合領域に対してN末端側に位置付けられる。CD3結合領域のすぐ近くにおけるFcのこの位置付けは、CD3結合を妨害する。共刺激受容体結合領域（CRBR）は、アミノ末端および/またはカルボキシ末端に位置付けられる。図示された例示的な多重特異性構築物は、多重特異性分子が1つまた

10

20

30

40

50

は2つの抗原結合ドメインを有する場合、第2のCRBRをさらに含有してよい。

【図2】図2A～2Fは、CRBRを含むかまたは含まない様々な代表的なB7H3標的型制約CD3エンゲージャーを図示する。図2Aは、(cx3095またはcx3834と名付けられた)CRBRとしての4-1BB結合ドメインを含まない代表的なB7H3標的型制約CD3エンゲージャーを図示する。cx3834は、cx3095と比較して、反対のノブおよびホールの配置を有するため、図2Aに図示されたcx3834の第1のポリペプチド鎖は、Fcホールポリペプチドを含有しており、図示された第2のポリペプチドは、Fcノブポリペプチドを有する。(cx3091と名付けられた)CRBRとしての41BB結合ドメインを含む代表的なB7H3標的型制約CD3エンゲージャーが図2Bに図示され、cx3091は、ヘテロ二量体の反対の鎖のC末端に位置付けられた41BBターゲティングsdAbを有し、それによって、41BBとの1価の結合を示す。代表的な構築物cx3095、cx3834、およびcx3091の各々は、ヘテロ二量体の一方の鎖のN末端およびC末端に位置付けられたB7H3ターゲティングsdAbを有し、それによって、B7H3との2価の結合を示す。図2C～2Fは、ヘテロ二量体の一方の鎖のN末端およびC末端に位置付けられたB7H3ターゲティングsdAb、ならびにヘテロ二量体の反対の鎖のC末端に位置付けられたCRBR(例えば、OX40、GITR、ICOS、またはCD28 sdAb)を含む、代表的なB7H3標的型制約CD3エンゲージャーを図示する。

10

【図3】図3は、代表的な5T4標的型制約CD3エンゲージャー、41BB結合ドメインを含まないもの(上)および含むもの(下)を図示する。cx3546およびcx3547は、ヘテロ二量体の一方の鎖のN末端に位置付けられた同一の5T4ターゲティングsdAb(12E9)、およびヘテロ二量体の一方の鎖のC末端に位置付けられた異なる5T4ターゲティングsdAb(それぞれ、14B5または16G10)を有する。cx3499およびcx3497は、それぞれ、cx3546およびcx3547と同一であるが、Fcヘテロ二量体の反対の鎖のC末端に位置付けられた41BBターゲティングsdAbを有する。cx3546、cx3547、cx3499、およびcx3497の各々は、Fc領域とCD3結合領域との間に切断可能リンカーを含有している。cx5185が、CD3結合領域に対してC末端側に位置付けられた4-1BBターゲティングsdAbを含むこと以外、cx5185およびcx5951は同一であり；両方とも、Fc領域とCD3結合領域との間に非切断可能リンカーを含有しており、Fcヘテロ二量体のN末端およびC末端に位置付けられた5T4ターゲティングsdAbのヒト化バージョン、hz12E9v9およびhz16G10v11を含有している。これらの代表的な5T4標的型制約CD3エンゲージャーは、5T4との2価の結合を示し、41BB結合ドメインを含有している構築物においては、41BBとの1価の結合を示す。

20

30

【図4】図4A～4Dは、DART-FcフォーマットB7H3×CD3と比較された、B7H3を標的とする代表的な制約CD3係合構築物cx3091(41BB結合ドメインを含む)およびcx3095(41BB結合ドメインを含まない)による細胞結合を図示する。図4Aおよび図4Bは、評価された構築物の各々のA375細胞(B7H3陽性メラノーマ細胞株)との結合を示す。図4Cおよび図4Dは、T細胞との結合を図示しており、DART-FcフォーマットB7H3×CD3のみが結合し、41BB結合ドメインを含有しているか(cx3091)または41BB結合ドメインを欠く(cx3095)制約CD3エンゲージャーはT細胞に結合しないことを証明している。図4Aおよび図4Cは、各構築物の200nMにおけるノーマライズされた細胞数対蛍光のヒストグラムを示す。様々な細胞型における各構築物の完全な滴定が、図4Bおよび図4Dに示される。図4Aおよび図4Cにおいて、二次抗ヒトAPC抗体のみの対照は、塗りつぶされた黒色のトレースで示され、陽性対照抗CD3の結合は、白色のトレースで示され、cx3091、cx3095、およびDART-Fc B7H3×CD3は、図4Aおよび図4Cにおいて灰色の影付きのトレースで示される。

40

【図5】図5A～5Dは、5T4を標的とする代表的な制約CD3係合構築物cx3497(41BB結合ドメインを含む)およびcx3547(41BB結合ドメインを含まない)による細胞結合を図示する。図5Aおよび図5Bは、Ovcar-5細胞(5T4陽性メラノーマ細胞株)との結合を示す。図5Cおよび図5Dは、T細胞との結合を図示しており、試験された構築物が、単離されたT細胞に結合しないことを示している。図5Aおよび図5Cは、各構築物の200nMにおけるノーマライズされた細胞数対蛍光のヒストグラムを示す。様々な細胞型における各構築物の完全な滴定が、図5Bおよび図5Dに示される。図5Aおよび図5Cにおいて、二次抗ヒト

50

APC抗体のみの対照は、塗りつぶされた黒色のトレースで示され、陽性対照抗CD3の結合は、白色のトレースで示され、cx3497およびcx3547は、図5Aおよび図5Cにおいて灰色の影付きのトレースで示される。

【図6】図6A～6Cは、代表的なB7H3標的型制約CD3係合構築物による共刺激受容体（41BBまたはOX40）の標的抗原特異的作動を媒介する能力を図示する。図6Aにおいては、41BB結合ドメインを含有している代表的なB7H3標的型制約CD3係合構築物cx3091を、41BB結合ドメインを欠く類似した構築物cx3095と比較して、B7H3陽性細胞株A375および同族A375 B7H3ノックアウト細胞株（A375ΔB7H3）の存在下で、41BB作動を評価するため、Jurkat 41BB NFκBルシフェラーゼレポーター細胞に対して評価した。注目すべきことに、cx3091は、強力で頑強な41BB作動が可能であった。cx3095は、41BBシグナリングと無関係のTCR/CD3シグナリングによって媒介された可能性が高い、微量のNFκBシグナリングを誘導した。図6Bおよび6Cにおいては、41BB結合ドメイン（cx3091）、OX40結合ドメイン（cx3723）を含有しているか、CRBDを含有していない（cx3834）代表的なB7H3標的型制約CD3係合構築物を、A375標的抗原発現細胞と共培養されたOX40レポーターJurkat細胞株（図6B）または41BBレポーターJurkat細胞株（図6C）に対して評価した。

10

【図7】図7A～7Bは、代表的なB7H3標的型制約CD3係合構築物cx3095およびcx3091、ならびにB7H3およびCD3を標的とする別のDART-Fcフォーマットによる、標的抗原特異的T細胞活性化を媒介する能力を図示する。Jurkat CD3 NFAT-GFPレポーター細胞を、B7H3陽性細胞株A375（図7A）およびA375 B7H3ノックアウト細胞株A375ΔB7H3（図7B）の存在下で、T細胞活性化を評価するため、使用した。注目すべきことに、41BBを含有している構築物cx3091は、増強されたNFATシグナリングを示したが、それは、Jurkat細胞生存度の増加および/またはTCR/CD3シグナリング後の消耗の低下によるものであった可能性が高い。

20

【図8】図8A～8Dは、B7H3およびCD3を標的とする別のDART-Fcフォーマットと比較された、代表的なB7H3標的型制約CD3係合構築物、41BB結合ドメインを含むcx3091および41BB結合ドメインを含まないcx3095によって駆動されたT細胞媒介細胞傷害の効力を図示する。B7H3陽性A375細胞株におけるCD3係合構築物の50nM～80pMの滴定範囲が、図8Aおよび8Cに示され、B7H3ノックアウトA549におけるものが、図8Bおよび8Dに示される。図8Aおよび8Bは、それぞれの細胞株において、標識された標的細胞におけるカスパーゼ活性化による全細胞アポトーシス（カスパーゼ3/7基質について陽性の細胞）によって決定されたT細胞媒介細胞傷害を示す。図8Cおよび8Dは、T細胞媒介細胞傷害に起因する標的細胞の枯渇を図示する。

30

【図9】図9A～9Eは、様々な共刺激受容体結合領域が組み入れられたB7H3標的型制約CD3係合構築物によって、A375細胞に対して誘導された、標的依存的なT細胞媒介細胞傷害の効力を図示する一連のグラフである。共刺激受容体結合ドメインが組み入れられていないか（cx3834）、OX40結合ドメイン（図9A cx3723）、41BB結合ドメイン（図9B cx3091）、GITR結合ドメイン（図9C cx3724）、ICOS結合ドメイン（図9D cx3721）、またはCD28結合ドメイン（図9E cx3726）のいずれかが組み入れられた、B7H3を標的とする例示的な制約CD3係合構築物を、ここで使用した。細胞傷害は、標識された標的細胞（A375）およびカスパーゼ3/7基質の二重陽性蛍光を定量化することによって測定された、標的細胞アポトーシスを表す全オーバーラップ面積によって示される。

40

【図10】図10Aおよび10Bは、5T4を標的とする代表的な制約CD3係合構築物cx3497（41BB結合ドメインを含む）およびcx3547（41BB結合ドメインを含まない）によって、5T4陽性細胞株Ovcar-5（図10A）および5T4陰性細胞株CCRF-CEM（図10B）に対して媒介されたT細胞細胞傷害の動力学を図示する。全オーバーラップ面積は、二重陽性：蛍光標識された標的細胞における切断されたカスパーゼ3/7基質を表す。抗原陰性細胞株において観察された初期の細胞傷害は、標的細胞とT細胞との間のMHCミスマッチによって媒介されたものである可能性が高い。注目すべきことに、41BB結合ドメインを含有しているcx3497のみが、細胞傷害を誘導することができ、動力学は、TCRシグナリング後

50

の41BBアップレギュレーションのものと一致している。

【図11】図11A～11Dは、B7H3およびCD3を標的とする別のDART-Fcフォーマットと比較された、代表的なB7H3標的型制約CD3係合構築物、41BB結合ドメインを含むcx3091および41BB結合ドメインを含まないcx3095によって駆動されたT細胞活性化の効力を図示する。B7H3陽性A375細胞株におけるCD3係合構築物の50nM～80pMの滴定範囲が、図11Aおよび11Cに示され、B7H3ノックアウトA549細胞株におけるものが、図11Bおよび11Dに示される。図11Aおよび図11Bは、CD4 T細胞活性化を示し、図11Cおよび11Dは、CD8 T細胞活性化を示す。CD71アップレギュレーションによって証拠付けられるT細胞活性化を、フローサイトメトリーによって測定した。

【図12】図12Aおよび12Bは、B7H3陽性A375標的細胞（図12A）およびB7H3陰性CCRF-CEM標的細胞（図12B）の存在下での、代表的なB7H3標的型制約CD3係合構築物、41BB結合ドメインを含むcx3091および41BB結合ドメインを含まないcx3095によって処理されたT細胞によるIFN γ 産生の比較を示す。サイトカイン産生は、fluorescentアッセイによってモニタリングされた。

【図13】図13は、5T4陽性Ovar-5細胞および5T4陰性CCRF-CEM細胞の存在下での、代表的な5T4標的型制約CD3係合構築物、41BB結合ドメインを含むcx3499およびcx3497ならびに41BB結合ドメインを含まないcx3546およびcx3547によって処理されたT細胞によるIFN γ 産生の比較を示す。サイトカイン産生は、ELISAによってモニタリングされた。cx3546およびcx3499は、同一の5T4ターゲティングsdAbを含有しており、3547および3497は、同一の5T4ターゲティングsdAbを含有している。従って、これらの構築物のセットの間の唯一の違いは、41BB結合ドメインの付加である。41BB結合ドメインが組み入れられた5T4標的型制約CD3係合構築物は、T細胞からのIFN γ 産生を抗原依存的に誘導する増強された能力を示す。

【図14】図14Aおよび14Bは、共刺激受容体結合ドメインが組み入れられた制約CD3係合構築物の、それぞれの共刺激シグナリング経路の特異的な作動を媒介する能力を証明する。ここでは、Jurkat OX40（図14A）またはJurkat 41BB（図14B）NF κ Bルシフェラーゼレポーター細胞を使用した。共刺激受容体結合ドメインが組み入れられていないか（cx3834）、OX40結合ドメイン（cx3723）または41BB結合ドメイン（cx3091）のいずれかが組み入れられた、B7H3を標的とする例示的な制約CD3係合構築物を、ここで使用した。OX40結合ドメインまたは41BB結合ドメインのいずれかが組み入れられたcx3723およびcx3091は、それぞれ、標的とされた共刺激受容体の特異的な作動を誘導することが見出された。共刺激受容体結合領域を含有していない構築物を含む、全ての構築物によって、ある程度の誘導されたNF κ Bシグナリングが観察され、このことから、標的依存的なCD3シグナリングが、この系において、NF κ Bシグナリングを媒介することが示唆された。B7H3陽性細胞株A375が使用された。

【図15】図15A～15Cは、18H10およびそのヒト化バリエーションhz18H10v7の、ヒトPD-1（図15A）、カニクイザルPD-1（図15B）、またはマウスPD-1（図15C）を発現するFreeStyle 293細胞との結合を図示する。トランスフェクトされていない（293）細胞との結合も、評価し、示した。

【図16】図16は、18H10およびそのヒト化バリエーションhz18H10v7の、ヒト活性化T細胞との結合を図示するグラフである。被験物質の活性化T細胞との結合を、フローサイトメトリーによって定量化した。

【図17】図17は、18H10およびそのヒト化バリエーションhz18H10v7の、Jurkatレポーターシフェラーゼアッセイ系におけるT細胞受容体（TCR）シグナリングのPD1/PDL1によって媒介される抑止を阻止する能力を図示するグラフである。

【図18】図18A～18Bは、抗PD1結合ドメインを含有している様々なTAA標的型制約CD3係合構築物を表す一連の模式図を図示する。本開示のTAA標的型制約CD3係合構築物の基本成分は、制約された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付けられている。ヘテロ二量体Fc領域のようなFc領域は、CD3結合領域に対してN末端側に位置付けられている。CD3結合領域のすぐ近くにおけるFcのこ

10

20

30

40

50

の位置付けは、CD3結合を妨害する。例示的な態様において、抗PD1結合ドメインは、ヘテロ二量体Fcに対してN末端側に位置付けられ、抗CD3結合ドメインに対してC末端側に41BB共刺激結合ドメインが含有されていてもよい。

【図19】図19Aは、2種のポリペプチド、鎖1および鎖2から構成されたB7H3を標的とする様々な制約CD3構築物の模式図である。鎖1は、G100Cにおいて修飾された抗CD3 VLドメインに非切断可能リンカーを介して連結されたヘテロ二量体Fc「ホール」（上）；抗CD3 VLドメインに非切断可能リンカーを介して連結されたヘテロ二量体Fc「ホール」に連結されたB7H3ターゲティングsdAb（中央）；またはG100Cにおいて修飾された抗CD3 VLドメインに非切断可能リンカーを介して連結されたヘテロ二量体Fc「ホール」に連結されたB7H3ターゲティングsdAb（下）のいずれかを含有している。鎖2は、第2のB7H3 sdAbに連結されたG44Cにおいて修飾された抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結された相補的なヘテロ二量体Fc「ノブ」に連結されたB7H3標的型sdAb（上）；抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結された相補的なヘテロ二量体Fc「ノブ」に連結されたB7H3標的型sdAb（中央）；またはG44Cによって修飾された抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結された相補的なヘテロ二量体Fc「ノブ」に連結されたB7H3標的型sdAb（下）のいずれかを含有している。同時発現させた時、それぞれ、ホールおよびノブにおけるVL:VHの会合を介して、CD3結合ドメインが適切に組み立てられる。示された場合、VH:VL相互作用は、修飾された残基、VHドメインのG44CとVLドメインのG100Cとの間の改変されたジスルフィド結合によって安定化されている。図19Bは、2種のポリペプチド、鎖1および鎖2から構成された、B7H3を標的とする様々な制約CD3構築物の模式図である。鎖1は、共刺激受容体ターゲティングsdAbに連結されたG100Cにおいて修飾された抗CD3 VLドメインに非切断可能リンカーを介して連結されたヘテロ二量体Fc「ホール」を含有している。鎖2は、第2のB7H3標的型sdAbに連結されたG44Cにおいて修飾された抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結された相補的なヘテロ二量体Fc「ノブ」に連結されたB7H3標的型sdAb（上）；B7H3標的型sdAbに連結されたG44Cにおいて修飾された抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結されたヘテロ二量体Fc「ノブ」（中央）；またはG44Cによって修飾された抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結された相補的なヘテロ二量体Fc「ノブ」に連結されたB7H3標的型sdAb（下）のいずれかを含有している。同時発現させた時、それぞれ、ホールおよびノブにおけるVL:VHの会合を介して、CD3結合ドメインが適切に組み立てられる。VH:VL相互作用は、修飾された残基、VHドメインのG44CとVLドメインのG100Cとの間の改変されたジスルフィド結合によって安定化されている。得られた構築物は、2価（上）または1価（中央および下）のいずれかでB7H3に係合する。ここでの構築物は、全て、共刺激受容体ターゲティングsdAbを含有している。図19Cは、B7H3ターゲティングドメインがFABである、3種のポリペプチド、鎖1、鎖2、および鎖3から構成された、B7H3を標的とする様々な制約CD3構築物の模式図である。鎖1は、G100Cの修飾を欠くか（上）または含有している（下）抗CD3 VLドメインに前記のリンカーを介して連結されたヘテロ二量体Fcの第1のメンバー（Fc-Het-1）にヒンジを介して連結されたBH73ターゲティングVH、IgG定常重鎖1（CH1）を含有している。鎖2は、G44Cの修飾を欠く（上）または含有している（下）抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結されたヘテロ二量体Fcの第2のメンバー（Fc-Het-2）にヒンジを介して連結されたBH73ターゲティングVH、IgG定常重鎖1（CH1）を含有している。鎖3は、ヒトIg定常軽鎖（CL）領域に連結された相補的なB7H3ターゲティングVLドメインを含有している。同時発現させた時、相補的なヘテロ二量体Fc領域におけるVL:VHの会合を介して、CD3結合ドメインが適切に組み立てられる。示された場合、VH:VL相互作用は、修飾型残基、VHドメインのG44CとVLドメインのG100Cとの間の改変されたジスルフィド結合によって安定化されている。

【図20】図20は、2種のポリペプチド、鎖1および鎖2から構成される、DLL3を標的とする3種の制約CD3構築物の模式図である。鎖1は、共刺激受容体ターゲティングsdAbに連結されたG100Cにおいて修飾された抗CD3 VLドメインに非切断可能リンカーを介して連結されたヘテロ二量体Fc「ホール」を含有している。鎖2は、第2のDLL3標的型sdAb

10

20

30

40

50

に連結されたG44Cにおいて修飾された抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結された相補的なヘテロ二量体Fc「ノブ」に連結されたDLL3標的型sdAb（上）；DLL3標的型sdAbに連結されたG44Cにおいて修飾された抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結されたヘテロ二量体Fc「ノブ」（中央）；またはG44Cによって修飾された抗CD3 VHドメインに前記のリンカーを介して連結された相補的なヘテロ二量体Fc「ノブ」に連結されたDLL3標的型sdAb（下）のいずれかを含有している。

【図21】図21Aおよび21Bは、B7H3を標的とする代表的な制約CD3係合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ており、複合体cx5873およびcx5965は、各々、1つのB7H3結合ドメインを含有している。図21Aは、B7H3陽性A375細胞との結合を示す。図21Bは、B7H3陰性CCRF-CEM細胞および単離されたT細胞との結合の欠如を示す。図21Cおよび21Dは、B7H3を標的とする代表的な制約CD3係合構築物の、標的依存的にCD3を作動させる能力を図示する。図21Cは、B7H3に対して2価2エピトープである分子（cx5187）によるB7H3陽性A375細胞の係合が、B7H3に対して1価である構築物（cx5873およびcx5965）より強力なCD3シグナリングを誘導したことを示す。図21D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している。Jurkat CD3 NFAT-GFPレポーター細胞株が、CD3作動を評価するために使用された。

10

【図22】図22Aおよび22Bは、B7H3を標的とする代表的な制約CD3係合構築物の、T細胞媒介細胞傷害を標的依存的に誘導する能力を図示する。図22Aは、B7H3に対して2価であり2エピトープ性である構築物（cx5187）によってB7H3陽性A375細胞を標的とすることによって、B7H3に対して1価である構築物（cx5873およびcx5965）より強力なT細胞媒介細胞傷害が誘導されたことを示す。図22Bは、B7H3陰性CCRF-CEM細胞に対するT細胞媒介細胞傷害の欠如を図示する。

20

【図23】図23A～Dは、B7H3を標的とする代表的な制約CD3係合構築物が、B7H3陽性A375細胞の存在下では、T細胞を活性化することができるが、B7H3陰性CCRF-CEM細胞の存在下では、できないことを図示する。図23Aおよび23Bは、B7H3に対して2価であり2エピトープ性である構築物（cx5187）によってB7H3陽性A375細胞を標的とすることによって、B7H3に対して1価である構築物（cx5873およびcx5965）より強力なCD25発現がCD4+T細胞またはCD8+T細胞において誘導されたことを示す。図23Cおよび23Dは、B7H3陰性CCRF-CEM細胞の存在下での、それぞれ、CD4+T細胞またはCD8+T細胞におけるCD25発現の欠如を示す。

30

【図24】図24Aおよび24Bは、DLL3を標的とする1価および2価の制約CD3係合構築物が、DLL3発現細胞株SHP-77に結合したが（図24A）、単離されたT細胞には結合しなかったことを証明する（図24B）。結合はフローサイトメトリーによって評価された。図24Cは、DLL3を標的とする代表的な制約CD3係合構築物の、DLL3陽性SHP-77細胞の存在下でCD3シグナリングを作動させる能力を図示する。DLL3に対して2価であり2エピトープ性である構築物（cx5352）によるDLL3陽性細胞の係合は、DLL3に対して1価の構築物（cx5800およびcx5801）より強力なT細胞活性化を誘導した。Jurkat CD3 NFATルシフェラーゼレポーター細胞株が、CD3シグナリングを評価するために使用された。

【図25】図25Aおよび25Bは、例示的な5T4標的型制約CD3係合構築物、41BB結合ドメインを含むcx5185および41BB結合ドメインを含まないcx5951によって駆動されたT細胞媒介細胞傷害の効力を図示する。5T4陽性Ovcar5細胞株におけるCD3係合構築物の200nM～3.1pMの滴定範囲が、図25Aに示され、5T4陰性CCRF-CEM細胞株におけるものが、図25Bに示される。

40

【図26】図26A～Fは、様々な5T4陽性細胞、A375（図26Aおよび26D）、Ovcar-5（図26Bおよび26E）、SHP-77（図26Cおよび26F）の存在下での、代表的な5T4標的型制約CD3係合構築物、41BB結合ドメインを含むcx5185および41BB結合ドメインを含まないcx5951とのインキュベーションの後のCD4細胞（図26A～C）およびCD8細胞（図26D～F）におけるCD25発現によって評価されたT細胞活性化を図示する。T細胞活性化は、CD25の細胞表面発現をモニタリングするフローサイトメトリーによって評価された。

50

【図27】図27A～Cは、5T4陽性細胞株、A375（図27A）、SHP-77（図27B）、およびOvcar5（図27C）の存在下での、代表的な5T4標的型制約CD3係合構築物、41BB結合ドメインを含むcx5185および41BB結合ドメインを含まないcx5951の滴定液によって処理されたT細胞によるIFN γ 産生の比較を示す。

【図28】図28A～Fは、様々な5T4陽性細胞株、A375（図28Aおよび28D）、Ovcar-5（図28Bおよび28E）、SHP-77（図28Cおよび28F）の存在下での、代表的な5T4標的型制約CD3係合構築物、41BB結合ドメインを含むcx5185および41BB結合ドメインを含まないcx5951とのインキュベーションの後のCD4 T細胞（図28A～C）およびCD8 T細胞（図28D～F）におけるT細胞増殖を図示する。T細胞増殖を、CellTrace（商標）色素の希釈を介してモニタリングした。結果は、CellTrace（商標）Violet色素の希釈によってモニタリングされた増殖細胞の割合を図示する。

10

【図29】図29A～Fは、様々な5T4陽性細胞、A375（図29Aおよび29D）、Ovcar-5（図29Bおよび29E）、SHP-77（図29Cおよび29F）の存在下での、代表的な5T4標的型制約CD3係合構築物、41BB結合ドメインを含むcx5185および41BB結合ドメインを含まないcx5951とのインキュベーションの後のCD4 T細胞（図29A～C）およびCD8 T細胞（図29D～F）におけるミトコンドリア機能の評価を図示する。ミトコンドリア機能は、活性ミトコンドリアに蓄積するミトコンドリア選択的な蛍光プローブであるMitoTracker Greenを使用したフローサイトメトリーによって評価された。

【図30】図30は、41BB結合ドメインを含む5T4標的型制約CD3係合構築物cx5185は、41BBシグナリングを媒介することができるが、41BB結合ドメインを欠く同一の構築物cx5951は、できないことを示す。41BBシグナリングは、Jurkat 41BB NFkB β ルシフェラーゼレポーター細胞および抗原の起源としてのプレートに結合した組換え5T4を使用してモニタリングされた。

20

【図31】図31Aは、CRBRとしての4-1BB結合ドメインを含む様々な代表的なB7H3標的型制約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、FcノブのN末端およびC末端に位置付けられた、B7H3ターゲティングsdAbを有し、ヘテロ二量体の反対の鎖、FcホルムのC末端に位置付けられた、41BBターゲティングsdAbを有するが、相互に反対側に位置付けられたCD3結合FvのVHおよびVLを有する。図31B～Eは、図31Aに記載された例示的な構築物についてのT細胞レポーターアッセイの結果を図示する。図31Bおよび図31Cは、B7H3陽性細胞株A375またはB7H3陰性細胞株CCR-CEMが、それぞれ、Jurkat CD3 NFAT-GFPレポーター細胞と共培養された時のGFPレポーターの平均蛍光強度（MFI）を図示する。図31Dおよび図31Eは、B7H3陽性細胞株A375またはB7H3陰性細胞株CCR-CEMが、それぞれ、Jurkat CD3 NFATルシフェラーゼレポーター細胞と共培養された時のルシフェラーゼレポーターの相対発光ユニット（RLU）を図示する。

30

【図32】図32は、代表的なDLL3標的型制約CD3エンゲージャー、41BB結合ドメインを含まないcx5499（図32A）および41BB結合ドメインを含むcx5352（図32B）を図示する。cx5499およびcx5352は、ヘテロ二量体の一方の鎖のN末端およびヘテロ二量体の同一の鎖のC末端に位置付けられた、DLL3ターゲティングsdAbを有する。cx5352が、ヘテロ二量体の反対の鎖のC末端に位置付けられた41BBターゲティングsdAbを有し、cx5499が、それを有しないことを除き、cx5352およびcx5499は相互に同一である。これらの代表的なDLL3標的型制約CD3エンゲージャーは、DLL3との2価の結合を示し、41BB結合ドメインを含有している構築物においては、41BBとの1価の結合を示す。

40

【図33】図33は、41BB結合ドメインを含むDLL3標的型制約CD3係合構築物cx5352は、41BBシグナリングを媒介することができるが、41BB結合ドメインを欠く同一の構築物cx5499は、それができないことを示す。親HEK-293細胞またはDLL3の短縮バージョンを一過性発現するHEK-293のいずれかと共培養されたJurkat 41BB NFkB β ルシフェラーゼレポーター細胞を使用して、DLL3依存的な41BBシグナリングをモニタリングした。活性は、相対ルシフェラーゼ単位（RLU）として示される。

【図34】図34A～Bは、41BB結合ドメインを含む例示的なDLL3標的型制約CD3係合構

50

築物cx5352によって、DLL3陽性細胞株SHP-77（図34A）またはDLL3陰性細胞株HEK-293FS（図34B）に対して駆動されたT細胞媒介細胞傷害の効力を図示する。3人の異なるT細胞ドナーが、このアッセイにおいて、エフェクター細胞の起源として使用された。

【図35】図35A～Cは、例示的なDLL3標的型制約CD3係合構築物、41BB結合ドメインを含むcx5352および41BB結合ドメインを含まないcx5499によって駆動されたT細胞媒介細胞傷害の効力の差を示す。ここでは、10:1（図35A）、5:1（図35B）、または1.25:1（図35C）という様々なエフェクター（T細胞）と標的細胞（SHP-77）との比（エフェクター:標的細胞比）を比較した。ヒトPBMCをT細胞の起源として使用した。

【図36】図36は、DLL3陽性細胞株SHP-77の存在下での、代表的なDLL3標的型制約CD3係合構築物、41BB結合ドメインを含むcx5352および41BB結合ドメインを含まないcx5499の滴定液によって処理されたT細胞によるIFN γ 産生の比較を示す。

【発明を実施するための形態】

【0064】

詳細な説明

本開示は、CD3、第2の抗原、および共刺激受容体に少なくとも結合する多重特異性ポリペプチド構築物の形態の制約T細胞に係合する融合タンパク質を提供する。CD3、第2の抗原、および抑制性受容体に少なくとも結合する多重特異性ポリペプチド構築物の形態のT細胞に係合する融合タンパク質も、本開示において提供される。CD3、第2の抗原、共刺激受容体、および抑制性受容体に少なくとも結合する多重特異性ポリペプチド構築物の形態のT細胞に係合する融合タンパク質も、本開示において提供される。

【0065】

いくつかの態様において、本明細書中に提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、免疫グロブリンFc領域を含む第1の成分、（本明細書中で交換可能に使用される用語である抗CD3結合ドメインまたはCD3結合領域と本明細書中で呼ばれる）CD3に結合する少なくとも1つの結合ドメインの1コピーまたは複数コピーを含む第2の成分、および第1の成分と第2の成分とを接合するポリペプチドリンカーのようなリンカーを少なくとも含む。提供された多重特異性ポリペプチド構築物において、第1および第2の成分のうちの一方または両方は、抗原との結合によって係合した時、制約CD3結合領域がCD3に実質的に結合することができるようにする、少なくとも1つの抗原結合ドメインを含有している。いくつかの態様において、抗原は腫瘍関連抗原（TAA）である。さらに、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の第1および第2の成分のうちの一方または両方は、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）も含む。他の局面において、多重特異性ポリペプチド構築物の第1および第2の成分のうち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）も含む。提供される本開示の具体的な局面において、多重特異性ポリペプチド構築物の第1および第2の成分のうちの一方は、CRBRを含有しており、第1および第2の成分のうちの他方は、IRBRを含有している。いくつかの態様において、リンカーは非切断可能リンカーである。いくつかの態様において、リンカーは切断可能リンカーである。

【0066】

いくつかの態様において、提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域を含有している第1の成分がCD3結合領域を含有している第2の成分に対してN末端側にある配置を含む。そのような態様において、第1および第2の成分は、Fc領域の末端に対してC末端側にあるリンカーを介して接合されている。いくつかの態様において、抗原結合ドメインおよび/またはCRBRは、多重特異性ポリペプチド構築物のアミノ末端（N末端）領域に位置付けられている。いくつかの態様において、抗原結合ドメインおよび/またはCRBR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）領域に位置付けられている。いくつかの態様において、抗原結合ドメインおよび/またはCRBRは、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端領域およびC末端領域の両方に位置付けられている。本明細書中に提供される多重特異性ポリペプチド構築物の様々な配置は、図1に示される。

【0067】

いくつかの態様において、提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域を含有している第1の成分がCD3結合領域を含有している第2の成分に対してN末端側にある配置を含む。そのような態様において、第1および第2の成分は、Fc領域の末端に対してC末端側にあるリンカーを介して接合されている。いくつかの態様において、抗原結合ドメインおよび/またはIRBRは、多重特異性ポリペプチド構築物のアミノ末端（N末端）領域に位置付けられている。いくつかの態様において、抗原結合ドメインおよび/またはIRBR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）領域に位置付けられている。いくつかの態様において、抗原結合ドメインおよび/またはIRBRは、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端領域およびC末端領域の両方に位置付けられている。本明細書中に提供される多重特異性ポリペプチド構築物の様々な配置は、図18Aに示される。

10

【0068】

いくつかの態様において、提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域を含有している第1の成分がCD3結合領域を含有している第2の成分に対してN末端側にある配置を含む。そのような態様において、第1および第2の成分は、Fc領域の末端に対してC末端側にあるリンカーを介して接合されている。いくつかの態様において、抗原結合ドメインおよび/またはCRBRは、多重特異性ポリペプチド構築物のアミノ末端（N末端）領域に位置付けられており、抗原結合ドメインおよび/またはIRBR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）領域に位置付けられている。いくつかの態様において、抗原結合ドメインおよび/またはIRBRは、多重特異性ポリペプチド構築物のアミノ末端（N末端）領域に位置付けられており、抗原結合ドメインおよび/またはCRBR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）領域に位置付けられている。本明細書中に提供される多重特異性ポリペプチド構築物の様々な配置は、図18Bに示される。

20

【0069】

提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、抗原が抗原結合ドメインを介して結合した後にのみ、CD3に実質的に結合するため、そのような構築物は、制約されたT細胞係合活性を示す。これは、制約CD3に係合するタンパク質が、TAA陽性細胞に効率的に結合することができ、T細胞にはほとんどまたは全く結合しないことを証明する、本明細書中に提供された実施例および図面において例示される。この独特の特性は、制約CD3に係合するタンパク質が、末梢T細胞に結合することなく、TAAが存在する部位に分布することを可能にする。このフォーマットは、恒常的なCD3結合が禁止または排除される他のCD3に係合する多重特異性構築物とは異なっており、末梢T細胞結合を回避し、抗原結合ドメインによって認識される抗原が存在する部位への優先的な分布を可能にすることによって、有意な利益を提供する。例えば、実施例に示されるように、制約CD3に係合するフォーマットは、DART-Fcフォーマット（例えば、公開されたPCT出願番号WO2017/030926）と類似した効力を可能にするが、末梢T細胞との結合は、有意に減弱されている。さらに、他のCD3係合構築物は、抗原依存的なT細胞活性化を媒介するが、本明細書中に提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、抗原依存的なT細胞の結合および活性化の両方を媒介する。

30

【0070】

提供された多重特異性ポリペプチド構築物の制約されたT細胞に係合する活性は、いくつかの局面において、CD3結合領域のN末端側におけるFc領域の位置付けによる。いくつかの態様において、そのような位置付けは、CD3結合領域によるCD3結合を低下させ、減弱し、妨害し、かつ/または防止する。本明細書中に提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、抗原結合ドメインによる抗原結合の非存在下では、CD3結合およびT細胞活性化の低下したまたは排除された能力を示す。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によって媒介される抗原結合イベントの存在下では、CD3結合領域によるCD3に結合する能力が、大いに増強される。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の抗原結合ドメインによって媒介される抗原結合イベントの存在下では、T細胞を活性化する能力が、大いに増強される。多重特異性ポリペプチド構築物内の抗原結合ドメインによるその同族抗原の係合は、その後のT細胞係合をもたらす

40

50

、細胞傷害、サイトカイン放出、脱顆粒、および増殖のような抗原依存的なT細胞活性化を媒介する。いくつかの態様において、提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、免疫応答を増加させるため、例えば、細胞溶解性（または細胞傷害性）T細胞活性を含むT細胞活性を増強するため、使用され得る。免疫応答のモジュレーションは、いくつかの局面において、対象における疾患または状態を処置することができる。

【0071】

いくつかの態様において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3、1種または複数種の他の抗原、および1種または複数種の共刺激受容体に対する特異性を示す。いくつかの態様において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3、1種または複数種の他の抗原、および1種または複数種の抑制性受容体に対する特異性を示す。いくつかの態様において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3、1種または複数種の他の抗原、1種または複数種の共刺激受容体、および1種または複数種の抑制性受容体に対する特異性を示す。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、1種または複数種のTAAに結合することができる1つまたは複数の抗原結合ドメイン、例えば、1、2、または3つの抗原結合ドメイン、例えば、2つまたは3つの抗原結合ドメインを含有してよい。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、1種または複数種の共刺激受容体、例えば、2つまたは3つの共刺激受容体に結合することができる1つまたは複数の共刺激受容体結合領域（CRBR）、例えば、1、2、または3つのCRBRを含有してよい。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、1種または複数種の抑制性受容体、例えば、2つまたは3つの抑制性受容体に結合することができる1つまたは複数の抑制性受容体結合領域（IRBR）、例えば、1、2、または3つのIRBRを含有してよい。例示的な構築物のフォーマットは、図1～3および図18A～Bに示される。

【0072】

いくつかの態様において、1つまたは複数のCRBRは、T細胞の表面に発現された共刺激受容体に結合する。CRBRの標的となり得る共刺激受容体の非限定的な例には、例えば、41BB、OX40、CD27、GITR、CD28、ICOS、CD40L、BAFFR、BCMA、TACI、またはNKG2dが含まれる。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結合ドメイン（例えば、sdAb、scFv、もしくはFab）であるか、またはそれを含む。本明細書中に示されるように、提供された多重特異性ポリペプチド構築物におけるCRBRの存在は、CD3結合領域によるCD3の同時係合時に、T細胞活性を増加させるかまたは強化する。

【0073】

いくつかのケースにおいて、1つまたは複数のCRBRは、T細胞において恒常的に発現されていない共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、1つまたは複数のCRBRは、T細胞活性化時にアップレギュレートされるか、誘導されるか、または発現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、CRBRは、T細胞活性化時にアップレギュレートされるか、誘導されるか、または発現されるTNFRSFメンバーのような腫瘍壊死因子（TNF）受容体ファミリーのメンバーである共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、CRBRは、T細胞活性化時にアップレギュレートされるか、誘導されるか、または発現されるB7ファミリーメンバーのようなB7ファミリーのメンバーである共刺激受容体に結合する。活性化されたT細胞において、発現がアップレギュレートされるかまたは表面発現が誘導される、そのような共刺激受容体には、例えば、41BB、OX40、およびGITRが含まれる。いくつかの局面において、提供された多重特異性ポリペプチド構築物のCD3結合領域は、CD3結合領域がCD3に結合した時、T細胞活性化を誘導するかまたは増強し、それが、次に、そのような共刺激受容体の発現の増加またはアップレギュレーションをもたらす。そのような例において、CRBRの共刺激受容体、例えば、41BB、OX40、またはGITRとの結合は、多重特異性ポリペプチド構築物のCD3結合領域によるCD3の係合の後にも、増加するかまたは可能になり、それによって、提供された多重特異性構築物の標的細胞に対する共刺激活性が制御される。いくつかのケースにおいて、これは、全身ク

10

20

30

40

50

リアランスを加速し得る、休止T細胞または望まれない細胞のような末梢T細胞において発現されたCD3および/または共刺激受容体との結合による抗原「シンク (sink)」効果を回避することから、他のT細胞エンゲージャーの問題を解決することができる。いくつかの態様において、提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、二重特異性T細胞エンゲージャーのような、末梢細胞に結合することができる他のT細胞エンゲージャー、例えば、DART-Fcと比較して、増加した半減期および/または改善された薬物動態学的もしくは薬力学的な特性、例えば、よりよい腫瘍曝露を示す。

【0074】

いくつかの態様において、1つまたは複数のIRBRは、T細胞の表面上に発現された抑制性受容体に結合する。いくつかの局面において、抑制性受容体は、活性化されたT細胞において発現がアップレギュレートされるかまたは増加するものである。IRBRの標的となり得る抑制性受容体の非限定的な例には、例えば、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、TIM 3、またはLAG3が含まれる。いくつかの態様において、1つまたは複数のIRBRは、抑制性受容体に結合する結合ドメイン（例えば、sdAb、scFv、もしくはFab）であるか、またはそれを含む。

【0075】

いくつかの態様において、1つまたは複数のIRBRは、抑制性受容体に結合し、そのリガンドとの相互作用を阻止するかまたは抑制し、それによって、T細胞の抑制活性を阻止する。いくつかの態様において、IRBRは、PD-1に結合するPD-1結合ポリペプチドである。いくつかのケースにおいて、提供されたPD-1結合ポリペプチドは、PD-L1/L2とPD-1との間の相互作用を直接阻止するかまたは抑制する。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におけるIRBRの内含は、抑制性受容体とそのリガンドとの間、例えば、PD-L1および/またはPD-L2とPD-1との間の相互作用を抑制するかまたは低下させ、それによって、免疫応答をモジュレートする。抑制シグナルの伝達は、免疫細胞応答のダウンモジュレーション（およびその結果の免疫応答全体のダウンモジュレーション）をもたらし、免疫細胞における抑制シグナルの阻止は、免疫細胞応答のアップモジュレーション（およびその結果の免疫応答のアップモジュレーション）をもたらす。いくつかのケースにおいて、免疫応答の増強によるモジュレーションは、癌のような、免疫応答が抑制されるある種の疾患または状態を処置するために使用され得る。一般に、抑制性相互作用を阻止する能力は、CD3結合領域がT細胞上のCD3に結合しかつ/または抗原結合ドメインがTAAに結合した時に、免疫シナプスおよび/または腫瘍微小環境において起こる。具体的な態様において、提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、T細胞のような細胞における抑制性受容体によって媒介される抑制シグナルを低下させるか、抑制するか、または抑止する。

【0076】

いくつかの態様において、1つまたは複数の抗原結合ドメインは、腫瘍細胞または腫瘍微小環境の細胞の抗原に結合する。いくつかの局面において、提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、腫瘍または癌に対するT細胞活性、例えば、細胞傷害活性のような免疫応答を増加させるために使用され得る。いくつかの態様において、提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、対象における腫瘍または癌を処置するために使用され得る。

【0077】

いくつかの態様において、1つまたは複数の抗原結合ドメインは、同一の抗原に結合する。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、同一の抗原の異なるエпитープに結合する複数の抗原結合ドメインを含む。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、1種または複数種の異なる抗原に結合する複数の抗原結合ドメインを含む。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、同一の抗原の異なるエпитープに結合する複数の抗原結合ドメインを含み、1種または複数種の異なる抗原に結合する付加的な抗原結合ドメインも含む。いくつかの例において、提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、例えば、少なくとも第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインを通して、1種または複数種のTAAの多価係合を提供する。例えば、い

10

20

30

40

50

くつかの態様において、ポリペプチド構築物は、第1の抗原結合シングルドメイン抗体（sdAb）および第2の抗原結合sdAbを少なくとも含む。いくつかの局面において、第1および第2の抗原結合ドメインは、同一の抗原に結合する。

【0078】

さらに、いくつかの局面において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物のCD3結合領域は、Fc領域の存在によって制約されているか、またはその他の方法で阻止されかつ/もしくは抑制されているため、これらの構築物は、CD3を介したT細胞の結合が末梢血中では起こらないかまたは低下することを確実にする。従って、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、多数の利点を提供する。いくつかの局面において、これらの構築物は、全てのT細胞に結合することによって引き起こされるシンク効果を制限する。いくつかの局面において、これらの構築物は、全身毒性を低下させる。

10

【0079】

いくつかの態様において、本開示の提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、例えば、腫瘍関連抗原（TAA）発現の部位のような、対象における所望の部位への調節された体内分布を可能にする。TAA発現の部位には、例えば、腫瘍および周囲の腫瘍微小環境が含まれる。

【0080】

いくつかの態様において、本明細書中に提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3に結合し、その後、T細胞を活性化する能力に関して、2種の状態で存在する：（1）抗原結合ドメインのうちのいずれかまたは全ての結合が存在しない時には、CD3結合が制約され、T細胞相互作用が除去されるかまたは低下するような「不活性」状態が起こり、（2）抗原結合ドメインのうちのいずれかまたは全てが抗原に結合した時には、CD3結合領域がCD3に結合することができ、T細胞相互作用が可能になるような「活性」状態が起こる。

20

【0081】

いくつかの態様において、Fc領域は、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、非切断可能リンカーを介して、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、切断可能リンカーまたはその他の方法で不安定なリンカーを介して、CD3結合領域に連結される。

【0082】

いくつかの局面において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、切断の非存在下、例えば、タンパク質分解の非存在下で、治療効力を可能にする。いくつかの態様において、リンカーは非切断可能リンカーである。

30

【0083】

いくつかの態様において、Fc領域およびCD3結合領域は、プロテアーゼの存在下で特異的に切断され得るリンカーのような切断可能リンカーによって連結される。いくつかの局面において、増強されたCD3結合が、切断可能リンカーの切断の後に起こる。いくつかのそのような局面において、「活性」状態は、いくつかの機序を介して、例えば、CD3結合領域とFc領域とを接合するリンカーの切断を介して、さらに増幅され得る。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、プロテアーゼのための基質認識部位を含有しているリンカーである。Fc領域とCD3結合領域とが切断可能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、リンカー内の切断の後に、増強されたCD3結合が起こり得る。

40

【0084】

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領域は単量体Fc領域である。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のFc領域は、FcγRと相互作用することができ、自然免疫エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞障害（ADCC）および抗体依存性細胞貪食（ADCP）を媒介することができる。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のFc領域は、補体タンパク質、即ち、C1qと相互作用することができ、補体依存性細胞傷害を媒介することができる。従って、いくつかの

50

局面において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、自然免疫エフェクターおよびT細胞を含む複数の免疫エフェクター機序を可能にする。

【0085】

いくつかの態様において、リンカーは切断可能リンカーである。Fc領域とCD3結合領域とが切断可能リンカーによって機能的に連結されている、いくつかの態様において、Fc領域とCD3結合領域との間のリンカーの切断は、多重特異性ポリペプチド構築物を第1の成分と第2の成分とに分離することができる。多重特異性ポリペプチド構築物の組成によって、第1および第2の成分は、異なる機能性を有してよい。いくつかの態様において、Fc領域は、ADCC機能、CDC機能、またはADCP機能のような1種または複数種のエフェクター機能を示す領域である。そのような例において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、自己増幅系を作製するために使用され得る。例えば、多重特異性構築物は、以下のように使用され得る：TAAターゲティングおよびFc領域のCD16結合の後にNK細胞によって媒介されるADCCが、細胞外タンパク質分解が可能であるグランザイムBの放出、および多重特異性ポリペプチド構築物の第1の成分と第2の成分との間のリンカーの切断をもたらす。

【0086】

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、多重特異性ポリペプチド構築物のタンパク質分解による活性化が、生物学的活性を各々有する2種の成分を産生する、二重エフェクター機能を有するツースインワン（two-in-one）治療基を提供する。本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、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のような、Fcによって媒介されるエフェクター機能を提供することができる。

【0087】

制約CD3係合構築物は、任意のTAA結合ドメインと共に使用可能であり、末梢T細胞との相互作用を回避し、強力なTAA依存的なT細胞細胞傷害を媒介することによって、腫瘍または腫瘍微小環境におけるよりよい治療的曝露を可能にすることが企図される。FcとCD3結合ドメインの成分との間のプロテアーゼによって切断可能なリンカーの組み入れは、CD3結合ドメインの完全な曝露を可能にすることによって、T細胞活性化能力の増幅を可能にする。含まれる具体的なリンカーに依って、増幅工程は、腫瘍関連プロテアーゼによって媒介されてもよいし、または抗原依存的なT細胞活性化の後に放出されるグランザイムによって媒介されてもよい。腫瘍プロテアーゼによって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。一方、グランザイムBによって切断可能なリンカーが含まれる場合、増幅は、抗原依存的な活性化の後に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（effector-enabled）Fcが構築物に含まれるケースにおいて、ADCC機序を通して起こる増幅が、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。

【0088】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、腫瘍微小環境において産生されるプロテアーゼ、および/または抗原結合ドメインのTAAとの結合を介した腫瘍微小環境におけるCD3結合領域のCD3との初期結合によって誘導され得るようなT細胞活性化時にT細胞によって産生もしくは分泌され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、プロテアーゼは、グランザイムBである。いくつかの局面において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc免疫グロブリンポリペプチドより下の位置で多重特異性ポリペプチド構築物内のリンカーを切断し、それによって、いくつかのケースにおいて、異なるエフェクター細胞係合を有する、2種の治療活性タンパク質を生成する、腫瘍微小環境内のプロテアーゼおよび/またはグランザイムBの能力を活用する。いくつかの局面において、切断可能リンカーの切断時に、切断された第1の部分または成分は、Fcエフェクター機能、および、例えば、TAAのような第1の抗原の第1の抗原結合ドメインを介した2価ターゲティングを保持し、第2の部分または成分は、Fc領域からのCD3結合領域の分離がCD3結合を可能にするため、T細胞係合の能力を保持する。切断された第2の部分または成分

は、いくつかのケースにおいて、第2の抗原結合ドメインを介した、2価結合であり得るTAA結合の能力も保持する。

【0089】

本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、切断可能リンカーを切断するプロテアーゼが、腫瘍偏性である必要はない（例えば、腫瘍部位および/または腫瘍環境においてのみ異なって発現される必要はない）ことを確実にするため、設計されている。むしろ、これらの多重特異性ポリペプチド構築物は、プロテアーゼがTAAと同一の位置に存在することのみを必要とする。これらの構築物の結合価は、腫瘍および/または腫瘍微小環境における体内分布および保持を駆動するであろう。

【0090】

いくつかの態様において、第2の部分または成分は、TAAが存在しない限り、T細胞の活性化が起こらないよう、CD3に対して1価であるCD3結合領域を含有している。いくつかの局面において、多価ポリペプチド構築物が切断可能リンカーを含有している場合、切断された第2の部分または成分は、TAA依存的なT細胞媒介細胞傷害を可能にする。いくつかのケースにおいて、切断された第2の部分または成分は、FcRn相互作用が起こらないことを確実にする。さらに、切断された第2の部分または成分は、十分に小さいサイズ、例えば、わずかおよそ50kDaであり、そのことは、何らかの理由のため、切断された第2の部分もしくは成分が腫瘍部位の外部に分布した場合、および/または腫瘍部位の外部で異常に切断された場合、迅速なクリアランスを確実にするであろう。

【0091】

いくつかの態様において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、T細胞およびNK細胞によって媒介される細胞傷害が同時に起こることを可能にする。いくつかのケースにおいて、そのような活性は、所定のTAAの異なるかつ/または競合しないエピトープを標的とすることができる、第1の抗原結合ドメイン、例えば、第1の抗TAA抗原結合ドメインと、第2の抗原結合ドメイン、例えば、第2の抗TAA抗原結合ドメインとを含有している多重特異性ポリペプチド構築物において起こり得る。

【0092】

いくつかの局面において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、現在の二重特異性治療薬と比べて多数の利点を提供する。本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、従来の治療用抗体より小さく、例えば、150kDaに対して125kDaであり、そのことは、標的、例えば、腫瘍へのよりよい浸透を可能にするであろう。第1に、多重特異性ポリペプチド構築物全体のサイズは、未切断構築物についての長い半減期を提供し、構築物の切断時に、切断された第2の部分または成分は、短い半減期を確実にするために十分に小さくなるであろう。いくつかの局面において、CD3結合領域によるCD3結合は、CD3係合が起こる前のTAA係合に依存するため、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、低下した全身毒性または腫瘍外および/もしくは腫瘍微小環境外の区域の毒性を示す。いくつかのケースにおいて、腫瘍環境のプロテアーゼに特異的な切断可能リンカーの内含は、タンパク質分解による活性化およびTAA係合が、CD3係合を増幅するかまたは増強するまで、多重特異性構築物によるCD3結合を低下させる。さらに、提供された多重特異性ポリペプチド構築物におけるCRBRの付加的な存在は、腫瘍および/または腫瘍微小環境のような所望の部位または位置におけるT細胞活性をさらに増加させるかまたは増強するため、抗原依存的な特異的な共刺激シグナリングを提供する。同様に、提供された多重特異性ポリペプチド構築物へのIRBRの内含も、チェックポイント抑制シグナルを除去するかまたは阻止することによって、T細胞活性を増強することができる。

【0093】

本明細書中に引用された刊行物および特許文書は、全て、そのような刊行物または文書が各々参照によって本明細書中に組み入れられると具体的に個々に示されたかのごとく、参照によって本明細書中に組み入れられる。刊行物および特許文書の引用は、何かが関連先行技術であることの承認として意図されず、その内容または日付に関する承認を構成するものでもない。本発明が説明文書によって記載されたが、当業者は、本発明が、多様

10

20

30

40

50

な態様において実施され得ること、上記の説明および下記の例が、後述の特許請求の範囲を例示するためのものであって限定するためのものではないことを認識するであろう。

【0094】

I. 定義

他に定義されない限り、本開示に関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。エンティティ（「a」 entity）またはエンティティ（「an」 entity）という用語は、そのエンティティの1つまたは複数をさす。例えば、化合物（a compound）とは、1種または複数種の化合物をさす。従って、「（a）」、「（an）」、「1または複数」、および「少なくとも1」という用語は、交換可能に使用され得る。さらに、前後関係によって他のことが必要とされない限り、単数形は、複数を含み、複数形は、単数を含むものとする。一般に、本明細書中に記載された細胞および組織の培養、分子生物学、タンパク質およびオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの化学、ならびにハイブリダイゼーションに関連して利用される命名法、およびそれらの技術は、当技術分野において周知であり一般的に使用されているものである。標準的な技術が、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織の培養および形質転換（例えば、電気穿孔、リポフェクション）のために使用される。酵素反応および精製技術は、製造業者の仕様書に従って、または当技術分野において一般的に達成されるように、または本明細書中に記載されたように実施される。上記の技術および手法は、一般に、当技術分野において周知の従来の方法に従って、本明細書中に引用され記述される様々な一般的な参照およびより具体的な参照に記載されたように、実施される。例えば、Sa

10

20

【0095】

本開示に従って利用されるように、以下の用語は、他に示されない限り、以下の意味を有すると理解されるべきである。

【0096】

本明細書中で使用されるように、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン（Ig）分子の抗原結合部分または断片、即ち、抗原と特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含有している分子をさす。抗体という用語には、完全なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のみならず、dAb、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv）、単鎖（scFv）、またはシングルドメイン抗体（sdAb）も包含される。典型的には、「抗原結合断片」は、関心対象の抗原の少なくとも1つのエピトープに結合する、免疫グロブリンの重鎖および/または軽鎖の少なくとも1つのCDRを含有している。これに関して、抗原結合断片は、抗原に結合する抗体に由来する可変重鎖（VH）配列および可変軽鎖（VL）配列の1、2、3、4、5、または6つ全てのCDRを含んでいてよく、一般に、VHおよびVLを含有している抗体については、6つのCDR（重鎖および軽鎖の各々についての「CDR1」、「CDR2」、および「CDR3」）、または単一の可変ドメインを含有している抗体については、3つのCDRを含んでいてよい。抗原結合断片には、シングルドメイン抗体、例えば、VHのみを含有しているもの、またはVLのみを含有しているもの、例えば、V_HH、V_{NAR}、改変型V_Hドメイン、もしくは改変型V_Kドメインが含まれる。

30

40

【0097】

基本の抗体構造単位は、四量体を含むことが公知である。各四量体は、同一の2対のポリペプチド鎖から構成され、各対が、1本の「軽鎖」（約25kDa）および1本の「重鎖」（約50〜70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識を主として担う、約100〜110アミノ酸またはそれ以上の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主として担う定常領域を定義する。一般に、ヒトから入手された抗体分子は、

50

クラスIgG、IgM、IgA、IgE、およびIgDのうちのいずれかに関し、それらは、分子内に存在する重鎖の性質によって相互に異なる。ある種のクラスは、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、およびその他のようなサブクラスを有する。さらに、ヒトにおいて、軽鎖は、κ鎖またはλ鎖であり得る。

【0098】

「モノクローナル抗体」(mAb)または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、本明細書中で使用されるように、独特の軽鎖遺伝子産物および独特の重鎖遺伝子産物からなる抗体分子の1分子種のみを含有している抗体分子の集団をさす。具体的には、モノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)は、集団の全ての分子において同一である。MAbは、独特の結合親和性を特徴とする、抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位を含有している。

10

【0099】

本明細書中で使用されるように、「エピトープ」という用語には、抗体、抗体断片、またはその他の結合ドメインによって標的とされる抗原の特定の部分が含まれる。「エピトープ」という用語には、特異的な結合が差し向けられる任意のタンパク質領域が含まれる。「エピトープ」という用語には、抗体または抗原結合断片のような結合分子との特異的な結合に関与する任意のタンパク質決定基が含まれる。エピトープ決定基は、一般的に、アミノ酸または糖側鎖のような分子の化学的活性を有する表面基からなり、一般的に、特異的な三次元構造的特徴および特異的な電荷特徴を有する。例えば、抗体は、ポリペプチドのN末端、中央、またはC末端のペプチドに対して産生され得る。さらに、抗体は、ポリペプチドの直鎖状または不連続のエピトープに対して産生され得る。

20

【0100】

本明細書中で使用されるように、「特異的な結合」および「特異的に結合する」という用語は、抗体または抗原結合断片のような結合分子の、タンパク質および/または高分子の複雑な混合物の中の抗原に優先的に結合する能力である。結合分子は、別の細胞または標的抗原より、高頻度に、迅速に、長期間、および/または大きい親和性で、特定の細胞または標的抗原と反応するかまたは会合する場合、「特異的な結合」または「優先的な結合」を示すと言われる。結合分子は、他の物質より、大きい親和性、アビディティで、迅速に、かつ/または長期間、標的に結合する場合、その標的に特異的に結合するかまたは優先的に結合する。いくつかの局面において、特異的な結合とは、免疫グロブリン分子と、免疫グロブリンが特異的な抗原との間に起こる型の非共有結合性の相互作用をさすことができる。特異的な結合または優先的な結合は、排他的な結合を(含む得るが)必ずしも必要としないことが理解される。様々な公知の方法が、結合を定量化するかまたは評価するために使用され得る。結合相互作用の強度または親和性は、相互作用の解離定数(K_d)によって表され得、より小さい K_d は、より大きい親和性を表す。一つのそのような方法は、抗原結合部位/抗原複合体の形成および解離の速度の測定を含み、それらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、および両方向の速度に等しく影響を及ぼす幾何学的パラメーターに依る。従って、「結合速度定数」(K_{on})および「解離速度定数」(K_{off})の両方が、濃度ならびに会合および解離の実際の速度の計算によって決定され得る(Nature 361: 186-87(1993)を参照すること)。 K_{off}/K_{on} の比は、親和性と無関係の全てのパラメーターの相殺を可能にし、解離定数 K_d と等しい(一般に、Davies et al.(1990)Annual Rev Biochem 59:439-473を参照すること)。抗体または抗原結合断片のような結合分子は、当業者に公知のラジオリガンド結合アッセイまたは類似のアッセイのようなアッセイによって測定される結合定数(K_d)が、 $\leq 1\mu M$ 、例えば、いくつかの態様において、 $\leq 100nM$ 、いくつかの態様において、 $\leq 10nM$ 、いくつかの態様において、 $\leq 100pM \sim 約1pM$ である時、特異的に結合すると言われる。

30

40

【0101】

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書中で交換可能に使用され、ペプチド結合によって連結された2つ以上のアミノ酸の分子鎖をさす。この用語には、ポリペプチドの翻訳後修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化等が含まれ

50

る。この用語には、公知のタンパク質工学技術を使用して合成されるかまたは組換え発現され得る、1つまたは複数のアミノ酸類似体または非標準もしくは非天然のアミノ酸を含む分子も含まれる。さらに、タンパク質は、誘導体化され得る。タンパク質は、単一のポリペプチド鎖であってもよいし、または、例えば、鎖間ジスルフィド結合によって相互に共有結合した少なくとも2本のポリペプチド鎖の多量体（二量体）であってもよい。従って、単量体、二量体、およびより高次の多量体ポリペプチドが、定義された用語の範囲内に含まれる。多量体ポリペプチドは、（同一のポリペプチド鎖の）ホモ多量体であってもよいし、または（同一ではないポリペプチド鎖の）ヘテロ多量体であってもよい。

【0102】

本明細書中で言及される「単離されたタンパク質」という用語は、対象のタンパク質が、（1）自然界において天然に見出される他のタンパク質を少なくとも一部含まないか、（2）同一起源に由来する、例えば、同一種に由来する他のタンパク質を本質的に含まないか、（3）異なる種に由来する細胞によって発現されるか、（4）自然界において会合しているポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、もしくはその他の材料の少なくとも約50%から分離されているか、（5）「単離されたタンパク質」が自然界において会合しているタンパク質の一部と（共有結合性もしくは非共有結合性の相互作用によって）会合していないか、（6）自然界において会合していないポリペプチドと（共有結合性もしく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か、または（7）自然界において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、もしくはその他のRNAによってコードされてもよいし、合成起源であってもよいし、またはそれらの組み合わせであってもよい。ある種の態様において、単離されたタンパク質は、その使用（治療、診断、予防、研究、またはその他）に干渉するであろう、その天然環境において見出されるタンパク質またはポリペプチドまたはその他の混入物質を実質的に含まない。

【0103】

「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書中で言及されるように、少なくとも10塩基長のヌクレオチド、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドのいずれか、またはいずれかの型のヌクレオチドの修飾型を意味する。その用語には、DNAの一本鎖型および二本鎖型が含まれる。本開示によるポリヌクレオチドには、本明細書中に示される多重特異性ポリペプチド構築物のポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。

【0104】

「単離されたポリヌクレオチド」という用語は、本明細書中で使用されるように、その起源のため、（1）自然界において見出されるポリヌクレオチドの全部または一部に関連していないか、（2）自然界において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か、または（3）より大きい配列の一部として自然界において存在しない、ゲノム、cDNA、もしくは合成、またはそれらの組み合わせに由来するポリヌクレオチドを意味するものとする。

【0105】

「機能的に連結された」という用語は、本明細書中で使用されるように、そのように記載された成分の位置が、意図された様式で機能することを許容する関係にあることをさす。コード配列に「機能的に連結された」調節配列は、コード配列の発現が調節配列と適合性の条件の下で達成されるようライゲートされている。

【0106】

ポリペプチドに適用される「実質的同一性」という用語は、2種のペプチド配列が、デフォルトギャップウェイトを使用して、プログラムGAPまたはBESTFIT等によって、最適に整列化された時、少なくとも80パーセントの配列同一性、例えば、いくつかの態様において、少なくとも90パーセントの配列同一性、いくつかの態様において、少なくとも95パーセントの配列同一性、いくつかの態様において、少なくとも99パーセントの配列同一性を共有することを意味する。具体的には、保存的アミノ酸置換が企図される。保存的置換とは、側鎖が関連しているアミノ酸のファミリーの内部で起こるものである。遺伝学的

にコードされたアミノ酸は、一般に、以下のファミリーに分類される：（１）酸性アミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸であり；（２）塩基性アミノ酸は、リジン、アルギニン、ヒスチジンであり；（３）非極性アミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンであり、（４）非荷電極性アミノ酸は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシンである。親水性アミノ酸には、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、セリン、およびトレオニンが含まれる。疎水性アミノ酸には、アラニン、システイン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、およびバリンが含まれる。アミノ酸の他のファミリーには、（i）脂肪族ヒドロキシファミリーであるセリンおよびトレオニン；（ii）アミド含有ファミリーであるアスパラギンおよびグルタミン；（iii）脂肪族ファミリーであるアラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン；ならびに（iv）芳香族ファミリーであるフェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンが含まれる。例えば、特に、置換がフレームワーク部位内のアミノ酸を含まない場合には、ロイシンとイソロイシンもしくはバリン、アスパラギン酸とグルタミン酸、トレオニンとセリンの孤立性の置換、または構造的に関連するアミノ酸同士の類似した置換は、得られた分子の結合または特性に大きい効果を及ぼさないであろうと予想することが合理的である。アミノ酸変化が機能性ペプチドをもたらすか否かは、ポリペプチド誘導体の特異的活性をアッセイすることによって容易に決定され得る。アッセイは、本明細書中に詳細に記載される。

【0107】

「作用物質」という用語は、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生物学的高分子、または生物学的材料から作製された抽出物を示すために本明細書中で使用される。

【0108】

本明細書中で使用されるように、「標識」または「標識された」という用語は、例えば、ポリペプチドへの放射標識されたアミノ酸の組み入れ、またはマーキングされたアビジン（例えば、光学的方法もしくは熱量測定法によって検出され得る蛍光マーカースしくは酵素活性を含有してい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基の付着による、検出可能マーカースしくは組み入れをさす。ある種の状況において、標識またはマーカースしくは、治療用であってよい。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法が、当技術分野において公知であり、使用され得る。ポリペプチドのための標識の例には、放射性同位体または放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、蛍光標識（例えば、フルオロフォア、ローダミン、ランタニドリン光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、p-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光、ビオチニル基、二次レポーターによって認識される予め決定されたポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体のための結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、標識は、可能性のある立体障害を低下させるため、様々な長さのスペーサーアームによって付着させられる。

【0109】

「腫瘍関連抗原」または「TAA」という用語は、本明細書中で使用されるように、主として、哺乳動物対象の腫瘍細胞上に存在し、哺乳動物対象の正常細胞上には一般に見出されない対比構造（counter-structure）をさす。腫瘍特異抗原は、腫瘍細胞に排他的である必要はなく、提供された多重特異性ポリペプチド構築物のような抗腫瘍治療薬によって標的とされ、哺乳動物の腫瘍の効果に対する防止または処置を提供することができるよう、特定の哺乳動物の腫瘍関連抗原を有する細胞の割合が十分に高いか、または腫瘍の表面上の腫瘍関連抗原のレベルが十分に高い。いくつかの態様において、腫瘍を有する哺乳動物に由来する細胞の無作為統計試料において、TAAを示す細胞の少なくとも50%が、癌細胞である。他の態様において、TAAを示す細胞の少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、または99%が、癌細胞である。

【0110】

本明細書中で使用されるように、組成物とは、2種以上の生成物、物質、または化合物、例えば、細胞の任意の混合物をさす。それは、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り得る。

【0111】

「薬学的組成物」という用語は、哺乳動物対象、しばしば、ヒトにおいて薬学的に使用するために適当な組成物をさす。薬学的組成物は、典型的には、有効量の活性な作用物質（例えば、多重特異性ポリペプチド構築物）と、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。

10

【0112】

疾患または障害の「処置すること」、「処置」、または「治療」という用語は、本明細書中で使用されるように、単独で、または本明細書中に記載される別の化合物と組み合わせて、本開示の薬学的組成物を投与することによる、臨床的または診断的な症状の減少、停止、または排除によって証拠付けられる、疾患または障害の進行の緩徐化、中止、または逆転を意味する。「処置すること」、「処置」、または「治療」とは、急性もしくは慢性的の疾患もしくは障害における症状の重症度の減少、または再発率の減少も意味する。本明細書中で使用されるように、癌に関して、癌の「処置」、または「抑制すること」、「抑制すること」、もしくは「抑制」という用語は、限定されるわけではないが、固形癌効果判定基準（Response Evaluation Criteria for Solid Tumors）（RECIST）のような標準的な基準によって測定される、腫瘍成長の速度の統計的に有意な減少、腫瘍成長の停止、もしくは腫瘍のサイズ、量、代謝活性、もしくは体積の低下、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のうちの少なくとも一つをさす。疾患または障害の「防止すること」、「予防」、または「防止」とは、疾患もしくは障害の発生もしくは発症、もしくは疾患もしくは障害の症状のうちの一部もしくは全部を防止するための、または疾患もしくは障害の発症の可能性を減らすための、単独の、または別の化合物と組み合わせられた、薬学的組成物の投与をさす。

20

【0113】

「有効量」または「治療的に有効な量」という用語は、単独で（即ち、単独治療として）、または付加的な治療剤と組み合わせられて、患者へ投与された時に、例えば、疾患の症状および/または原因を寛解させるかまたは排除することによって、疾患進行の統計的に有意な減少を与える、組成物の量および/または濃度をさす。有効量は、疾患もしくは障害に関連した少なくとも一つの症状もしくは生物学的な応答もしくは効果を軽減するか、減らすか、もしくは緩和するか、疾患もしくは障害の進行を防止するか、または患者の身体機能を改善する量であり得る。

30

【0114】

本明細書中で使用されるように、「実質的に純粋な」とは、ある物質種が、存在する優勢な種である（即ち、モルベースで、組成物中の他の個々の種より豊富に存在する）ことを意味し、実質的に精製された画分とは、ある物質種が、存在する全高分子種の（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。一般に、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在する全高分子種の約80パーセント超、例えば、いくつかの態様において、約85%、90%、95%、および99%超を構成するであろう。いくつかの態様において、物質種は、組成物が単一の高分子種から本質的になる（従来の検出法によって、混入種が組成物中に検出され得ない）本質的均質にまで精製される。

40

【0115】

本明細書中で使用されるように、「対象」は、ヒトまたはその他の動物のような哺乳動物であり、典型的には、ヒトである。対象、例えば、患者には、疾患または障害を処置するための処置を必要とする者が含まれる。患者という用語には、ヒトおよび動物対象が含まれる。対象は、男性であってもよいしまたは女性であってもよく、乳児期、若年期、青年期、成人期、および老年期の対象を含む、任意の適当な年齢であり得る。

50

【0116】

本明細書中のその他の化学用語は、McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)) によって例示されるような、当技術分野における慣例的な使用法に従って使用される。

【0117】

「約」という用語は、本明細書中で使用されるように、当業者に容易に公知の、それぞれの値についての一般的な誤差範囲をさす。本明細書中の「約」が付く値またはパラメーターへの言及は、その値またはパラメーター自体に関する態様を含む（記載する）。例えば、「約X」に言及する記載には、「X」の記載が含まれる。

【0118】

II. 多重特異性ポリペプチド構築物

免疫グロブリンFc領域を含有している第1の成分およびCD3結合領域を含む第2の成分を含有している多重特異性ポリペプチド構築物であって、第1および第2の成分がリンカーによってカップリングされており、Fc領域がCD3結合領域に対してN末端側に位置付けられており；第1および第2の成分のうち的一方または両方が（1）腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインおよび（2）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、多重特異性ポリペプチド構築物が、本明細書中に提供される。免疫グロブリンFc領域を含有している第1の成分およびCD3結合領域を含む第2の成分を含有している多重特異性ポリペプチド構築物であって、第1および第2の成分がリンカーによってカップリングされており、Fc領域がCD3結合領域に対してN末端側に位置付けられており；第1および第2の成分のうち的一方または両方が（1）腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインおよび（2）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、多重特異性ポリペプチド構築物も、本明細書中に提供される。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、TAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、TAAに結合する第1の抗原結合ドメインおよびTAAに結合する第2の抗原結合ドメインを少なくとも含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、共刺激受容体に結合する少なくとも1つのCRBRおよび/または抑制性受容体に結合する少なくとも1つのIRBRを含有している。本明細書中に提供された多重特異性構築物の例示的なフォーマットは、図1〜3および図18Aおよび18Bに示される。

【0119】

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、N末端からC末端へ順に、免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3 ϵ ）に結合するCD3結合領域；および一方がTAAに結合する抗原結合ドメインであり、他方が共刺激受容体に結合するCRBRである、少なくとも2つの結合ドメインを、含有している。

【0120】

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、N末端からC末端へ順に、一方が腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインであり、他方が共刺激受容体に結合するCRBRである、少なくとも2つの結合ドメイン；免疫グロブリンFc領域；リンカー；およびCD3（CD3 ϵ ）に結合するCD3結合領域を含、有している。

【0121】

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、N末端からC末端へ順に、免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3 ϵ ）に結合するCD3結合領域；および一方がTAAに結合する抗原結合ドメインであり、他方が抑制性受容体に結合するIRBRである、少なくとも2つの結合ドメインを、含有している。

【0122】

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、N末端からC末端へ順に、免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3 ϵ ）に結合するCD3結合領域；および一方がTAAに結合する抗原結合ドメインであり、他方が抑制性受容体に結合するIRBRである、少なくとも2つの結合ドメインを、含有している。

【0123】

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、N末端からC末端へ順に、一方が腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインであり、他方が抑制性受容体に結合するIRBRである、少なくとも2つの結合ドメイン；免疫グロブリンFc領域；リンカー；およびCD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域を、含有している。

【0124】

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、N末端からC末端へ順に、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインまたは共刺激受容体に結合するCRBR；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；およびTAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインまたは共刺激受容体に結合するCRBRのうちの他方を、含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端部分またはC末端部分は、TAAに結合する1つの抗原結合ドメインを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端部分またはC末端部分は、TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含有している。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の各々は、同一である。いくつかの態様において、少なくとも第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、または同一のTAAの異なるエピトープに結合する。

【0125】

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、N末端からC末端へ順に、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインまたは抑制性受容体に結合するIRBR；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；およびTAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインまたは抑制性受容体に結合するIRBRのうちの他方を、含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端部分またはC末端部分は、TAAに結合する1つの抗原結合ドメインを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端部分またはC末端部分は、TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含有している。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の各々は、同一である。いくつかの態様において、少なくとも第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、または同一のTAAの異なるエピトープに結合する。

【0126】

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、N末端からC末端へ順に、共刺激受容体に結合するCRBR；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；およびTAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを、含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のC末端部分は、TAAに結合する1つの抗原結合ドメインを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のC末端部分は、TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含有している。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の各々は、同一である。いくつかの態様において、少なくとも第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、または同一のTAAの異なるエピトープに結合する。

【0127】

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、N末端からC末端へ順に、抑制性受容体に結合するIRBR；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；およびTAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを、含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のC末端部分は、TAAに結合する1つの抗原結合ドメインを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のC末端部分は、TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含有している。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の各々は、同一である。いくつかの態様において、少なくとも第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、または同一のTAAの異なるエピトープに結合する。

【0128】

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、N末端からC末端へ順に、TAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメイン；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3 ϵ ）に結合するCD3結合領域；および共刺激受容体に結合するCRBRを、含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端部分は、TAAに結合する1つの抗原結合ドメインを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端部分は、TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含有している。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の各々は、同一である。いくつかの態様において、少なくとも第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、または同一のTAAの異なるエピトープに結合する。

【0129】

10

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、N末端からC末端へ順に、TAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメイン；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3 ϵ ）に結合するCD3結合領域；および抑制性受容体に結合するIRBRを、含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端部分は、TAAに結合する1つの抗原結合ドメインを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端部分は、TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含有している。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の各々は、同一である。いくつかの態様において、少なくとも第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、または同一のTAAの異なるエピトープに結合する。

【0130】

20

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、N末端からC末端へ順に、TAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメイン；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3 ϵ ）に結合するCD3結合領域；および一方がTAAに結合する抗原結合ドメインであり、他方が共刺激受容体に結合するCRBRである、少なくとも2つの結合ドメインを、含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のC末端部分は、TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含有している。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の各々は、同一である。いくつかの態様において、少なくとも第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、または同一のTAAの異なるエピトープに結合する。

【0131】

30

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、N末端からC末端へ順に、TAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメイン；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3 ϵ ）に結合するCD3結合領域；および一方がTAAに結合する抗原結合ドメインであり、他方が抑制性受容体に結合するIRBRである、少なくとも2つの結合ドメインを、含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のC末端部分は、TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含有している。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の各々は、同一である。いくつかの態様において、少なくとも第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、または同一のTAAの異なるエピトープに結合する。

【0132】

40

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、N末端からC末端へ順に、一方が腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインであり、他方が共刺激受容体に結合するCRBRである、少なくとも2つの結合ドメイン；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3 ϵ ）に結合するCD3結合領域；およびTAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを、含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端部分は、TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含有している。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の各々は、同一である。いくつかの態様において、少なくとも第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、または同一のTAAの異なるエピトープに結合する。

【0133】

50

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、N末端からC末端へ順に、一方が腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインであり、他方が抑制性受容体に結合するIRBRである、少なくとも2つの結合ドメイン；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；およびTAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを、含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端部分は、TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含有している。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の各々は、同一である。いくつかの態様において、少なくとも第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、または同一のTAAの異なるエピトープに結合する。

【0134】

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、N末端からC末端へ順に、一方が腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインであり、他方が共刺激受容体に結合するCRBRである、少なくとも2つの結合ドメイン；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；および一方がTAAに結合する抗原結合ドメインであり、他方が抑制性受容体に結合するIRBRである、少なくとも2つの結合ドメインを、含有している。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の各々は、同一である。いくつかの態様において、少なくとも第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、または同一のTAAの異なるエピトープに結合する。

【0135】

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、N末端からC末端へ順に、一方が腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインであり、他方が抑制性受容体に結合するIRBRである、少なくとも2つの結合ドメイン；免疫グロブリンFc領域；リンカー；CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；および一方がTAAに結合する抗原結合ドメインであり、他方が共刺激受容体に結合するCRBRである、少なくとも2つの結合ドメインを、含有している。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の各々は、同一である。いくつかの態様において、少なくとも第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、または同一のTAAの異なるエピトープに結合する。

【0136】

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、二量体であり、二量体化は、2本のポリペプチド鎖の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、相互に共有結合している。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。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、ホモ二量体Fc領域を含有しており、いくつかのケースにおいて、多重特異性ポリペプチド構築物の両方のポリペプチド鎖は、同一である（ホモ二量体）。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領域を含有しており、いくつかのケースにおいて、多重特異性ポリペプチド構築物のポリペプチド鎖は、異なる（ヘテロ二量体）。ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の具体的な例において、CD3結合領域は、VH鎖およびVL鎖を含有している2本鎖ポリペプチドであり、例えば、VHおよびVLを含有している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。

【0137】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）のVHドメインを含む第1のポリペプチド；およびヘテロ二量体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のポリペプチドを含む2種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、TAAに結合する1つもしくは2つの抗原結合ドメイン、またはそれらの鎖を含有している。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、TAAに結合する1つもしくは2つの抗原結合ドメイン、またはそれらの鎖を含有している。

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、TAAに結合する各抗原結合ドメインは、Fcポリペプチドに対してN末端側および/またはCD3結合領域の鎖に対してC末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物が少なくとも1つのCRBRを含有するよう、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および第2のポリペプチドの両方は、CRBRをさらに含む。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、2つのCRBRを含有している。いくつかの態様において、第1および/または第2のポリペプチドのCRBRは、Fcポリペプチドに対してN末端側および/またはCD3結合領域の鎖に対してC末端側に位置付けられていてよい。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が少なくとも1つのIRBRを含有するよう、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および第2のポリペプチドの両方は、IRBRをさらに含む。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、2つのIRBRを含有している。いくつかの態様において、第1および/または第2のポリペプチドのIRBRは、Fcポリペプチドに対してN末端側および/またはCD3結合領域の鎖に対してC末端側に位置付けられていてよい。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が少なくとも1つのCRBRおよび少なくとも1つのIRBRを含有するよう、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および第2のポリペプチドの両方は、CRBRをさらに含み、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および第2のポリペプチドの両方は、IRBRをさらに含む。

【0138】

少なくとも2種のポリペプチド鎖を含有している様々な例示的な多重特異性ポリペプチド構築物は、本明細書中、例えば、図1〜3および18A〜Bに記載される。多重特異性ポリペプチド構築物のそのような配置のうちの任意のものが企図される。

【0139】

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、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも2つの抗原結合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）を含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、以下を含有している：（1）N末端からC末端へ順に、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第1の抗原結合ドメインと、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドと、リンカー（例えば、切断可能リンカー）と、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）と、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第2の抗原結合ドメインとを含有している、第1のポリペプチド；ならびに（2）N末端からC末端へ順に、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチドと、同一のリンカー（例えば、同一の切断可能リンカー）と、抗CD3抗体または抗原結合断片の他方の鎖（VHまたはVLのうちの他方）と、共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）とを含有している、第2のポリペプチド。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、以下を含有している：（1）N末端からC末端へ順に、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第1の抗原結合ドメインと、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドと、リンカー（例えば、切断可能リンカー）と、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）と、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む、第1のポリペプチド；ならびに（2）N末端からC末端へ順に、共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）と、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチドと、同一のリンカー（例えば、同一の切断可能リンカー）と、抗CD3抗体または抗原結合断片の他方の鎖（VHまたはVLのうちの他方）とを含む、第2のポリペプチド。

【0140】

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、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも2つの抗原結合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）を含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、以下を含有している：（1）N末端からC末端へ順に、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第1の抗原結合ドメインと、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペ

プチドと、リンカー（例えば、切断可能リンカー）と、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）と、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む、第1のポリペプチド；ならびに（2）N末端からC末端へ順に、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチドと、同一のリンカー（例えば、同一の切断可能リンカー）と、抗CD3抗体または抗原結合断片の他方の鎖（VHまたはVLのうちの他方）と、抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）とを含む、第2のポリペプチド。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、以下を含有している：（1）N末端からC末端へ順に、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第1の抗原結合ドメインと、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドと、リンカー（例えば、切断可能リンカー）と、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）と、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む、第1のポリペプチド；ならびに（2）N末端からC末端へ順に、抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）と、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチドと、同一のリンカー（例えば、同一の切断可能リンカー）と、抗CD3抗体または抗原結合断片の他方の鎖（VHまたはVLのうちの他方）とを含む、第2のポリペプチド。

【0141】

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、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも2つの抗原結合ドメイン、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）、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）を含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、以下を含有している：（1）N末端からC末端へ順に、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第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（例えば、切断可能リンカー）、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）、および腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第2の抗原結合ドメインを含む、第1のポリペプチド；ならびに（2）N末端からC末端へ順に、CRBRまたはIRBRのうちの一方、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、同一のリンカー（例えば、同一の切断可能リンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片の他方の鎖（VHまたはVLのうちの他方）、およびCRBRまたはIRBRのうちの他方を含む、第2のポリペプチド。

【0142】

本開示の多重特異性ポリペプチド構築物の成分の各々は、より詳細に以下に記載される。

【0143】

1. 抗CD3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、抗CD3結合ドメインの1コピーまたは複数コピーを含む。本開示の抗CD3結合ドメインは、T細胞におけるCD3 ϵ の係合を介してT細胞を活性化する。本開示の抗CD3結合ドメインは、CD3によって媒介されるT細胞活性化を作動させ、刺激し、活性化し、かつ/またはその他の方法で増大させる。CD3の生物学的活性には、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を通じたT細胞活性化およびその他のシグナリングが含まれる。例えば、本開示の抗CD3結合ドメインは、CD3によって媒介されるT細胞活性化を部分的にまたは完全にモジュレートすることによって、例えば、作動させるか、刺激するか、活性化するか、またはその他の方法で増大させることによって、T細胞におけるCD3 ϵ の係合を介して完全にまたは部分的にT細胞を活性化する。

【0144】

好ましい態様において、本開示の抗CD3結合ドメインは、CD3 ϵ としても公知のCD3の ϵ 鎖に特異的に結合する。本開示の抗CD3 ϵ 結合ドメインは、T細胞におけるCD3 ϵ の係合を介してT細胞を活性化する。本開示の抗CD3 ϵ 結合ドメインには、例えば、哺乳動物モノクローナル抗体、霊長類モノクローナル抗体、完全ヒトモノクローナル抗体のようなモノクローナル抗体が含まれ、ヒト化モノクローナル抗体およびキメラ抗体も含まれ、それらの抗原結合断片も含まれる。いくつかの態様において、抗CD3 ϵ 結合ドメインは、抗

体またはその抗原結合断片の1コピーまたは複数コピーを含む。

【0145】

いくつかの態様において、抗CD3 ϵ 結合ドメインは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片の1コピーまたは複数コピーを含む。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインは、（本明細書中で抗CD3 ϵ Fv断片と呼ばれる）CD3 ϵ に結合するFv抗体断片を含む。いくつかの態様において、抗CD3 ϵ 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結合について1価である。

【0146】

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

【0147】

いくつかの態様において、CD3結合領域は、記載される任意のもののような、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）を含有しているFv抗体断片である。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、セクションII.2に記載される任意のもののような、Fcヘテロ二量体の両方のポリペプチドの間のヘテロ二量体会合が可能な2種の異なるFcポリペプチドを含有しているヘテロ二量体Fc領域である。そのような態様において、CD3結合領域の可変重鎖（Hv）および可変軽鎖（Lv）は、ヘテロ二量体Fcの対向する鎖に連結されている。

【0148】

いくつかの態様において、抗CD3 ϵ 結合ドメインは、VH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列の組み合わせを含み、VH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列のうちの少なくとも一つは、アミノ酸配列TYAMN（SEQ ID NO:16）を少なくとも含むVH CDR1配列；アミノ酸配列RIRSKYNNYATYYADSVKD（SEQ ID NO: 17）

を少なくとも含むVH CD2配列；およびアミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY（SEQ ID NO: 18）を少なくとも含むVH CDR3配列より選択される。

【0149】

いくつかの態様において、抗CD3 ϵ 結合ドメインは、VL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列の組み合わせを含み、VL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列のうちの少なくとも一つは、アミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN（SEQ ID NO:19）を少なくとも含むVL CDR1配列；アミノ酸配列GTNKRAP（SEQ ID NO:20）を少なくとも含むVL CDR2配列；およびアミノ酸配列ALWYSNLWV（SEQ ID NO:21）を少なくとも含むVL CDR3配列より選択される。

【0150】

いくつかの態様において、抗CD3 ϵ 結合ドメインは、アミノ酸配列TYAMN（SEQ ID NO:16）を少なくとも含むVH CDR1配列；アミノ酸配列RIRSKYNNYATYYADSVKD（SEQ ID NO: 17）

を少なくとも含むVH CD2配列；アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY（SEQ ID NO:18）を少なくとも含むVH CDR3配列、アミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN（SEQ ID NO:19）を少なくとも含むVL CDR1配列；アミノ酸配列GTNKRAP（SEQ ID NO:20）を少なくとも含むVL CDR2配列；およびアミノ酸配列ALWYSNLWV（SEQ ID NO:21）を少なくとも含むVL CDR3配列を含む。

【0151】

いくつかの態様において、抗CD3 ϵ 結合ドメインは、VH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列の組み合わせを含み、VH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列のうちの少なくとも一つは、アミノ酸配列TYAMN（SEQ ID NO:16）と少なく

10

20

30

40

50

とも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である配列を含むVH CDR1配列；
RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 17)

と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である配列を含むVH CD2配列；およびアミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である配列を含むVH CDR3配列より選択される。

【0152】

いくつかの態様において、抗CD3ε結合ドメインは、VL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列の組み合わせを含み、VL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列のうちの少なくとも一つは、アミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:19) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である配列を含むVL CDR1配列；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:20) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である配列を含むVL CDR2配列；およびアミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO:21) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である配列を含むVL CDR3配列より選択される。

【0153】

いくつかの態様において、抗CD3ε結合ドメインは、アミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO:312) を少なくとも含むVH CDR1配列；アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO:318) を少なくとも含むVH CDR2配列；アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18) を少なくとも含むVH CDR3配列、アミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:19) を少なくとも含むVL CDR1配列；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:20) を少なくとも含むVL CDR2配列；およびアミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO:21) を少なくとも含むVL CDR3配列を含む。

【0154】

いくつかの態様において、抗CD3ε結合ドメインは、アミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO:16) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるVH CDR1配列；アミノ酸配列RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 17)

と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるVH CD2配列；アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 18) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるVH CDR3配列、アミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:19) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるVL CDR1配列；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:20) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるVL CDR2配列；およびアミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO:21) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるVL CDR3配列を含む。

【0155】

いくつかの態様において、抗CD3ε結合ドメインは、アミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO:312) を少なくとも含むVH CDR1配列；アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO:318) を少なくとも含むVH CDR2配列；アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18) を少なくとも含むVH CDR3配列、アミノ酸配列GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:319) を少なくとも含むVL CDR1配列；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:320) 少なくとも含むVL CDR2配列；およびアミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO:3

15) を少なくとも含むVL CDR3配列を含む。

【0156】

いくつかの態様において、抗CD3ε結合ドメインは、アミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO:312) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるVH CDR1配列；アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO:313) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるVH CDR2配列；アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるVH CDR3配列、アミノ酸配列GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:319) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるVL CDR1配列；アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO:320) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるVL CDR2配列；およびアミノ酸配列ALWYSNHVW (SEQ ID NO:315) と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるVL CDR3配列を含む。

【0157】

いくつかの態様において、その抗CD3ε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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:32~81および241からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変アミノ酸配列と軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:32~81および241からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変アミノ酸配列と軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:32~62の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO:63~81および241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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:32~62からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO:63~81および241からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であ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。

【0158】

いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:32~81および241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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:32~62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:63~81および241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。

【0159】

いくつかの態様において、抗CD3ε Fv抗体断片は、SEQ ID NO:14、15、32~81、241、287~291、および311の群より選択される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、抗CD3ε Fv抗体断片は、SEQ ID NO:14、15、32~81、241、287~291、および311からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である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、抗CD3ε Fv抗体断片は、SEQ ID NO:14、32~62、および287、290、および311の群より選択される可変重鎖アミノ酸配列と、SEQ ID NO:15、63~81、241、288、および289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。いくつかの態様において、抗CD3ε Fv抗体断片は、SEQ ID NO:14、32～62、287、290、および311からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である可変重鎖アミノ酸配列と、SEQ ID NO:15、63～81、241、288、および289からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である可変軽鎖アミノ酸配列との組み合わせを含む。

【0160】

いくつかの態様において、その抗CD3ε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、抗CD3ε Fv抗体断片は、SEQ ID NO:14、32～43、45～47、48、および287からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である可変重鎖アミノ酸配列と、SEQ ID NO:15、63、65～71、73、75、77、および288からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である可変軽鎖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CD3ε Fv抗体断片は、SEQ ID NO:14、32～43、45～47、48、および287の群より選択される可変重鎖アミノ酸配列と、SEQ ID NO:15、63、65～71、73、75、77、および288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。

【0161】

いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:14のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変重鎖（Hv）を含む。いくつかの態様において、抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:15のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である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、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:14のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変重鎖（Hv）およびSEQ ID NO:15のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である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、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含む可変重鎖（Hv）を含む。いくつかの態様において、抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:15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、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含む可変重鎖（Hv）およびSEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（Lv）を含む。

【0162】

いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:287のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であ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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:288のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であ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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:287のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO:288のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であ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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:287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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:288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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:287のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO:288のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

【0163】

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

【0164】

いくつかの態様において、抗CD3ε Fvは、SEQ ID NO:44および49～62、290、および311からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である可変重鎖アミノ酸配列と、SEQ ID NO:64、72、74、76、78～81、241、および289からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である可変軽鎖アミノ酸配列との組み合わせを含む。そのような態様のうちのいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、各々カバットナンバリングによって、変異G44Cを含有しているVH鎖および変異G100Cを含有しているVL鎖を有するdsFvである。いくつかの態様において、抗CD3ε Fv抗体断片は、SEQ ID NO:44、および49～62、290、および311の群より選択される可変重鎖アミノ酸配列と、SEQ ID NO:64、72、74、76、78～81、241、および289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。

【0165】

いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変重鎖（Hv）を含む。いくつかの態様において、抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:72のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である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、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変重鎖（Hv）、およびSEQ ID NO:72のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変軽鎖（Lv）を含む。そのような態様のうちのいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、各々カバットナンバリングによって、変異G44Cを含有しているVH鎖および変異G100Cを含有しているVL鎖を有するdsFvである。いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列を含む可変重鎖（Hv）を含む。いくつかの態様において、抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:72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、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列を含む可変重鎖（Hv）およびSEQ ID NO:72のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（Lv）を含む。

【0166】

いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変重鎖（Hv）を含む。いくつかの態様において、抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:241のアミノ酸配列と少なくとも90%、

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一である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、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変重鎖（Hv）、およびSEQ ID NO:241のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変軽鎖（Lv）を含む。そのような態様のうちのいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、各々カバットナンバリングによって、変異G44Cを含有しているVH鎖および変異G100Cを含有しているVL鎖を有するdsFvである。いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列を含む可変重鎖（Hv）を含む。いくつかの態様において、抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:241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、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列を含む可変重鎖（Hv）およびSEQ ID NO:241のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（Lv）を含む。

【0167】

いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:290のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であ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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:289のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であ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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:290のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO:289のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。そのような態様のうちのいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、各々カバットナンバリングによって、変異G44Cを含有しているVH鎖および変異G100Cを含有しているVL鎖を有するdsFvである。いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:290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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:289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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:290のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO:289のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

【0168】

いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:311のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であ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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:289のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であ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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:311のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO:289のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。そのような態様のうちのいくつかにおいて、抗CD3 Fvは、各々カバットナンバリングによって、変異G44Cを含有しているVH鎖および変異G100Cを含有しているVL鎖を有するdsFvである。いくつかの態様において、その抗CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:311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CD3ε結合ドメインは、SEQ ID NO:289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CD3ε結合ドメインは

、SEQ ID NO:311のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO:289のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

【0169】

2. 免疫グロブリンFcポリペプチド

本開示の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。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。いくつかの態様において、Fc領域は、ヒトFcである。いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域は、SEQ ID NO:1～6からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域は、SEQ ID NO:1～6のいずれかの免疫活性断片であるFc鎖を含有している。いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域は、SEQ ID NO:1～6のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるFcポリペプチド鎖、またはその免疫活性断片を含有している。

【0170】

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、各々Fcを含有しているポリペプチドによって形成された二量体である。いくつかの具体的な態様において、同一のまたは実質的に同一のポリペプチドが、ホモ二量体を作製するために二量体化するであろう。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本のポリペプチドが同一であるホモ二量体である。他のケースにおいて、Fc領域は、異なるポリペプチドが二量体化してヘテロ二量体を与えるヘテロ二量体化を促進するために変異させられたまたは修飾されたFcドメインによって形成される。従って、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るヘテロ二量体である。ヘテロ二量体化を促進するための例示的な修飾は、公知であり、下記のものを含む。

【0171】

概して、Fc領域は、免疫グロブリンの主要な機能である抗原結合能力に加えて、補体依存性細胞傷害（CDC）および抗体依存性細胞傷害（ADCC）のようなエフェクター機能を担う。さらに、Fc領域に存在するFcRn配列は、インビボFcRn受容体とのコンジュゲーションによって、インビボ半減期を増加させることによって、血清中のIgGレベルを制御する役割を果たす。いくつかの態様において、提供された多重特異性ポリペプチド構築物と共に使用するためのFcにおいて、そのような機能は、変更されていてよく、例えば、低下していてもよいまたは増強されていてよい。

【0172】

いくつかの態様において、提供された多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域は、1種または複数種のエフェクター機能を示す。いくつかのケースにおいて、Fc領域は、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のような、Fcによって媒介されるエフェクター機能を提供することができる。多重特異性ポリペプチド構築物が切断可能リンカーを含有しているいくつかの態様において、リンカーの切断は、T細胞上のCD3に結合し係合することができるCD3結合領域（これはいくつかの局面においては、T細胞上の共刺激シグナルを誘導するためのCRBRも同様に含むことができる）、および標的的特異的なエフェクター機能を示すことができるTAA抗原結合ドメインに連結されたFc領域という、生物学的活性を各々有する2種の成分を産生することができる。本明細書に提供す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、非切断可能リンカーを含み、いくつかの局面では、Fcが介在する独立したエフェクター機能を示さない場合もある。

【0173】

いくつかの態様において、Fc領域は、1種または複数種のエフェクター機能を変更するために変異させられたまたは修飾されたFcポリペプチドを含む。エフェクター機能を変更

10

20

30

40

50

するため、例えば、低下させるためのFcポリペプチドの変異の様々な例は、公知であり、下記のものを含む。いくつかの態様において、特定のSEQ ID NOに関して記載されない限り、Fc領域におけるアミノ酸置換の言及は、(Kabatナンバリングとも呼ばれる) KabatによるEUナンバリングによる。EUナンバリングは、公知であり、最新の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(created:17 May 2001,last updated:10 Jan 2013)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)において報告されたEUインデックスによる。

【0174】

いくつかの態様において、低下したエフェクター機能を示すFc領域を含有している提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、制約されたCD3結合が望まれるが、(CDCおよびADCCのような)ある種のエフェクター機能が不必要であるかまたは有害である適用のため、望ましい候補であり得る。インビトロおよび/またはインビボの細胞傷害アッセイが、CDC活性および/またはADCC活性の低下/枯渇を確認するために実施され得る。例えば、多重特異性ポリペプチド構築物および/または切断されたその成分が、FcγR結合を欠く(従って、ADCC活性を欠く可能性が高い)が、FcRn結合能力を保持することを確実にするため、Fc受容体(FcR)結合アッセイが実施され得る。ADCCを媒介するための主な細胞、NK細胞は、FcγRIIIのみを発現し、単球は、FcγRI、FcγRII、およびFcγRIII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)を参照すること)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)を参照すること)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法が利用されてもよい(例えば、フローサイトメリーのためのACT1(商標)非放射性細胞傷害アッセイ(CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.);およびCytoTox 96(商標)非放射性細胞傷害アッセイ(Promega, Madison, Wis.)を参照すること)。そのようなアッセイのため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。あるいは、またはさらに、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)に開示されたもののような動物モデルにおいて評価され得る。多重特異性ポリペプチド構築物または切断されたその成分がC1qに結合することができず、従って、CDC活性を欠くことを確認するため、C1q結合アッセイも実施され得る。例えば、WO 2006/029879およびWO 2005/100402のC1q結合ELISAおよびC3c結合ELISAを参照すること。補体活性化を評価するためには、CDCアッセイが実施され得る(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)を参照すること)。FcRn結合およびインビボクリアランス/半減期の決定も、当技術分野において公知の方法を使用して実施され得る(例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18 (12): 1759-1769(2006)を参照すること)。

【0175】

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。

10

20

30

40

50

PAPPELLGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 1)

【0176】

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活性断片は、SEQ ID NO:1のアミノ酸配列と少なくとも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。

10

【0177】

いくつかの態様において、下記の任意のもののような、IgG1 Fcポリペプチドまたはそのバリエーションは、G1 m1アロタイプまたはG1 m3アロタイプで作製され得る。いくつかの態様において、Fc領域は、例えば、SEQ ID NO:1に示されるように、356位および358位におけるAsp (D) およびLeu (L) を含有している残基のような、ヒトG1 m1アロタイプのアミノ酸を含有していてもよい。いくつかのケースにおいて、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、アミノ酸置換E356DおよびM358Lを含有していてもよい。他の態様において、Fc領域は、例えば、SEQ ID NO:194および195に示されるように、EUナンバリングによって、356位および358位における残基Glu (E) およびMet (M) のようなヒトG1 m3アロタイプのアミノ酸を含有していてもよい。いくつかのケースにおいて、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、アミノ酸置換D356EおよびL358Mを含有していてもよい。

20

【0178】

いくつかの態様において、ヒトIgG1 Fc領域は、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) および/または補体依存性細胞傷害 (CDC) を変更するために修飾される。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に概説されたアミノ酸修飾。それらの各々の内容は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。

30

【0179】

いくつかの態様において、ヒトIgG1 Fc領域のようなFc領域は、ADCC活性またはCDC活性を増強するために修飾される。ADCCを増強する変異の例は、Ser239およびIle332における修飾、例えば、Ser239AspおよびIle332Glu (S239D、I332E) を含む。CDCを増強する変異の例には、Lys326およびGlu333における修飾が含まれる。いくつかの態様において、Fc領域は、Kabatナンバリングシステムを使用して、これらの位置の一方または両方において修飾される (例えば、Lys326Alaおよび/またはGlu333Ala (K326AおよびE333A)) 。

40

【0180】

いくつかの態様において、Fc領域は、例えば、低下したFc受容体結合、例えば通常FcRn結合ではなくFcγR結合への結合を介して、低下したFc媒介エフェクター機能を提供するように改変される。いくつかの態様において、本開示のヒトIgG1 Fc領域融合タンパク質は、N297におけるN結合型グリカン鎖に付着したフコースを欠くかまたは低下したフコースを有する。FUT8欠損細胞株における産生; 哺乳動物細胞培養培地への阻害剤、例えば、カスタノスペルミンの添加; および産生細胞株の代謝工学を含むが、これらに限定され

50

るわけではない、フコシル化を防止する多数の方式が存在する。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防止するため、アミノ酸Asn297 (ボックス内、Kabatナンバリング) において修飾される (例えば、Asn297Ala (N297A) またはAsn297Asp (N297D))。

【0181】

いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体結合を低下させるため、以下の位置のうちの1つまたは複数において変更される: Leu234 (L234)、Leu235 (L235)、Asp265 (D265)、Asp270 (D270)、Ser298 (S298)、Asn297 (N297)、Asn325 (N325)、またはAla327 (A327)。例えば、Leu234Ala (L234A)、Leu235Ala (L235A)、Asp265Asn (D265N)、Asp270Asn (D270N)、Ser298Asn (S298N)、Asn297Ala (N297A)、Asn325Glu (N325E)、またはAla327Ser (A327S)。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、アミノ酸Leu235 (前記SEQ ID NO:1のボックス内、Kabatナンバリング) において修飾される (例えば、Leu235Glu (L235E) またはLeu235Ala (L235A))。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、アミノ酸Leu234 (前記SEQ ID NO:1のボックス内、Kabatナンバリング) において修飾される (例えば、Leu234Ala (L234A))。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の両方において変更される (例えば、Leu234AlaおよびLeu235Ala (L234A/L235A) またはLeu234ValおよびLeu235Ala (L234V/L235A))。好ましい態様において、Fc領域内の修飾は、Fc受容体γ受容体との結合を低下させるが、新生児型Fc受容体 (FcRn) との結合に対しては最小の影響を及ぼす。

【0182】

いくつかの態様において、ヒトIgG Fc領域は、FcRn結合を増強するために修飾される。FcRnとの結合を増強する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) (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス) である。いくつかの態様において、変異型または修飾型のFcポリペプチドは、Kabatナンバリングシステムを使用して、以下の変異を含む: Met252TyrおよびMet428LeuまたはMet252TyrおよびMet428Val (M252Y、M428LまたはM252Y、M428V)。

【0183】

いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体結合を低下させるため、以下の位置のうちの1つまたは複数におけるアミノ酸を欠いている: Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、またはLeu235 (L235)。これらの態様において、これらの3つのアミノ酸のFc欠失は、補体タンパク質C1q結合を低下させる。

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: 2)

【0184】

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、以下の位置のうちの1つまたは複数において変異している: Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、またはLeu235 (L235)。1つまたは複数の変異には、E233P、L234V、および/またはL235Aが含まれ得る。

【0185】

いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体結合を低下させるため、Gly236（前記SEQ ID NO:1のボックス内）において変更される。例えば、Gly236が融合タンパク質から欠失させられる。いくつかの態様において、ヒトIgG1 Fc領域は、CD 32Aとの相互作用を増強するため、アミノ酸Gly236において修飾される（例えば、Gly236Ala（G236A））。

【0186】

具体的な態様において、例えば、Fc受容体のFcγRとの結合の低下を介して、Fcエフェクター機能を低下させるためのFc領域の変異には、G236R/L328R、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G、またはE233P/L234V/L235A/G236delのいずれかの変異が含まれる。

【0187】

いくつかの態様において、ヒトIgG1 Fc領域は、Lys447を欠く（Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス）。

【0188】

いくつかの態様において、融合物またはその免疫活性断片は、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列と少なくとも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。

【0189】

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領域またはその免疫活性断片は、以下のアミノ酸配列を有する、ヒトIgG2アイソタイプのものである。

PAPPVAGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPSPREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMH
ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

【0190】

いくつかの態様において、融合物またはその免疫活性断片は、SEQ ID NO:3のアミノ酸配列と少なくとも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。

【0191】

いくつかの態様において、ヒトIgG2 Fc領域は、アミノ酸Asn297において修飾される（ボックス内、抗体のグリコシル化を防止するため、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を欠く（Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス）。

【0192】

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領域または免疫活性断片は、以下のアミノ酸配列を有する、ヒトIgG3アイソタイプのものである。

PAPELLGGPS VFLFPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV
DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
APIEKTISKTK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIIV
EWESSGQPN NYNTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH
EALHNRFQTK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 4)

10

20

30

40

50

【0193】

いくつかの態様において、抗体またはその免疫活性断片は、SEQ ID NO:4のアミノ酸配列と少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヒトIgG3ポリペプチド配列を含む。

【0194】

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防止するため、アミノ酸Asn297（ボックス内、Kabatナンバリング）において修飾される（例えば、Asn297Ala（N297A）またはAsn297Asp（N297D））。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、アミノ酸435において修飾される（例えば、Arg435His（R435H））。いくつかの態様において、ヒトIgG3 Fc領域は、Lys447を欠く（Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス）。

【0195】

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 YRVVSVLTIVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH
EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 5)

【0196】

いくつかの態様において、抗体またはその免疫活性断片は、SEQ ID NO:5のアミノ酸配列と少なくとも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。

【0197】

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 YRVVSVLTIVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH
EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 6)

【0198】

いくつかの態様において、抗体またはその免疫活性断片は、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列と少なくとも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。

【0199】

他の態様において、ヒトIgG4 Fc領域は、Fc受容体相互作用を変更するため、アミノ酸235において修飾される（例えば、Leu235Glu（L235E））。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防止するため、アミノ酸Asn297（ボックス内、Kabatナンバリング）において修飾される（例えば、Asn297Ala（N297A）またはAsn297Asp（N297D））。いくつかの態様において、ヒトIgG4 Fc領域は、Lys447

を欠く (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのE
Uインデックス)。

【0200】

いくつかの態様において、ヒトIgG Fc領域は、Ser354のCysへの変化 (S354C) およ
びTyr349のCysへの変化 (Y349C) (S354C/Y349C) によって、2つのジスルフィド
結合を導入することによって、CH3:CH3界面におけるホモ二量体化を安定化するために修
飾される。

【0201】

本明細書に提供する多重特異性ポリペプチド構築物の特定の態様において、ヒトIgG Fc
領域は、ヘテロ二量体化を誘導するために修飾される。相補的なFcポリペプチドのヘテロ
二量体化を促進するための様々な方法が、公知である。例えば、Ridgway et al, Protein
Eng. 9:617-621(1996); Merchant et al, Nat. Biotechnol. 16(7):677-81(1998)
; Moore et al. (2011) MABs, 3:546-57; Von Kreudenstein et al. MABs, (2013) 5:
646-54; Gunasekaran et al. (2010) J. Biol. Chem., 285: 19637-46; Leaver-Fa
y et al. (2016) Structure, 24:641-51; Ha et al. (2016) Frontiers in Immunolog
y, 7:1; Davis et al. (2010) Protein Eng Des Sel, 23: 195-202; 公開された国際PCT出願番号WO 1998/050431、WO2009/089004、WO2011143545、WO2014/0
67011、WO2012/058768、WO2018027025; 公開された米国特許出願番号US201
40363426、US20150307628、US20180016354、US20150239991; ならびに米
国特許第5731168号、第7183076号、第9701759号、第9605084号、および第9650
446号を参照すること。Fc鎖のヘテロ二量体化を促進する方法には、例えば、「ノブイン
トゥホール」変異のセットを含めるか、または異なるポリペプチド鎖の間の誘引相互作用
にとって有利となるよう、Fcの静電的ステアリングを達成するための変異を含めることによ
る、Fc領域の変異誘発が含まれる。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、静電的にマッチしたFc鎖の共発現が、有利な誘引相互作用を支持し、
それによって、所望のFcヘテロ二量体の形成を促進し、不利な反発電荷相互作用が、望ま
れないFcホモ二量体の形成を抑制するよう、Fc二量体界面における電荷極性を変更するた
めの変異を含む (Gunasekaran et al., (2010) JBC, 285:19637-19646)。細胞におい
て共発現された時、鎖間の会合が可能であるが、電荷反発のため、鎖は実質的に自己会合
しない。ヘテロ二量体Fcを生成するための他の戦略には、SEED Fcと呼ばれる、相補的な
CH3のヘテロ二量体を作製するためのヒトIgGおよびIgAのCH3ドメインセグメントの混
合が含まれる。

【0202】

ヘテロ二量体化の方法および変法には、(「スキュー (skew)」バリエーションとも呼ばれ
る)「ノブアンドホール (knobs and holes)」変異、「静電的ステアリング」または「
電荷対」に関係する変異、およびpIバリエーションを含む、公開された国際PCT出願WO2014
/145806に記載されたものも含まれる。ヘテロ二量体バリエーションには、公開された米国出
願番号US2012/0149876またはUS2018/011883に記載される任意のものも含まれる。

【0203】

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、Fcヘテロ二量体の両方のポ
リペプチドが、ペアのまたは相補的なアミノ酸修飾を含有している。Fc融合物のポリペプ
チドの例示的なアミノ酸修飾のペアを、表1に示す。

【0204】

(表1) ヘテロ二量体Fcのアミノ酸のペア

10

20

30

40

50

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

【0205】

いくつかの態様において、修飾は、第1および第2のFc含有ポリペプチドの複合体化を促進するため、隆起が空洞に位置付けられるよう、第1のFcポリペプチドに隆起（ノブ）を導入し、第2のFcポリペプチドに空洞（ホール）を導入することを含む。ポリペプチドに隆起または空洞を作製するための置換および/または修飾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にある1つまたは複数のアミノ酸と相互作用するかまたは接触する界面アミノ酸である。

【0206】

いくつかの態様において、隆起（ホール）アミノ酸を含有するよう修飾される第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、従って、第2のポリペプチドの近接した界面において代償的な空洞（ホール）に位置付けられる少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸への、ネイティブのまたは最初のアミノ酸の置換を含む。置換アミノ酸は、最初のアミノ酸残基より大きい側鎖体積を有するものであることが最も多い。隆起を作製するための理想的な置換アミノ酸であるものを同定するため、アミノ酸残基の特性を決定しかつ/または評価する方法は、当業者に公知である。いくつかの態様において、隆起の形成のための置換残基は、天然に存在す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、置換のために同定される最初の残基は、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、トレオニン、またはバリンのような、小さい側鎖を有するアミノ酸残基である。

20

30

【0207】

いくつかの態様において、空洞（ホール）を含有するよう修飾される第2のFcポリペプチドは、第2のポリペプチドの界面から凹んでおり、従って、第1のポリペプチドの界面からの対応する隆起を受け入れることができる少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸への、ネイティブのまたは最初のアミノ酸の置換を含むものである。置換アミノ酸は、最初のアミノ酸残基より小さい側鎖体積を有するものであることが最も多い。空洞の形成のための理想的な置換残基であるものを同定するため、アミノ酸残基の特性を決定しかつ/または評価する方法は、当業者に公知である。一般に、空洞の形成のための置換残基は、天然に存在するアミノ酸であり、例えば、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、およびバリン（V）を含む。いくつかの例において、置換のために同定される最初のアミノ酸は、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のような、大きい側鎖を有するアミノ酸である。

40

【0208】

ヒトIgG1のCH3界面は、例えば、各表面から1090 Å²埋め込まれている4本の逆平行β鎖に位置する各ドメインの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号を参照すること）。隆起または空洞を作製するためのCH3ドメインの修飾は、例えば、米国特許第5,731,168号; 国際特許出願W098/50431およびW02005/063816; ならびにRidgway et al.

50

, (1996) Prot. Engin. 617-621に記載されている。いくつかの例において、隆起または空洞を作製するためのCH3ドメインの修飾は、典型的には、2本の中央の逆平行β鎖に位置する残基を標的とする。目標は、作製される隆起が、パートナーCH3ドメインの代償的な空洞に受け入れられるのではなく、周囲の溶媒に突出することによって受け入れられるリスクを最小化することである。

【0209】

例えば、いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcは、よりかさの大きいアミノ酸、例えば、Tryと交換された時 (T366W)、よりかさの小さいアミノ酸、例えば、それぞれ、Ser、Ala、Valへの位置Thr366、Leu368、およびTyr407におけるアミノ酸修飾 (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ドメイン内のThr366にアミノ酸修飾を有するポリペプチドを含む。CH3修飾を介したヘテロ二量体化は、例えば、対向するCH3ドメインにおけるSer354のCysへの変化 (S354C) およびTyr349のCysへの変化 (Y349C) による、ジスルフィド結合の導入によって、さらに安定化され得る (Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15に概説されている)。

【0210】

具体的な態様において、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することができる第1および第2のFcを含有しており、第1のFcポリペプチドは、変異T366WおよびS354Cを含有しており、第2のFcポリペプチドは、変異T366S、L368A、Y407V、およびY349Cを含有している。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:291または297に示される配列を含むFcポリペプチドより選択され、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:292、295、または299に示される配列を含むFcポリペプチドより選択される。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:82、86、94、もしくは96のいずれかに示される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:83、87、90、92、98、もしくは100のいずれかに示されるアミノ酸の配列であるか、またはそれを含む。

【0211】

いくつかの態様において、Fcポリペプチドは、Fcによって媒介されるエフェクター機能を提供する特色を示す。具体的な例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:291に示される配列であるか、またはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:292もしくは295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:82に示される配列であるか、またはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:83もしくは90に示される配列であるか、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:86に示される配列であるか、またはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:87もしくは92に示される配列であるか、またはそれを含む。第1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おいてフォーマットされ得る。

【0212】

いくつかの態様において、第1および第2のFcポリペプチドの一方または両方は、低下したFc受容体結合のような1種または複数種のFcエフェクター機能をさらに低下させるための1つまたは複数のアミノ酸変異をさらに含み得る。Fcエフェクター機能を低下させるための例示的な変異には、記載される任意のものが含まれる。いくつかの態様において、修飾は、Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、およびLeu235 (L235) の欠失のような、1つまたは複数の位置Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、または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:293または298に示される配列を含むFcポリペプチドより選択され、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:294、296、または300に示される配列を含むFcポリペプチドより選択される。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:84、88、95、もしくは97のいずれかに示される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:85、89、91、93、99、もしくは101のいずれかに示され

るアミノ酸の配列であるか、またはそれを含む。

【0213】

具体的な例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:293に示される配列であるか、またはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:294もしくは296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:84に示される配列であるか、またはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:85もしくは91に示される配列であるか、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:88に示される配列であるか、またはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:89もしくは93に示される配列であるか、またはそれを含む。第1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おいてフォーマットされ得る。

10

【0214】

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。具体的な例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:297に示される配列であるか、またはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:299に示される配列であるか、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:94に示される配列であるか、またはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:98に示される配列であるか、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:96に示される配列であるか、またはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:100に示される配列であるか、またはそれを含む。他の例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:298に示される配列であるか、またはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:300に示される配列であるか、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:95に示される配列であるか、またはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:99に示される配列であるか、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:97に示される配列であるか、またはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:101に示される配列であるか、またはそれを含む。第1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おいてフォーマットされ得る。

20

【0215】

ヘテロ二量体の促進を容易にすることができるバリエーションの付加的な例は、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およびT366S/L368A/Y407VおよびT366W、または366S/L368A/Y407V/Y349CおよびT366W/S354C（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）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的バリエーション（例えば、スキューバリエーション）の任意の組み合わせまたは対である。具体的な態様において、提供された構築物は、変異対L368D/K370SおよびS364KおよびE357Qを含有している第1および第2のFcポリペプチドを含有している。

30

【0216】

ヘテロ二量体の生成において使用され得る付加的な機序は、Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285 (25): 19637 (2010)に記載されるような「静電的ステアリング」と時に呼ばれるものである。これは、本明細書中で「電荷対」と時に呼ばれる。この態様においては、ヘテロ二量体化に形成を偏向させるため、静電気学が使用される。当業者が理解するように、これらは、pIに対する効果、従って、精製に対する効果も有し、従って、いくつかのケースにおいて、pIバリエーションとも見なされ得る。しかしながら、これらは、ヘテロ二量体化を強制するために生成され、精製ツールとしては使用されなかったため、「立体的バリエーション」として分類される。一つの態様において、第1のFcポリペプチドは、変異D221E/P228E/L368Eを含有してよく、第2のFcポリペプチドは、変異D221R/P228R/K409Rを含有してよい。別の態様において、第1のFcポリペプチドは、変異

40

50

C220E/P228E/368Eを含有していてよく、第2のFcポリペプチドは、変異C220R/E224R/P228R/K409Rを含有していてよい。

【0217】

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容易にされ得る。いくつかの局面において、pIバリエーションには、タンパク質のpIを増加させるもの（塩基性変化）が含まれ得る。他の局面において、pIバリエーションには、タンパク質のpIを減少させるもの（酸性変化）が含まれ得る。いくつかのケースにおいて、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り得、他方のFcポリペプチドが、より塩基性またはより酸性であり得る組み合わせを含む、これらのバリエーションの全ての組み合わせが行われ得る。あるいは、一方をより塩基性に、一方をより酸性に、各Fcポリペプチドを変化させてもよい。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を含有しているネガティブpIバリエーションFcである。

10

【0218】

いくつかの態様において、立体的ヘテロ二量体化バリエーション（例えば、ノブアンドホール）とpIバリエーションまたは電荷対バリエーションとの組み合わせが使用され得る。

【0219】

具体的な態様において、提供された構築物は、（a）スキューバリエーションS364K/E357Qを含む第1のFcポリペプチド；および（b）スキューバリエーションL368D/K370SおよびpIバリエーションN208D/Q295E/N384D/Q418E/N421Dを含有している第2のFcポリペプチドを含有している。いくつかの態様において、第1および第2のポリペプチドの一方または両方は、例示的な変異E233P/L234V/L235A/G236del/S267Kのような、Fcエフェクター活性を低下させるためのさらなる変異を含有してもよい。Fcヘテロ二量体化を媒介することが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ポリペプチドの例には、SEQ ID NO:285および286に示される配列が含まれる。第1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おいてフォーマットされ得る。

20

【0220】

得られた多重特異性ポリペプチド構築物は、例えば、プロテインAカラムまたはプロテインGカラムにおけるアフィニティクロマトグラフィのような、適当な方法によって精製され得る。異なるポリペプチドをコードする2種の核酸分子が細胞へ形質転換された場合、ホモ二量体およびヘテロ二量体の形成が起こるであろう。ヘテロ二量体形成がホモ二量体形成より有利となるよう、発現のための条件を調整することができる。

30

【0221】

ヘテロ二量体のアフィニティ試薬に対するディファレンシャルな親和性に基づく、ヘテロ二量体のホモ二量体からの回収のための技術は、公知である。いくつかの局面において、そのような技術には、Fcポリペプチド鎖のうちの一方がアフィニティ試薬プロテインAに結合しないような、ヘテロ二量体の設計が含まれる。いくつかのケースにおいて、ポリペプチド鎖のうちの一方は、Fcヘテロ二量体のポリペプチドのうちの一方においてプロテインA試薬に対する親和性を消失させるかまたは低下させるため、1つまたは複数のアミノ酸置換を含有していてよい。例えば、WO2017134440、WO2010151792、Jendebergら（Jendeberg et al., (1997) J. Immunol. Methods, 201(1): 25-34）を参照すること。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結合を防止し、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を可能にするため、ヘテロ二量体の一方のメンバーのプロテインA結合部位において修飾され得る。この結合部位における例示的な修飾は、Ile253、例えば、Ile253Arg (I253R) である。いくつかの態様において、修飾は、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に結合することができ、プロテインGには結合し得ないような修飾（pA+/pG-）を含有していてよい。例示的なpA+/pG-アミノ酸修飾には、ヒトIgG1に関して、428位にセリン、434位にセリンを含有しており、任意で、436位にヒスチジンを含有しているか、またはヒトIgG 2、3、もしくは4における対応

40

50

する位置にこれらの残基を含むFcが含まれる。いくつかの局面において、あるIgG Fcポリペプチドの428位、434位におけるそのようなアミノ酸修飾、および、任意で、436位におけるそのようなアミノ酸修飾は、プロテインGの結合を低下させるかまたは防止し、タンパク質の精製を増強する。

【0222】

いくつかの態様において、アフィニティ試薬に対するディファレンシャルな親和性を付与するそのような修飾のいずれかを、前記の1つまたは複数の他のアミノ酸修飾と組み合わせることができる。例えば、I253R修飾を、T366S/L368A/Y407V修飾またはT366W修飾のいずれかと組み合わせることができる。T366S/L368A/Y407V修飾型Fcは、T366W修飾型Fcのケースにおいては存在する二量体化界面の立体障害が存在しないため、ホモ二量体を形成することができる。従って、いくつかの態様において、形成された可能性のあるホモ二量体Fcの精製が許可されないよう、I253R修飾がT366S/L368A/Y407V修飾Fcと組み合わせられる。類似した修飾が、T366S/L368A/Y407VとH453Rとを組み合わせることによって利用され得る。

10

【0223】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体分子のFc領域は、さらに、前記のいずれかのような1つまたは複数の他のFc変異を含有していてもよい。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含むFc領域を含有している。

【0224】

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:291（例えばSEQ ID NO:82もしくは86）または297（例えばSEQ ID NO:94もしくは96）のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの他方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:201（例えばSEQ ID NO:83もしくは87）、295（例えばSEQ ID NO:90もしくは92）、または299（例えばSEQ ID NO:98もしくは100）のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含有している。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:293（例えばSEQ ID NO:84もしくは88）または298（例えばSEQ ID NO:95もしくは97）のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの他方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO:294（例えばSEQ ID NO:85もしくは89）、296（例えばSEQ ID NO:91もしくは93）、または300（例えばSEQ ID NO:99もしくは101）のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

20

30

【0225】

いくつかの態様において、ヒトIgG Fc領域は、二量体化を防止するために修飾される。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における荷電残基への修飾、例えば、Thr366Lys、Thr366Arg、Thr366Asp、またはThr366Glu（それぞれ、T366K、T366R、T366D、またはT366E）は、CH3-CH3二量体化を防止する。

【0226】

いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体結合を低下させるため、以下の位置のうちの1つまたは複数において変更される：Leu234（L234）、Leu235（L235）、Asp265（D265）、Asp270（D270）、Ser298（S298）、Asn297（N297）、Asn325（N325）、またはAla327（A327）。例えば、Leu234Ala（L234A）、Leu235Ala（L235A）、Asp265Asn（D265N）、Asp270Asn（D270N）、Ser298Asn（S298N）、Asn297Ala（N297A）、Asn325Glu（N325E）、またはAla327Ser（A327S）。好ましい態様において、Fc領域内の修飾は、Fc受容体γ受容体との結合を低下させるが、新生児型Fc受容体（FcRn）との結合に対しては最小の影響を及ぼす。

40

【0227】

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している。ヒンジ領域は、ヒトIgGサブクラスのいずれかより選択され得る。例えば、融合タンパク質は、EPKSSDKTHTCPPC（SEQ ID NO:7）の配列を有する修飾型IgG1ヒンジを含有してよく、ここで、軽鎖のC末端システインとジスルフィ

50

ドを形成するCys220は、セリンに変異させられる（例えば、Cys220Ser（C220S））。他の態様において、融合タンパク質は、配列DKTHTCPPC（SEQ ID NO:8）を有する短縮型ヒンジを含有している。

【0228】

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:9）を有する、鎖交換を防止するかまたは低下させるために修飾（例えば、Ser228Pro（S228P））されたIgG4由来の修飾型ヒンジを有する。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している。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している。

【0229】

3. リンカー

提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、免疫グロブリンFc領域を含有している第1の成分とCD3結合領域を含有している第2の成分とを接合するかまたはカップリングするリンカーを含有している。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末端側にあるよう、Fc領域のC末端領域の末端に位置付けられている。提供された多重特異性ポリペプチド構築物は、第1および第2の成分を共に形成する第1および第2のポリペプチドを含有している二量体のような多量体であるため、提供された構築物は、第1のポリペプチドのFc部分とCD3結合領域とを接合するリンカー、および第2のポリペプチドのFc部分とCD3結合領域とを接合するリンカーを含む。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、多重特異性ポリペプチド構築物の第1および第2のポリペプチドに存在するリンカーは、同一である。従って、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、同一のリンカーのようなリンカーを介して、ヘテロ二量体FcのようなFcの対向するポリペプチドと連結されている。

【0230】

融合タンパク質において使用するための様々なポリペプチドリンカーは、公知である（例えば、Chen et al. (2013) Adv. Drug. Deliv. 65:1357-1369；および国際PCT公開番号WO2014/099997、WO2000/24884；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号を参照すること）。

【0231】

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領域と接合されている時には、CD3結合領域が制約されており、多重特異性ポリペプチド構築物が細胞と接触した時に、細胞、例えば、T細胞の表面上のCD3に結合するかまたは係合することができないかまたは実質的にできないよう、選択される。T細胞結合を評価するためのアッセイ、レポーター系を使用した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含む、様々なアッセイが、多重特異性ポリペプチド構築物によるCD3の結合または係合を評価するために利用され得る。例示的なアッセイは、提供された実施例において示される。典型的には、リンカーは、ポリペプチド構築物の正確な折り畳みを確実にし、連結されたポリペプチドの活性または機能と調和しない電荷を示さず、連結されたポリペプチドの活性を衰弱させるかもしくは変更する、ドメインのうちの1つまたは複数におけるアミノ酸残基との結合もしくはその他の相互作用を形成しないものでもある。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非可動性リンカー、または両方の組み合わせであり得る。

【0232】

いくつかの局面において、リンカーは、短いか、中程度であるか、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、40アミノ酸までの長さである。いくつかの態様において、25アミノ酸までの長さである。いくつかの態様において、リンカーは、

10

20

30

40

50

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、適当な長さは、例えば、少なくとも1アミノ酸残基、典型的には、約40アミノ酸残基未満、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アミノ酸の長さである。いくつかの態様において、リンカーは、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、または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アミノ酸長である。

【0233】

ある種の局面において、リンカー長が長いほど、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に結合した時のCD3結合が大きくなる。従って、いくつかの局面において、リンカーは、12アミノ酸を超える長さ、例えば、13、14、15、16、17、または18アミノ酸を超える長さである。いくつかの態様において、リンカーは、12~40アミノ酸長、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。

【0234】

リンカーは、天然に存在するものであってもよいし、合成であってよいし、または両方の組み合わせであってよい。特に適当な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)、およびトレオニン (Thr) より選択されるアミノ酸残基を主に含む。例えば、リンカーは、(ペプチドリンカーに存在する残基の総数に基づき計算された) 少なくとも75%、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より選択されるアミノ酸残基を含有している。リンカーは、Gly、Ser、Ala および/またはThrの残基のみからなっている。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有している。いくつかの局面において、適当なペプチドリンカーは、典型的には、少なくとも50%のグリシン残基、例えば、少なくとも75%のグリシン残基を含有している。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、グリシン残基およびセリン残基のみを含む。

【0235】

いくつかの態様において、これらのリンカーは、アミノ酸グリシンおよびセリンから主に構成され、本明細書中でGSリンカーと呼ばれる。いくつかの態様において、リンカーは、(GGG)_n (nは1~10、例えば、1~5、例えば、1~3である)、例えば、GGG(GGG)_n (SEQ ID NO:171) (nは0~10である) を含有している。具体的な態様において、リンカーは、配列(GGGGGG)_n (SEQ ID NO:173) (nは1~10であるかまたはnは1~5、例えば、1~3である) を含有している。さらなる態様において、リンカーは、(GGGGGG)_n (SEQ ID NO:172) (nは1~4、例えば、1~3である) を含有している。リンカーは、前記のいずれかの組み合わせを含んでいてよく、例えば、2、3、4、または5つのGSリンカー、GGGリンカー、GGGGGリンカー、および/またはGGGGGGリンカーのリピートが組み合わせられてよい。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アミノ酸長である。

【0236】

いくつかの態様において、リンカーは、以下の通りである (1文字アミノ酸コード):GG

S、GGGGS (SEQ ID NO:149)、またはGGGGGS (SEQ ID NO:135)。いくつかの態様において、GSリンカーは、GGSGGS、即ち、(GGS)₂ (SEQ ID NO: 10); GGSGGSGGS、即ち、(GGS)₃ (SEQ ID NO: 11); GGSGGSGGSGGS、即ち、(GGS)₄ (SEQ ID NO: 12); GGSGGSGGSGGSGGS、即ち、(GGS)₅ (SEQ ID NO: 13); GGGGSGGGGSGGGGGS、即ち、(G5S)₃ (SEQ ID NO: 119), GGSGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 147) および GGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:170)

10

の amino 酸配列を含む。いくつかの態様において、リンカーは、GGGG (SEQ ID NO:103) である。いくつかの態様において、リンカーは、GGGGG (SEQ ID NO:250) である。前記実施例のいくつかにおいて、セリンがアラニンに置換されてもよい (例えば、(Gly4Ala) または (Gly3Ala))。

【0237】

いくつかの態様において、リンカーは、amino 酸配列 Gly_x-Xaa-Gly_y-Xaa-Gly_z (SEQ ID NO:174) (Xaaは各々独立にアラニン (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)、トレオニン (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) より選択され、x、y、およびzは各々1~5の範囲の整数である) を有するペプチドリンカーを含む。いくつかの態様において、Xaaは、各々独立にSer、Ala、およびThrからなる群より選択される。具体的な変動において、x、y、およびzの各々は、3に等しく、従って、amino 酸配列 Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:175) (各Xaaは前記のように選択される) を有するペプチドリンカーを与える。

20

【0238】

いくつかの態様において、リンカーは、(SSSSG)_n (SEQ ID NO:185) モチーフ (nは少なくとも1であるが、nは2、3、4、5、6、7、8、および9であってもよい) の反復に基づくセリンリッチリンカーである。

30

【0239】

いくつかのケースにおいて、ペプチドリンカーにある程度の非可動性を提供することが望ましい場合がある。これは、ペプチドリンカーの amino 酸配列にプロリン残基を含めることによって達成され得る。従って、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 amino 酸配列内に少なくとも1つのプロリン残基を含む。例えば、ペプチドリンカーは、amino 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 amino 酸配列を有し得る。一つの具体的な態様において、ペプチドリンカーは、プロリン残基のみを含む。

40

【0240】

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 amino 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、1つのシステイン残基のみが各ペプチドリンカーに含まれる。システイン残基を含む具体的なリンカーの一例は、amino 酸配列 Gly_m-Cys-Gly_n (nおよびmは各々1~12、例えば、3~9、4~8、または4~7の整数である) を有するペプチドリンカーを含む。具体的な変動において、そのようなペプチドリンカーは、amino 酸配列 GGGGG-C-GGGGG

50

(SEQ ID NO:177) を有する。

【0241】

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されたリンカーである。具体的な態様において、構造化されたリンカーは、配列(AP)_nまたは(EAAAK)_n (SEQ ID NO:178) (nは2~20、好ましくは、4~10である)、例えば、以下に限定されるわけではないが、AS-(AP)_n-GT (SEQ ID NO:179) またはAS-(EAAAK)_n-GT (SEQ ID NO:180) (nは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) を含有している。他の態様において、リンカーは、配列(GGGGA)_n (SEQ ID NO:181), (PGGGS)_n

(SEQ ID NO:182), (AGGGS)_n (SEQ ID NO:183) または GGS-(EGKSSGSGSESKST)_n-GGS

(SEQ ID NO:184)

10

(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:186), GSPGSPG (SEQ ID NO:187), または ATTTGSSPGPT (SEQ ID NO:176)

である。いくつかの態様において、そのようなリンカーは、その構造のため、タンパク質切断に対してより耐性であり、従って、インビボで注射された時に利点を与え得る。

【0242】

いくつかの態様において、リンカーは、切断可能リンカーではなく、非切断可能リンカーとも称され得る。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ない。いくつかの態様において、切断可能リンカーでないかまたはプロテアーゼによって切断可能でないリンカーは、一般にインビボの送達または組換え作製のために安定しているものである。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ないリンカーには、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の内部に好ましくは存在する少なくとも1つのペプチド結合を含有していないものが含まれる。具体的な態様において、非切断可能リンカーは、プロテアーゼの標的基質ではなく、従って、同プロテアーゼの基質認識部位を含有している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。

【0243】

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ための基質認識部位または切断部位を含有していない。典型的には、例えば、セリンプロテアーゼのための切断配列は、基質内のP1-P4アミノ酸およびP1'-P4'アミノ酸から構成され、P1位の後で切断が起こる。典型的には、セリンプロテアーゼのための切断配列は、多くのプロテアーゼの拡張された基質特異性にマッチするため、6残基長であるが、プロテアーゼに依って、より長いか、またはより短くてもよい。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解離可能なP1-P1'結合配列を含まない。いくつかの局面において、非切断可能リンカー、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有していないリンカーは、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より実質的に少ないものである。

【0244】

いくつかの態様において、リンカーは切断可能リンカーである。いくつかの局面において、切断可能リンカーは、生理学的条件下で分解され得る少なくとも1つの結合の存在のため、プロテアーゼの基質である配列をさらに含む、前記の任意のもののようなリンカーである。いくつかのケースにおいて、切断可能リンカーは、インビボに存在する特定の条件の下で、例えば、インビボの細胞環境に存在するものを含む、細胞外プロテアーゼへの曝露の後に、切断を受けやすいか、または切断に対して感受性である。いくつかのケースにおいて、プロテアーゼは、腫瘍微小環境のような特定の生理学的微小環境に存在し、従って、切断が起こり得る部位を制限するものであり得る。

20

30

40

50

【0245】

プロテアーゼは、典型的には、他の非標的基質と比較して、特定の標的基質の切断に対する特異性または優先性を示す。そのような特異性の程度は、基質に対するプロテアーゼの優先性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され得る。様々な濃度の基質の存在下で、切断の増加の速度を経時的に決定する方法を、特異性定数を計算するために使用することができる。例えば、基質を、プロテアーゼによって切断された時に放出される蛍光発生基に連結する。異なるプロテアーゼ濃度において切断の速度を決定することによって、特定のリンカーに対する特定のプロテアーゼについての切断の特異性定数 (k_{cat}/K_m) を決定することができる。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、およそ少なくとも $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、または少なくとも $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}$ 、少なくとも $10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}$ 、少なくとも $10 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}$ 、またはそれ以上の速度で、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。

10

【0246】

いくつかの態様において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、第1および第2の成分を接合する切断可能リンカーを含む。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、プロテアーゼ、一般的には、細胞外プロテアーゼの基質として役立つことができるアミノ酸配列を含む。例えば、切断可能リンカーは、プロテアーゼの切断可能なペプチド配列の内部に好ましくは存在する少なくとも1つのペプチド結合を含有している切断配列を含んでいてよい。適当なプロテアーゼには、例えば、関節リウマチまたは癌のような疾患において高度に形成されるかまたは活性化され、過剰の組織分解、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含まれる。具体的な態様において、プロテアーゼは、腫瘍、活性化された免疫エフェクター細胞 (例えば、T細胞もしくはNK細胞)、または腫瘍微小環境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のようなMMPである。

20

【0247】

切断可能リンカーは、標的を発現する細胞の近傍にある腫瘍によって産生され、かつ/または多重特異性ポリペプチド構築物の所望の標的と組織内で共局在している腫瘍によって産生されるプロテアーゼに基づき選択され得る。既知の基質を有するプロテアーゼのレベルが、多数の癌、例えば、固形腫瘍において増加していることが、文献中に報告されている。例えば、La Rocca et al, (2004) British J. of Cancer 90 (7): 1414-1421を参照すること。

30

【0248】

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第1および第2の成分を接合する切断可能リンカーは、成分のうちの一方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、エフェクター可能または増強 (effector enabled or enhanced) IgG Fc領域を包含する多重特異性ポリペプチド構築物は、標的抗原に係合した時、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、即ち、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。放出された時、グランザイムBは、パーフォリン依存的に標的細胞に入り、そこで、アポトーシスを媒介する。重要なことに、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において活性を有する。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の第1および第2の成分を接合する切断可能リンカーは、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成分のうちの一つによって媒介されるエフェクター細胞活性化の間に放出される。いくつかの態様において、グランザイムBおよびその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結合時のCD3係合によるT細胞の活性化が、そのようなプロテアーゼを放出し、次いで、それが、特異的な切断可能リンカーを切断し、

40

50

それによって、CD3結合分子のCD3に係合する活性を強化するかまたは増加させることができる。いくつかの態様において、切断は、未切断状態においてTAAに結合した時に多重特異性構築物によって達成される活性を増幅するかまたは増加させることができる。

【0249】

例示的な基質には、以下の酵素またはプロテアーゼのうちの1種または複数種によって切断可能な基質が含まれるが、これらに限定されるわけではない：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（aspartic）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、メプリン；ネプリライシン；PSMA；BMP-1；MMP、例えば、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、またはMMP27、セリンプロテアーゼ、例えば、活性化プロテインC、カテプシンA、カテプシンG、キマーゼ、凝固因子プロテアーゼ（例えば、FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa）、エラスターゼ、グランザイムB、グアニジノベンゾアターゼ（Guanidinobenzoatase）、HtrA1、ヒト好中球エラスターゼ、ラクtofelin、マラプシン（Marapsin）、NS3/4A、PACE4、プラスミン、PSA、tPA、トロンビン、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。

【0250】

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

【0251】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、特定のプロテアーゼ、例えば、標的を発現する細胞の近傍にある腫瘍によって産生され、かつ/または多重特異性ポリペプチド構築物の標的と共局在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と共に使用するために選択される。

【0252】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、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有している。典型的には、例えば、セリンプロテアーゼについて、切断配列は、基質内のP1-P4およびP1'-P4'アミノ酸から構成され、切断はP1位の後で起こる。典型的には、セリンプロテアーゼの切断配列は、多くのプロテアーゼの拡張された基質特異性にマッチするため、6残基長であるが、プロテアーゼに依って、より長いまたはより短くてもよい。典型的には、切断可能リンカーは、プロテアーゼによって認識される開裂可能なP1-P1'結合配列を含む。いくつかの局面において、切断可能リンカーは、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され得るペプチド結合を導入するために改変される。

【0253】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、2種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、同一の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、基質配列のうちの少なくとも2種は、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によって切断可能なリンカーは、一般式P4 P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:150) (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；P1'はアミノ酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G、またはAである)を有するアミノ酸配列を含有している。いくつかの態様において、グランザイムBによって切断可能なリンカーは、一般式P4 P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:151) (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；P1'はアミノ酸I、V、T、S、またはGである)を有するアミノ酸配列を含有している。

10

【0254】

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:22)、LEPG (SEQ ID NO:142)、またはLEAE (SEQ ID NO:143)を含む。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、アミノ酸配列IEPDI (SEQ ID NO:136)、LEPDG (SEQ ID NO:152)、LEADT (SEQ ID NO:137)、IEPDG (SEQ ID NO:138)、IEPDV (SEQ ID NO:139)、IEPDS (SEQ ID NO:140)、IEPDT (SEQ ID NO:141)、IEPDP (SEQ ID NO:144)、LEPDG (SEQ ID NO:152)またはLEADG (SEQ ID NO:153)

20

を含む。

【0255】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、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、切断可能リンカーは、配列P4QAR↓(A/V) (SEQ ID NO:154) (P4は任意のアミノ酸である)を含む。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、配列RQAR(A/V) (SEQ ID NO:155)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:23)を含む。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、アミノ酸配列RQARV (SEQ ID NO:156)を含む。

【0256】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、1種または複数種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、切断可能リンカーは、一般式P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:157) (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；P1'はL、I、またはMである)を含有している。いくつかの態様において、切断可能リンカーは、一般式P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:158) (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；P1'はLまたはIである)を含有している。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:24)を含む。

30

【0257】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、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、切断可能リンカーは、アミノ酸配列LEAD (SEQ ID NO:22)とアミノ酸配列RQAR (SEQ ID NO:23)との組み合わせを含む。

40

【0258】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、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、切断可能リンカーは、アミノ酸配列LEAD (SEQ ID NO:22)とアミノ酸配列PAGL (SEQ ID NO:24)との組み合わせを含む。

【0259】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、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

50

、切断可能リンカーは、アミノ酸配列RQAR (SEQ ID NO:23) とアミノ酸配列PAGL (SEQ ID NO:24) との組み合わせを含む。

【0260】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、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、切断可能リンカーは、アミノ酸配列LEAD (SEQ ID NO:22) とアミノ酸配列RQAR (SEQ ID NO:23) とアミノ酸配列PAGL (SEQ ID NO:24) との組み合わせを含む。

10

【0261】

切断可能リンカーには、任意の公知のリンカーが含まれ得る。切断可能リンカーの例は、Be'liveau et al.(2009)FEBS Journal,276；公開された米国出願番号US20160194399；US20150079088；US20170204139；US20160289324；US20160122425；US20150087810；US20170081397；米国特許第US9644016号に記載されている。

【0262】

いくつかの態様において、切断可能リンカーは、
TGLEADGSPAGLGRQARVG (SEQ ID NO: 25);

TGLEADGSRQARVGPAGLG (SEQ ID NO: 26); TGSPAGLEADGSRQARVGS (SEQ ID NO: 27); TGPAGLGLEADGSRQARVG (SEQ ID NO: 28); TGRQARVBLEADGSPAGLG (SEQ ID NO: 29); TGSRQARVGPAGLEADGS (SEQ ID NO: 30); および

20

TGPAGLGSRQARVBLEADGS (SEQ ID NO: 31); GPAGLGLEPDGSRQARVG (SEQ ID NO: 104); GGSGGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO: 105); GGSGGGGLEADTGGSGGS (SEQ ID NO: 106); GSIEPDIGS (SEQ ID NO: 107); GSLEADTGS (SEQ ID NO: 108); GGSGGGGIEPDGGSGGS (SEQ ID NO: 109); GGSGGGGIEPDVGGSGGS (SEQ ID NO: 110); GGSGGGGIEPDSGGSGGS (SEQ ID NO: 111); GGSGGGGIEPDTGGSGGS (SEQ ID NO: 112); GGGSLPDGSGS (SEQ ID NO: 113); および

30

GPAGLGLEADGSRQARVG (SEQ ID NO: 114), GGEGGGGSGSGGS (SEQ ID NO: 115); GSSAGSEAGSGQAGVGS (SEQ ID NO: 116); GGSGGGGLEAEGSGGGGS (SEQ ID NO: 117); GGSGGGGIEPDPGSGGS (SEQ ID NO: 118); TGGSGGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO: 148)

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【0263】

4. 抗原結合ドメイン

40

本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み、例えば、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を少なくとも含む。いくつかの局面において、抗原結合ドメインは、または抗原結合ドメインの各々は独立に、抗体もしくは抗原結合断片、天然（またはネイティブ）同族結合パートナー、アンチカリン（改変型リポカリン）、ダーピン（Darpin）、フィノマー（Fynomer）、センチリン（Centyrin）（改変型フィブロネクチンIIIドメイン）、シスチンノットドメイン、アフィリン（Affilin）、アフィボディ（Affibody）、または改変型CH3ドメインより選択される。いくつかの態様において、天然同族結合パートナーには、TAAのネイティブ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TAAとの結合活性を示すそれらのバリエーションが含まれる。

50

【0264】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、または第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインのような抗原結合ドメインの各々は独立に、抗体またはその抗原結合断片の1コピーまたは複数コピーを含む。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、または第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインのような抗原結合ドメインの各々は独立に、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片の1コピーまたは複数コピーを含む。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、または第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインのような抗原結合ドメインの各々は独立に、単鎖抗体である。いくつかの態様において、単鎖は、scFv、scAb、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である。

10

【0265】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、または第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインのような抗原結合ドメインの各々は独立に、単鎖抗体である。いくつかの態様において、単鎖は、scFv、scAb、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である。

【0266】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、または第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインのような抗原結合ドメインの各々は独立に、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}、改変されたV_Hドメイン、または改変されたV_Kドメインを含む。V_HHは、天然のラクダ科動物の重鎖のみの抗体、重鎖のみの抗体を産生する遺伝学的に修飾された齧歯類、またはナイーブ/合成のラクダ科動物もしくはヒト化ラクダ科動物シングルドメイン抗体ライブラリーから生成され得る。V_{NAR}は、軟骨魚類の重鎖のみの抗体から生成され得る。界面改変および特異的な生殖系列ファミリーの選択を含む様々な方法が、従来のヘテロ二量体V_HドメインおよびV_Kドメインから単量体sdAbを生成するために実施されている。

20

【0267】

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は、または第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のような抗原結合ドメインの各々は独立に、TAAに結合する少なくとも1つのsdAbまたはscFvを含有している。いくつかの態様において、TAA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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、TAAに結合するscFvまたはsdAbを1つのみ含有しており、それは、Fc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側のいずれかに位置付けられていてよい。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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられた、TAAに結合する2つのscFvまたはsdAbを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、3つのscFvまたはsdAbを含有しており、そのうちの2つが、Fc領域に対してアミノ末端側またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられており、第3のものが、多重特異性ポリペプチド構築物の他方の末端に位置付けられている。

30

40

【0268】

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抗体もしくは抗原結合断片(例えば、Fv)のV_Hドメイン、および腫瘍関連抗原に結合するscFvもしくはsdAb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、抗CD3抗体もしくは抗原結合断片(例えば、Fv)のV_Lドメインを含み、任意で、腫瘍関連抗原に結合する同一のもしくは異なるscFvもしくはsdAbを含む第2のポリペプチドを含む2種のポリペプチドから形成されるか、またはそれらを含む。TAAに結合するscFvまたはsdAbは、ヘテロ二量体Fc

50

のFcポリペプチドに対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域のVH鎖もしくはVL鎖に対してカルボキシ末端側に位置付けられていてよい。多重特異性ポリペプチド構築物の第1および/または第2のポリペプチドのうちの少なくとも一方は、セクションII.5に記載される共刺激受容体に結合するCRBRまたはその鎖も含む。いくつかの態様において、共刺激受容体に結合するCRBR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、共刺激受容体に結合するCRBR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さらに形成され、少なくとも第1および第2のポリペプチドが、共刺激受容体に結合するFabの鎖（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CL）を含み、第3のポリペプチドが、共刺激受容体に結合するFabの他方の鎖（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CLのうちの他方）を含有している。

10

【0269】

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は、または第1の抗原結合ドメインおよび/もしくは第2の抗原結合ドメインのような抗原結合ドメインの各々は独立に、シングルドメイン抗体（sdAb）としての結合ドメインを含有している。

【0270】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、または第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインのような抗原結合ドメインの各々は独立に、複数の鎖を含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメインは、または第1の抗原結合ドメインおよび/もしくは第2の抗原結合ドメインのような抗原結合ドメインの各々は独立に、FABとして組み立てられたVH配列およびVL配列を含有している。

20

【0271】

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は、または第1の抗原結合ドメインおよび/もしくは第2の抗原結合ドメインのような抗原結合ドメインの各々は独立に、TAAに結合するFab抗体のVH-CH1（Fd）およびVL-CLを含有している。いくつかの態様において、VH-CH1（Fd）およびVL-CLを含有している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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側のいずれかに位置付けられていてよい、TAAに結合するVH-CH1（Fd）およびVL-CLを含有しているFab抗体を1つのみ含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、TAAに結合するVH-CH1（Fd）およびVL-CLを各々含有している2つのFab抗体断片を含有しており、一方は、Fc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、他方は、CD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。

30

【0272】

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、および腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1（Fd）もしくはVL-CLを含む第1のポリペプチド；ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカーを含み、任意で、腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片の同一のVH-CH1（Fd）もしくはVL-CLを含む第2のポリペプチド、ならびにTAAに結合するFab抗体断片のVH-CH1（Fd）もしくはVL-CLの他方を含む第3のポリペプチドを含む3種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、第2、および/または第3のポリペプチドは、セクションII.5に記載される共刺激受容体に結合するCRBRまたはその鎖（例えば、FabのVH-CH1もしくはVL-CL）も含んでいてよい。いくつかの態様において、共刺激受容体に結合するCRBR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、共刺激受容体に結合するCRBRは、Fabであり、多重特

40

50

異性ポリペプチド構築物は、第4のポリペプチドからさらに形成され、少なくとも第1および第2のポリペプチドが、共刺激受容体に結合するFabの鎖（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CL）を含み、第4のポリペプチドが、共刺激受容体に結合するFabの他方の鎖（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CLのうちの他方）を含有している。

【0273】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、または抗原結合ドメインの各々は独立に、TAAの天然（もしくはネイティブ）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、もしくはTAAとの結合活性を示すそれらのバリエーションであるか、またはそれを含む。

【0274】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、または第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインのような抗原結合ドメインの各々は独立に、同一の抗原に結合する。いくつかの態様において、TAAに結合する複数の抗原結合ドメインが存在し、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のような抗原結合ドメインの各々は、異なる抗原に結合する。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のような抗原結合ドメインの各々は、同一の腫瘍関連抗原（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のような抗原結合ドメインの各々は、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のような抗原結合ドメインの各々は、同一のTAA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、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のような抗原結合ドメインの各々は、同一のTAAの同一のエピトープに結合する。

【0275】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、またはTAAに結合する抗原結合ドメインの各々は独立に、TAAとの1価、2価、3価、または4価の結合をもたらす。いくつかの態様において、TAAとの2価の結合は、同一の抗原の同一の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、1エピトープ性）。いくつかの態様において、TAAとの2価の結合は、同一の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、2エピトープ性）。いくつかの態様において、TAAとの1価の結合は、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、1エピトープ性）。

【0276】

いくつかの態様において、TAAは、1-92-LFA-3、5T4、 $\alpha 4$ インテグリン、 αV インテグリン、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン、AGR2、抗ルイスY、アペリンJ受容体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5補体、C-242、CA9、CA19-9、（ルイスa）、炭酸脱水酵素9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132、（IL-2RG）、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5（CEA）、CEACAM6（NCA-90）、クローディン3、クローディン4、cMet、コラーゲン、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、エンドセリンB受容体（ETBR）、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSVのFタンパク質、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、葉酸受容体 α （FR α ）、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-CSF、GM-CSFR、GP IIb/IIIa受容体、Gp130、GPIIB/IIIA、GPNMB、GRP78、HER2/neu、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、ヒアルロニダーゼ、ICOS、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IgE、IgE受容体（Fc ϵ RI）、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12R β 1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27/IL27R（wsx1）、IL29、IL-31R、IL31/IL31R、IL2R、IL4、IL4R

10

20

30

40

50

、IL6、IL6R、インスリン受容体、Jaggedリガンド、Jagged1、Jagged2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、ルイスX、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、メソテリン、MRP4、MUC1、ムチン16（MUC16、CA-125）、Na/K ATPアーゼ、NGF、ニカストリン、ノッチ受容体、ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFR α 、PDGFR β 、PD-1、PD-L1、PD-L2、ホスファチジルセリン、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、スフィンゴシン-1-リン酸、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGF β 、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNF α 、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、トランスフェリン、トランスフェリン受容体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2、およびWISP-3より選択される。

【0277】

いくつかの態様において、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、腫瘍関連抗原（TAA）である葉酸受容体 α （FR α ）に結合する。例えば、抗原結合ドメインは、FR α に結合するsdAbとして結合ドメインを含有している。例示的なFR α 結合sdAbは、SEQ ID NO:120、121、および122に示される。提供された多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、前述のSEQ ID Noとの少なくとも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、FR α に結合することができる。

【0278】

いくつかの態様において、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、腫瘍関連抗原（TAA）cMETに結合する。例えば、抗原結合ドメインは、cMETに結合するsdAbとしての結合ドメインを含有している。例示的なcMET結合sdAbは、SEQ ID NO:123（米国特許第9,346,884号）に示される。提供された多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、前述のSEQ ID Noとの少なくとも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、cMETに結合することができる。

【0279】

いくつかの態様において、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、腫瘍関連抗原（TAA）B7H3に結合する。例えば、抗原結合ドメインは、B7H3に結合するscFvとしての結合ドメインを含有している。例示的なB7H3結合scFvは、SEQ ID NO:124に示される。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、VHHのようなsdAbである。例示的なB7H3結合sdAbは、SEQ ID NO:301~305のうちのいずれかに示される。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、VH-CH1（Fd）およびLCを含むFab抗体断片であるか、またはそれを含有している。例示的なB7H3 Fdは、SEQ ID NO:127に示され、例示的なB7H3 LCは、SEQ ID NO:128（PCT公開番号WO2017/030926）に示される。提供された多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、前述のSEQ ID Noのうちのいずれかとの少なくとも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、B7H3に結合することができる。

【0280】

いくつかの態様において、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、腫瘍関連抗原（TAA）CD20に結合する。いくつかの態様において、そのような抗原結合ドメインは、SEQ ID NO:189に示されるVHおよびSEQ ID NO:190に示されるVL、またはSEQ ID NO:189もしくはSEQ ID NO:190との少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、98%、もしくは99%、もしくは約85%、90%、95%、96%、97%、98%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を含有している。

例えば、抗原結合ドメインは、CD20に結合するscFvとしての結合ドメインを含有している。例示的なCD20結合scFvは、SEQ ID NO:125（米国公開番号US 2005/0123546）に示される。提供された多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、前述のSEQ ID Noのうちのいずれかとの少なくとも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、CD20に結合することができる。

【0281】

いくつかの態様において、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、腫瘍関連抗原（TAA）DLL3に結合する。例えば、抗原結合ドメインは、DLL3に結合するscFvとしての結合ドメインを含有している。例示的なDLL3結合scFvは、SEQ ID NO:126および188（米国公開番号US 2017/0037130）に示される。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、VHHのようなsdAbである。例示的なDLL3結合sdAbは、SEQ ID NO:306またはSEQ ID NO:307のうちのいずれかに示される。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、DLL3に結合するFdおよびLCを含むFab抗体断片であるか、またはそれを含有している。例示的なDLL3 FdはSEQ ID NO:133に示され、例示的なDLL3 LCはSEQ ID NO:134（米国特許番号US 8,044,178）に示される。提供された多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、前述のSEQ ID Noのうちのいずれかとの少なくとも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、DLL3に結合することができる。

【0282】

いくつかの態様において、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、腫瘍関連抗原（TAA）5T4に結合する。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、VHHのようなsdAbである。例示的な5T4結合sdAbは、SEQ ID NO:322またはSEQ ID NO:323のうちのいずれかに示される。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、5T4に結合するFdおよびLCを含むFab抗体断片であるか、またはそれを含有している。例示的な5T4 FdはSEQ ID NO:129に示され、例示的な5T4 LCはSEQ ID NO:130に示される。いくつかの態様において、抗体結合ドメインは、SEQ ID NO:167および168（米国特許番号US 8,044,178）に示されるVH-CH1（Fd）またはVL-CLを含む。提供された多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、前述のSEQ ID Noのうちのいずれかとの少なくとも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、5T4に結合することができる。

【0283】

いくつかの態様において、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、腫瘍関連抗原（TAA）gpNMBに結合する。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、FdおよびLCの鎖を含むFab断片であるか、またはそれを含有している。例示的なgpNMB FdはSEQ ID NO:131に示され、例示的なgpNMB LCはSEQ ID NO:132に示される。提供された多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメインは、または各抗原結合ドメインは独立に、前述のSEQ ID Noのうちのいずれかとの少なくとも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、gpNMBに結合することができる。

【0284】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、直接、またはリンカーを介して間接的に、Fc領域および/またはCD3結合領域に連結されている。いくつかの態様において、連結は、リンカーを介している。いくつかの態様において、リンカーは、セクションII.3に記載される可動性または非可動性のリンカーを含み得る連結ペプチド（LP）であるが、一般に、抗原結合ドメインを連結するペプチドは、切断可能リンカーではない。

【0285】

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の抗原結合ドメイン

とFc領域との間の第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の抗原結合ドメインとの間の第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の抗原結合ドメインとFc領域との間の第1の連結ペプチド(LP1)およびCD3結合領域と第2の抗原結合ドメインとの間の第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、第1の抗原結合ドメイン - LP1 - Fc領域 - リンカー - CD3結合領域 - LP2 - 第2の抗原結合ドメインという構造的配置を有する。いくつかの態様において、2つの連結ペプチドは、相互に同一ではない。

【0286】

いくつかの態様において、LP1またはLP2は、独立に、約1~20アミノ酸長のペプチドである。いくつかの態様において、LP1またはLP2は、独立に、SEQ ID NO:10~13、119、135、147、149に示されるGly-SerリンカーもしくはGGGであるか、またはそれを含むペプチドである。

【0287】

5. 共刺激受容体結合領域(CRBR)

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、提供された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細胞上に発現された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細胞の表面においてアップレギュレートされるか、誘導されるか、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、共刺激受容体の、多重特異性ポリペプチドのCRBRとの作動性の結合は、CD3の係合の後にT細胞の活性化または機能性を強化するかまたは増強するための下流シグナリングをT細胞において誘導する。いくつかの態様において、CRBRは、またはCRBRの各々は独立に、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(改変型リポカリン)、ダーピン、フィノマー、センチリン(改変型フィブロネクチン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、または改変型CH3ドメインである。

【0288】

いくつかの態様において、CRBRは、または第1のCRBRおよび第2のCRBRのようなCRBRの各々は独立に、抗体またはその抗原結合断片の1コピーまたは複数コピーを含む。いくつかの態様において、CRBRは、または第1のCRBRおよび第2のCRBRのようなCRBRの各々は独立に、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片の1コピーまたは複数コピーを含む。

【0289】

いくつかの態様において、CRBRは、または第1のCRBRおよび第2のCRBRのようなCRBRの各々は独立に、単鎖抗体である。いくつかの例において、単鎖は、scFv、scAb、シングルドメイン重鎖抗体、またはシングルドメイン軽鎖抗体である。

【0290】

いくつかの態様において、CRBRは、または第1のCRBRおよび第2のCRBRのようなCRBRの各々は独立に、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}、改変型V_Hドメイン、または改変型V_Kドメインを含む。V_HHは、天然のラクダ科動物の重鎖のみの抗体から、重鎖のみの抗体を産生する遺伝子修飾されたげっ歯類から、またはナイブ/合成のラクダ科動物もしくはヒト化ラクダ科動物シングルドメイン抗体ライブラリーから生成され得る。V_{NAR}は、軟骨魚類の重鎖のみの抗体から生成され得る。界面改変および特異的な生殖系列ファミリーの選択を含む様々な方法が、従来のヘテロ二量体のV_HドメインおよびV_Kドメインから単量体sdAbを生成するために実施されている。

【0291】

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は、または第1のCRB

10

20

30

40

50

Rおよび/もしくは第2のCRBRのようなCRBRの各々は独立に、共刺激受容体に結合する少なくとも1つのsdAbまたはscFvを含有している。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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側のいずれかに位置付けられていてよい、共刺激受容体に結合する1つのscFvまたはsdAbのみを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられた、共刺激受容体に結合する2つのscFvまたはsdAbを含有している。

【0292】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）のVHドメイン、および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；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、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）のVLドメインを含み、任意で、共刺激受容体に結合するもう1つの同一のまたは異なるscFvまたはsdAbを含む第2のポリペプチドを含む2種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側および/またはCD3結合領域のVH鎖またはVL鎖に対してカルボキシ末端側に位置付けられていてよい。多重特異性ポリペプチド構築物の第1および/または第2のポリペプチドのうちの少なくとも一方は、セクションII.4に記載される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および/または第2のポリペプチドの一部として含まれている。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さらに形成され、少なくとも第1および第2のポリペプチドが、TAAに結合するFabの鎖（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CL）を含み、第3のポリペプチドが、TAAに結合するFabの他方の鎖（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CLのうちの他方）を含有している。

【0293】

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、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抗体もしくは抗原結合断片（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；ならびにCRBRを含有しており、順に、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体もしくは抗原結合断片（例えば、Fv）のVLドメインを含む第2のポリペプチドであって、CRBRがFc領域に対してアミノ末端側および/もしくはCD3結合領域に対してC末端側に位置付けられている第2のポリペプチドを含む2種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、CRBRは、第2のポリペプチドのCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、CRBRは、第2のポリペプチドのFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、CRBRは、Fc領域に対してアミノ末端側およびCD3結合領域に対してC末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、TAAに特異的な第1および第2の抗原結合ドメインは、同一である。いくつかの態様において、TAAに特異的な第1および第2の抗原結合ドメインは、異なる。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、同一のTAAの異なるもしくはオーバーラップしないエピトープに結合し、かつ/または同一のTAAとの結合について競合する。

【0294】

いくつかの態様において、CRBRは、または第1のCRBRおよび/もしくは第2のCRBRの

ようなCRBRの各々は独立に、複数の鎖を含有している。いくつかの態様において、CRBRは、または第1のCRBRおよび/もしくは第2のCRBRのようなCRBRの各々は独立に、FABとして組み立てられたVH配列およびVL配列を含有している。

【0295】

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は、または第1のCRBRおよび/もしくは第2のCRBRのようなCRBRの各々は独立に、共刺激受容体に結合するFab抗体のVH-CH1 (Fd) およびVL-CLを含有している。いくつかの態様において、VH-CH1 (Fd) およびVL-CLを含有している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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側のいずれかに位置付けられていてよい、共刺激受容体に結合するVH-CH1 (Fd) またはVL-CLを含有している1つのFab抗体のみを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、共刺激受容体に結合するVH-CH1 (Fd) およびVL-CLを各々含有している2つのFab抗体断片を含有しており、一方はFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、他方はCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。

【0296】

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) もしくはVL-CLを含む第1のポリペプチド；ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカーを含み、任意で、共刺激受容体に結合するFab抗体断片の同一のVH-CH1 (Fd) もしくはVL-CLを含む第2のポリペプチド、共刺激受容体に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) もしくはVL-CLのうちの他方を含む第3のポリペプチドを含む3種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、第2、および/または第3のポリペプチドは、セクションII.4に記載されるTAAに結合する抗原結合ドメインまたはその鎖も含んでいてよい。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さらに形成され、少なくとも第1および第2のポリペプチドが、TAAに結合するFabの鎖（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CL）を含み、第4のポリペプチドが、TAAに結合するFabの他方の鎖（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CLのうちの他方）を含有している。

【0297】

いくつかの態様において、CRBRは、またはCRBRの各々は独立に、共刺激受容体の天然（ネイティブ）同族結合パートナー（例えば、天然リガンド）、もしくは共刺激受容体との結合活性を示すそれらのバリエーションであるか、またはそれを含む。

【0298】

いくつかの態様において、提供された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細胞において発現された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複数のCRBRが存在し、第1のCRBRおよび第2のCRBRのようなCRBRの各々は、同一の共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、第1のCRBRおよびCRBRのようなCRBRの各々は、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、第1のCRBRおよび第2のCRBRのようなCRBRの各々は、同一の共刺激受容体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およびCRBRのようなCRBRの各々は、同一の共刺激受容体の同一のエピトープに結合する。

【0299】

いくつかの態様において、共刺激受容体に結合するCRBRは、またはCRBRの各々は独立に、共刺激受容体との1価、2価、3価、または4価の結合をもたらす。

【0300】

いくつかの態様において、共刺激受容体は、対象の初代T細胞のようなT細胞において発現されている。いくつかの態様において、共刺激受容体は、ヒト対象の初代ヒトT細胞のようなヒトT細胞において発現されている。

【0301】

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

【0302】

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）、膜貫通型活性化因子およびCAML相互作用因子（TACI）、ならびにNKG2Dである。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、またはGITRより選択される。

【0303】

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。

【0304】

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作動性の結合分子であるか、またはそれを含む。CRBRは、共刺激受容体に結合し、受容体の天然リガンドによって開始されるか、誘導されるか、または刺激されるのと類似または同一の反応または活性を開始するか、誘導するか、または刺激することができる。いくつかの局面において、CRBRの共刺激受容体との結合は、受容体の天然リガンドによって開始されるか、誘導されるか、または刺激されるシグナルの5%超、10%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、または100%超である下流シグナルを誘導するかまたは刺激する。

【0305】

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、もしくは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、もしくはGITRに結合する抗体またはその断片である。具体的な態様において、共刺激結合領域は、シングルドメイン抗体またはscFvのような単鎖断片である。41BB、OX40、およびGITRに結合する例示的なポリペプチドは、それぞれ、PCT公開番号WO2017123650、WO2017123673、およびWO2017015623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、PCT公開番号WO2017123650、WO2017123673、およびWO2017015623に記載されたもののような、共刺激受容体に結合するシングルドメイン抗体（sdAb）である。

【0306】

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）、膜貫通型活性化因子およびCAML相互作用因子（TACI）、NKG2Dに結合するか、またはそれらの天然同族結合パートナーを含む。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

10

20

30

40

50

、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、またはそれらの機能的断片より選択される。

【0307】

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。具体的な例において、4-1BBに結合するCRBRは、シングルドメイン抗体である。いくつかの態様において、sdAbは、(SEQ ID NO:308に示される) CDR1 GFSFSINAMG、(SEQ ID NO:309に示される) CDR2 AIESGRNTV、および (SEQ ID NO:310に示される) CDR3 LKGNRVVSPSVAYを含有している。41BBターゲティングsdAbの例は、PCT公開番号WO2017123650に記載されている。

10

【0308】

CRBRの例示的な配列は、表2に示される。

【0309】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、共刺激受容体41BBに結合する。いくつかの例において、CRBRは、sdAbまたはVHおよびVLを含有している断片 (例えば、scFv) のような、41BBに特異的であるかもしくは41BBに結合する抗体もしくは抗原結合断片であるか、またはそれを含有している。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、41BBの天然リガンドであるか、またはその機能的結合断片である。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、アンチカリンである。例示的な41BB結合CRBRは、SEQ ID NO:191~215および321のうちのいずれかに示される。いくつかの態様において、4-1BB結合CRBRは、例えば、SEQ ID NO:191に示されるUniProt番号P41273のアミノ酸50~254に相当するような細胞外ドメインもしくはその短縮部分、またはSEQ ID NO:207~214のうちのいずれかに示される短縮部分もしくはその断片を含有している41BBリガンド (41BBL) の機能的断片である。いくつかの態様において、4-1BB結合CRBRは、SEQ ID NO:198~206のうちのいずれか1つに示されるアンチカリンである。いくつかの態様において、4-1BB結合CRBRは、VHHのようなsdAbである。いくつかの態様において、VHHのようなsdAbは、それぞれ、SEQ ID No:308、309、および310に示される配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3を含有している。sdAbのような41BB結合CRBRは、SEQ ID NO:215に示される配列を含み得る。sdAbのような41BB結合CRBRは、SEQ ID NO:321に示される配列を含み得る。いくつかの態様において、4-1BB結合ドメインは、VHおよびVLがリンカーによって分離されている単鎖断片のような、VHおよびVLを含有している抗原結合抗体断片、例えば、scFvを含有している。いくつかの態様において、41BB結合CRBRは、SEQ ID NO:192、194、および196のうちのいずれかに示されるVHと、SEQ ID NO:193、195、または197のうちのいずれかに示されるVLとを含有している。提供された多重特異性ポリペプチド構築物のCRBRは、または各CRBRは独立に、前述のSEQ ID Noのうちのいずれかとの少なくとも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、41BBに結合することができる。

20

30

【0310】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、共刺激受容体OX40に結合する。いくつかの例において、CRBRは、sdAbまたはVHおよびVLを含有している断片 (例えば、scFv) のような、OX40に特異的であるかもしくはOX40に結合する抗体もしくは抗原結合断片であるか、またはそれを含有している。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、OX40の天然リガンドであるか、またはその機能的結合断片である。そのようなOX40結合CRBRの例は、SEQ ID NO:216~225のうちのいずれかに示される。いくつかの態様において、OX40結合CRBRは、SEQ ID NO:221および223のうちのいずれかに示されるVHと、SEQ ID NO:222および224のうちのいずれかに示されるVLとを含有している。提供された多重特異性ポリペプチド構築物のCRBRは、または各CRBRは独立に、前述のSEQ ID Noのうちのいずれ

40

50

かとの少なくとも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、OX40に結合することができる。

【0311】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、共刺激受容体GITRに結合する。いくつかの例において、CRBRは、sdAbもしくはVHおよびVLを含有している断片（例えば、scFv）のようなGITRに特異的であるかもしくはGITRに結合する抗体もしくは抗原結合断片であるか、またはそれを含有している。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、GITRの天然リガンドであるか、またはその機能的結合断片である。そのようなGITR結合CRBRの例は、SEQ ID NO:226~235のうちのいずれかに示される。いくつかの態様において、GITR結合CRBRは、SEQ ID NO:227、229、233のうちのいずれかに示されるVHと、SEQ ID NO:228、230、および234のうちのいずれかに示されるVLとを含有している。提供された多重特異性ポリペプチド構築物のCRBRは、または各CRBRは独立に、前述のSEQ ID Noのうちのいずれかとの少なくとも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、GITRに結合することができる。

10

【0312】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、共刺激受容体CD27に結合する。いくつかの例において、CRBRは、sdAbもしくはVHおよびVLを含有している断片（例えば、scFv）のようなCD27に特異的であるかもしくはCD27に結合する抗体もしくは抗原結合断片であるか、またはそれを含有している。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、CD27の天然リガンドであるか、またはその機能的結合断片である。そのようなCD27結合CRBRは、SEQ ID NO:236~238のうちのいずれかに示される。いくつかの態様において、CD27結合CRBRは、SEQ ID NO:237に示されるVHと、SEQ ID NO:238に示されるVLとを含有している。提供された多重特異性ポリペプチド構築物のCRBRは、または各CRBRは独立に、前述のSEQ ID Noのうちのいずれかとの少なくとも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、CD27に結合することができる。

20

30

【0313】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、共刺激受容体ICOSに結合する。いくつかの例において、CRBRは、sdAbもしくはVHおよびVLを含有している断片（例えば、scFv）のようなICOSに特異的であるかもしくはICOSに結合する抗体もしくは抗原結合断片であるか、またはそれを含有している。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、ICOSの天然リガンドであるか、またはその機能的結合断片である。例示的なICOS結合CRBR配列は、SEQ ID NO:239に示される。

【0314】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、共刺激受容体CD28に結合する。いくつかの例において、CRBRは、sdAbもしくはVHおよびVLを含有している断片（例えば、scFv）のようなCD28に特異的であるかもしくはCD28に結合する抗体もしくは抗原結合断片であるか、またはそれを含有している。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBRは、または各CRBRは独立に、CD28の天然リガンドであるか、またはその機能的結合断片である。例示的なCD28結合CRBR配列は、SEQ ID NO:240に示される。

40

【0315】

（表2）例示的なCRBR配列

50

CRBR	フォーマット	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	191
PF-05082566	VH	US 2012/0237498 (SEQ ID NO: 43)	192
	VL	US 2012/0237498 (SEQ ID NO: 45)	193
BMS663513	VH	WO 2005/035584 (SEQ ID NO: 9)	194
	VL	WO 2005/035584 (SEQ ID NO: 6)	195
MSB7	VH	US 2017/0226215 (SEQ ID NO: 138)	196
	VL	US 2017/0226215 (SEQ ID NO: 28)	197
41BB アンチカリン	アンチカリン	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 12)	198
41BB アンチカリン	アンチカリン	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 13)	199
41BB アンチカリン	アンチカリン	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 14)	200
41BB アンチカリン	アンチカリン	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 15)	201
41BB アンチカリン	アンチカリン	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 16)	202
41BB アンチカリン	アンチカリン	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 17)	203
41BB アンチカリン	アンチカリン	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 18)	204
41BB アンチカリン	アンチカリン	WO 2016/177762 SEQ ID NO: 19)	205
41BB アンチカリン	アンチカリン	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 20)	206
ヒト41BBLの 71～254	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 3)	207
ヒト41BBLの 85～254	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 4)	208
ヒト41BBLの 80～254	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 5)	209

10

20

30

40

50

ヒト41BBLの 52～254	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 6)	210
ヒト41BBLの 71～248	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 7)	211
ヒト41BBLの 85～248	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 8)	212
ヒト41BBLの 80～248	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 9)	213
ヒト41BBLの 52～248	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 10)	214
41BB sdAb	sdAb	US 2017/0198050	215
41BB sdAb	sdAb		321
OX40 結合CRBR配列			
OX40 リガンド	天然リガンド	UniProt アクセッション番号P23510	216
OX40 リガンド	天然リガンド	US 7,959,925 (SEQ ID NO: 2)	217
ヒトOX40L: 51-183	天然リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 11)	218
ヒト Ox40L: 51-183 N90D	天然リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 12)	219
ヒト OX40L: 52-183	天然リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 13)	220
1A07	VH	US 2015/0307617 (SEQ ID NO: 56)	221
	VL	US 2015/0307617 (SEQ ID NO: 59)	222
1949	VH	WO 2016/179517 (SEQ ID NO: 16)	223
	VL	WO 2016/179517	224
1D10v1	sdAb	US 9,006,399	225
GITR 結合CRBR配列			
GITR リガンド	天然リガンド	UniProt 番号 Q9UNG2	226
36E5	VH	US 2014/0348841 (SEQ ID NO: 104)	227
	VL	US 2014/0348841 (SEQ ID NO: 105)	228
TRX-518	VH	US 2013/0183321 (SEQ ID NO: 54)	229
	VL	US 2013/0183321 (SEQ ID NO: 44)	230
5H7v2	VH	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 282)	231
	VL	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 134)	232
41G5v2	VH	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 312)	233
	VL	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 124)	234
C06v3	sdAb	US 2017/0022284 (SEQ ID NO: 59)	235
CD27 結合CRBR配列			
CD70-ECD	天然リガンド	UniProt 番号 P32970 ; 残基39-193として示されるECD	236
1F5	VH	US 2011/0274685	237
	VL	US 2011/0274685	238
CD28 結合CRBR配列			
CD28 sdAb	sdAb		239
ICOS 結合CRBR配列			
ICOS sdAb	sdAb		240

【0316】

いくつかの態様において、CRBRは、直接、またはリンカーを介して間接的に、Fc領域および/またはCD3結合領域に連結されている。いくつかの態様において、連結は、リンカーを介している。いくつかの態様において、リンカーは、セクションII.3に記載される可動性または非可動性のリンカーを含み得る連結ペプチド（LP）であるが、一般に、CRBRまたは領域を連結するペプチドは、切断可能リンカーではない。

【0317】

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領域との間の連結ペプチド（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

10

20

30

40

50

、CD3結合領域とCRBRとの間の連結ペプチド（LP）を含む。

【0318】

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、複数の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、第1のCRBRとFc領域との間の第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CRBRとの間の第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CRBRとFc領域との間の第1の連結ペプチド（LP1）およびCD3結合領域と第2のCRBRとの間の第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、CRBR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 - CRBRおよび/または抗原結合ドメインという構造的配置を有する。いくつかの態様において、2つの連結ペプチドは、相互に同一ではない。

10

【0319】

いくつかの態様において、LP（例えば、LP1またはLP2）は、独立に、約1~20アミノ酸長のペプチドである。いくつかの態様において、LP1またはLP2は、独立に、SEQ ID NO:10~13、119、135、147、149に示されるGly-SerリンカーもしくはGG5であるか、またはそれを含むペプチドである。

【0320】

6. 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、提供された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細胞において発現された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細胞の表面においてアップレギュレートされるか、誘導されるか、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阻止し、それによって、IRBRが結合する細胞、例えば、T細胞における抑制シグナルを低下させるか、抑止するか、または減少させる。いくつかの態様において、IRBRは、またはIRBRの各々は独立に、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（改変型リポカリン）、ダーピン、フィノマー、センチリン（改変型フィブロネクチン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、または改変型CH3ドメインである。

20

30

【0321】

いくつかの態様において、IRBRは、または第1のIRBRおよび第2のIRBRのようなIRBRの各々は独立に、抗体またはその抗原結合断片の1コピーまたは複数コピーを含む。いくつかの態様において、IRBRは、または第1のIRBRおよび第2のIRBRのようなIRBRの各々は独立に、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片の1コピーまたは複数コピーを含む。

【0322】

いくつかの態様において、IRBRは、または第1のIRBRおよび第2のIRBRのようなIRBRの各々は独立に、単鎖抗体である。いくつかの例において、単鎖は、scFv、scAb、シングルドメイン重鎖抗体、またはシングルドメイン軽鎖抗体である。

40

【0323】

いくつかの態様において、IRBRは、または第1のIRBRおよび第2のIRBRのようなIRBRの各々は独立に、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}、改変型V_Hドメイン、または改変型V_Kドメインを含む。V_HHは、ラクダ科動物の重鎖のみの抗体から、重鎖のみの抗体を産生する遺伝子修飾されたげっ歯類から、またはナイーブ/合成のラクダ科動物もしくはヒト化ラクダ科動物シングルドメイン抗体ライブラリーから生成され得る。V_{NAR}は、軟骨魚類の重鎖のみの抗体から生成され得る。界面改変および特異的な生殖系列ファミリーの選択を含む様々な方法が、従来のヘテロ二量体のV_HD

50

メインおよびV_Kドメインから単量体sdAbを生成するために実施されている。

【0324】

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は、または第1のIRBRおよび/もしくは第2のIRBRのようなIRBRの各々は独立に、抑制性受容体に結合する少なくとも1つのsdAbまたはscFvを含有している。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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側のいずれかに位置付けられていてよい、抑制性受容体に結合する1つのscFvまたはsdAbのみを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられた、抑制性受容体に結合する2つのscFvまたはsdAbを含有している。

10

【0325】

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抗体もしくは抗原結合断片（例えば、Fv）のVHドメイン、および抑制性受容体に結合するscFvもしくはsdAb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、抗CD3抗体もしくは抗原結合断片（例えば、Fv）のVLドメインを含み、任意で、抑制性受容体に結合する別の同一のもしくは異なるscFvもしくはsdAbを含む第2のポリペプチドを含む2種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側および/またはCD3結合領域のVH鎖もしくはVL鎖に対してカルボキシ末端側に位置付けられていてよい。多重特異性ポリペプチド構築物の第1および/または第2のポリペプチドのうちの少なくとも一方は、セクションII.4に記載される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さらに形成され、少なくとも第1および第2のポリペプチドが、TAAに結合するFabの鎖（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CL）を含み、第3のポリペプチドが、TAAに結合するFabの他方の鎖（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CLのうちの他方）を含有している。

20

30

【0326】

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、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抗体もしくは抗原結合断片（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；ならびにIRBRを含有しており、順に、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体もしくは抗原結合断片（例えば、Fv）のVLドメインを含む第2のポリペプチドであって、IRBRがFc領域に対してアミノ末端側および/もしくはCD3結合領域に対してC末端側に位置付けられている第2のポリペプチドを含む2種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、IRBRは、第2のポリペプチドのCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、IRBRは、第2のポリペプチドのFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、IRBRは、Fc領域に対してアミノ末端側およびCD3結合領域に対してC末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、第1および第2の抗原結合ドメインは、同一のTAAに特異的である。いくつかの態様において、第1および第2の抗原結合ドメインは、異なるTAAに特異的である。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、同一のTAAの、異なるかもしくはオーバーラップしないエピトープに

40

50

結合し、かつ/または同一のTAAとの結合について競合する。

【0327】

いくつかの態様において、IRBRは、または第1のIRBRおよび/もしくは第2のIRBRのようなIRBRの各々は独立に、複数の鎖を含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のIRBRは、または第1のIRBRおよび/もしくは第2のIRBRのようなIRBRの各々は独立に、FABとして組み立てられたVH配列およびVL配列を含有している。

【0328】

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は、または第1の抗原結合ドメインおよび/もしくは第2の抗原結合ドメインのような抗原結合ドメインの各々は独立に、抑制性受容体に結合するFab抗体のVH-CH1 (Fd) およびVL-CLを含有している。いくつかの態様において、VH-CH1 (Fd) およびVL-CLを含有している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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側のいずれかに位置付けられていてよい、抑制性受容体に結合するVH-CH1 (Fd) またはVL-CLを含有している1つのFab抗体のみを含有している。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、抑制性受容体に結合するVH-CH1 (Fd) およびVL-CLを各々含有している2つのFab抗体断片を含有しており、一方はFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、他方はCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。

【0329】

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) もしくはVL-CLを含む第1のポリペプチド；ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカーを含み、任意で、抑制性受容体に結合するFab抗体断片の同一のVH-CH1 (Fd) もしくはVL-CLを含む第2のポリペプチド、ならびに抑制性受容体に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) もしくはVL-CLのうちの他方を含む第3のポリペプチドを含む3種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、第2、および/または第3のポリペプチドは、セクションII.4に記載されるTAAに結合する抗原結合ドメインまたはその鎖も含んでいてよい。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さらに形成され、少なくとも第1および第2のポリペプチドが、TAAに結合するFabの鎖（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CL）を含み、第4のポリペプチドが、TAAに結合するFabの他方の鎖（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CLのうちの他方）を含有している。

【0330】

いくつかの態様において、IRBRは、またはIRBRの各々は独立に、抑制性受容体の天然（ネイティブ）同族結合パートナー（例えば、天然リガンド）もしくは抑制性受容体との結合活性を示すそのバリエーションであるか、またはそれを含む。

【0331】

いくつかの態様において、提供された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細胞において発現された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複数のIRBRが存在し、第1のIRBRおよび第2のIRBRのようなIRBRの各々は、同一の共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、第1のIRBRおよび第2のIRBRのようなIRBRの各々は、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、第1のIRBRおよび第2のIRBRのようなIRBRの各々は、同一の抑制性受容体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、第1のIRBRおよび第2のIRBRのようなIRBRの各々は、同一の抑制性受容体の同一のエピトープに結合する。

【0332】

いくつかの態様において、抑制性受容体に結合するIRBRは、またはIRBRの各々は独立に、抑制性受容体との1価、2価、3価、または4価の結合をもたらす。

【0333】

いくつかの態様において、抑制性受容体は、対象の初代T細胞のようなT細胞において発現されている。いくつかの態様において、抑制性受容体は、ヒト対象の初代ヒトT細胞のようなヒトT細胞において発現されている。

【0334】

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。

10

【0335】

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）、TIGIT（T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains）、VISTA（V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation）、TIM3（T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3）、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。具体的な態様において、抗体または抗原結合断片は、ヒト化またはヒトである。

20

【0336】

いくつかの例において、共刺激受容体結合領域（CRBR）は、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、もしくはTIM3に結合するか、またはそれらの天然同族結合パートナーを含む。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、またはそれらの機能的断片より選択される。

【0337】

いくつかの例において、IRBRは、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、またはTIM3のような抑制性受容体に結合する抗体の可変軽（VL）鎖および可変重（VH）鎖を含有しているscFvのような抗体断片を含有している。いくつかの例において、IRBRは、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、またはTIM3のような抑制性受容体に特異的に結合するシングルドメイン抗体またはVHHドメインを含有している（例えば、PCT公開番号W02018068695またはW02018068201を参照すること）。

30

【0338】

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。

【0339】

いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO:243もしくは251～256のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:243もしくは251～256のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有し、PD-1に結合するアミノ酸配列に含有されている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、またはそれを含有している。

40

【0340】

いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO:243に示されるVHHドメイン、もしくはSEQ ID NO:243に示されるVHH領域アミノ酸との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有し、PD-1に結合するアミノ酸配列に含有されているCDR1、CDR2、CDR3を含有しているVHHドメインであるか、またはそれを含有している。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO:243に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:243に示されるアミノ酸との少なくとも

50

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有し、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、またはそれを含有している。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO:243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VHHドメインであるか、またはそれを含有している。

【0341】

いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO:268、272、または273のうちのいずれかに示されるCDR1、SEQ ID NO:278に示されるCDR2、およびSEQ ID NO:283に示されるCDR3を含むVHHドメインを有する。

【0342】

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:272、278、および283に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有している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:268、278、および283に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有している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:273、278、および283に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有しているVHHドメインを有する。

【0343】

いくつかの局面において、IRBRは、SEQ ID NO:251~267のうちのいずれかより選択されるVHHアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:251~267のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有し、PD-1に結合するアミノ酸配列に含有されているCDR1、CDR2、およびCDR3を含有しているVHHドメインであるか、またはそれを含有している。

【0344】

いくつかのケースにおいて、IRBRは、SEQ ID NO:251~267のうちのいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:251~267のうちのいずれかより選択されるVHH領域アミノ酸との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、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ドメインを含有している。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO:251~267のうちのいずれかに示される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、またはそれを含有している。

【0345】

いくつかの態様において、1つまたは複数のIRBRは、直接、またはリンカーを介して間接的に、Fc領域および/またはCD3結合領域に連結されている。いくつかの態様において、連結は、リンカーを介している。いくつかの態様において、リンカーは、セクションII.3に記載される可動性または非可動性のリンカーを含み得る連結ペプチド（LP）であるが、一般に、IRBRまたは領域を連結するペプチドは、切断可能リンカーではない。

【0346】

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領域との間の連結ペプチド（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との間の連結ペプチド（LP）を含む。

【0347】

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、複数の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領域との間の第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との間の第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領域との間の第1の連結ペプチド（LP1）およびCD3結合領域と第2のIRBRとの間の第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、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

10

20

30

40

50

- LP2 - IRBRおよび/または抗原結合ドメインという構造的配置を有する。いくつかの態様において、2つの連結ペプチドは、相互に同一ではない。

【0348】

いくつかの態様において、LP（例えば、LP1またはLP2）は、独立に、約1〜20アミノ酸長のペプチドである。いくつかの態様において、LP1またはLP2は、独立に、SEQ ID NO:10〜13、119、135、147、149に示されるGly-SerリンカーもしくはGGGであるか、またはそれを含むペプチドである。

【0349】

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のうちの一方は、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側に位置付けられており、CRBRまたはIRBRのうちの他方は、CD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。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異なるポリペプチド上に存在し、ポリペプチドのうちの少なくとも一方は、TAAに特異的な少なくとも1つの抗原結合ドメインも含有している。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一のポリペプチド（第1のポリペプチド）上に存在し、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他方の（または第2の）ポリペプチド上にある。

【0350】

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種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、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み；第2のポリペプチドは、順に、IRBRまたはCRBRのうちの一方、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、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のうちの他方を含む。いくつかの態様において、IRBRは、第2のポリペプチドのCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられており、CRBRは、第2のポリペプチドのFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、IRBRは、第2のポリペプチドのFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、CRBRは、第2のポリペプチドのCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている。いくつかの態様において、第1および第2の抗原結合ドメインは、同一のTAAに特異的である。いくつかの態様において、第1および第2の抗原結合ドメインは、異なるTAAに特異的である。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、同一のTAAの、異なるかもしくはオーバーラップしないエピトープに結合し、かつ/または同一のTAAとの結合について競合する。

【0351】

IRBRを含む多重特異性ポリペプチド構築物の例示的なフォーマットは、図18Aおよび18Bに示される。

【0352】

III. 薬学的組成物

提供された多重特異性ポリペプチド構築物のいずれかの組成物が、本明細書中に提供される。本開示による治療用エンティティの投与は、改善された移入、送達、耐性等を提供するために製剤へ組み入れられる適当な担体、賦形剤、およびその他の作用物質と共に投与されることが理解されるであろう。多数の適切な製剤が、全ての薬剤師に公知の処方集：Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1975))、特に、その中のBlaug, Seymourによるチャプター87に見出され得る。これらの製剤には、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ロウ、油、脂質、

10

20

30

40

50

(Lipofectin (商標) のような) 脂質 (陽イオン性または陰イオン性) 含有小胞、DNA コンジュゲート、無水吸収ペースト、水中油型乳濁液、油中水型乳濁液、カーボワックス (carbowax) (様々な分子量のポリエチレングリコール)、半固体ゲル、およびカーボワックスを含有している半固体混合物が含まれる。製剤中の活性成分が、製剤によって不活化されず、製剤が、投与ルートと生理学的に適合性であって、容認されるものであれば、上記の混合物は、いずれも、本開示による処置および治療において適切であり得る。薬剤師に周知の製剤、賦形剤、および担体に関する付加的な情報については、Baldrick P. 「Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance.」 Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8(2000)、Wang W. 「Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals.」 Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60(2000)、Charman WN 「Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts.」 J Pharm Sci. 89(8):967-78(2000)、Powell et al. 「Compendium of excipients for parenteral formulations」 PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311(1998)、およびその中の引用も参照すること。

10

【0353】

いくつかの態様において、本明細書中で治療薬と集散的に呼ばれる多重特異性ポリペプチド構築物、コンジュゲートされた多重特異性ポリペプチド構築物、およびそれらの組成物、ならびにそれらの誘導体、断片、類似体、および相同体を、投与のために適当な薬学的組成物へ組み入れることができる。そのような組成物の調製に關与する原理および考察、ならびに成分の選択における案内は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; および Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York に提供されている。

20

【0354】

そのような組成物は、典型的には、多重特異性ポリペプチド構築物またはそのコンジュゲートと薬学的に許容される担体とを含む。多重特異性ポリペプチド構築物が抗体の断片を含む場合、標的タンパク質に特異的に結合する抗体の最も小さい断片を使用することができる。例えば、抗体の可変領域配列に基づき、抗体の標的タンパク質配列に結合する能力を保持しているペプチド分子を設計することができる。そのようなペプチドは、化学的に合成され、かつ/または組換えDNAテクノロジーによって作製され得る (例えば、Marsico et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893(1993)を参照すること)。

30

【0355】

本明細書中で使用されるように、「薬学的に許容される担体」という用語には、薬学的投与と適合性の全ての任意の溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤、吸収遅延剤等が含まれるものとする。適当な担体は、参照によって本明細書中に組み入れられる、当技術領域における標準的な参考書、Remington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に記載されている。そのような担体または希釈剤の適当な例には、水、生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが含まれるが、これらに限定されるわけではない。リポソーム、および不揮発性油のような非水性媒体も、使用され得る。薬理活性物質のための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。任意の従来の媒体または作用物質が、活性化合物と非適合性でない限り、組成物中に使用されることが企図される。

40

【0356】

インビボ投与のために使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜による濾過によって容易に達成される。

【0357】

本開示の薬学的組成物は、その意図された投与ルートと適合性であるよう製剤化される。投与ルートの例には、非経口投与、例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、経口投

50

与（例えば、吸入）、経皮（即ち、局所）投与、経粘膜投与、および直腸投与が含まれる。非経口適用、皮内適用、または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含んでよい：注射用水、生理食塩水溶液、不揮発性油、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、またはその他の合成溶媒のような無菌の希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンのような抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸ナトリウムのような抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸（EDTA）のようなキレート剤；酢酸、クエン酸、またはリン酸のような緩衝液、および塩化ナトリウムまたはデキストロースのような浸透圧の調整のための薬剤。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基によって調整され得る。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチックから作製された、アンプル、使い捨て注射器、または複数回投与バイアルに封入され得る。

10

【0358】

注射可能な使用のために適当な薬学的組成物には、無菌の水性溶液（水溶性）もしくは分散液、または無菌の注射可能な溶液もしくは分散液の即時調製のための無菌の粉末が含まれる。静脈内投与のため、適当な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, N.J.）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が含まれる。全てのケースにおいて、組成物は、無菌でなければならず、容易な注射可能性が存在する程度に流動性であるべきである。それは、製造および保管の条件の下で安定していなければならない。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）、ならびにそれらの適当な混合物を含有している溶媒または分散媒であり得る。適度の流動性は、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散液のケースにおいては必要とされる粒子サイズの維持によって、そして界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、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、チメロサル等によって達成され得る。多くのケースにおいて、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールのような多価アルコール、塩化ナトリウムを組成物中に含めることが適当であろう。注射可能組成物の延長された吸収は、吸収を遅延させる薬剤、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めることによってもたらされ得る。

20

【0359】

無菌の注射可能溶液は、必要に応じて、上に列挙された成分のうちの一つまたは組み合わせと共に、必要とされる量の活性化合物を、適切な溶媒に組み入れた後、濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散液は、基本の分散媒および上に列挙されたもののうち必要な他の成分を含有している無菌の媒体に、活性化合物を組み入れることによって調製される。無菌の注射可能溶液の調製のための無菌の粉末のケースにおいて、調製の方法は、事前に滅菌濾過された溶液から、活性成分+付加的な所望の成分の粉末を与える真空乾燥および凍結乾燥である。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を使用した滅菌は、凍結乾燥および再生の前または後のいずれかに実施され得る。非経口投与用の組成物は、凍結乾燥形態で保管されてもよいしまたは溶液で保管されてもよい。さらに、非経口組成物は、一般に、無菌のアクセスポートを有する容器、例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能な栓を有するバイアルに置かれる。

30

40

【0360】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、経口、経皮、吸入、静脈内、動脈内、筋肉内、創傷部位への直接適用、手術部位への適用、腹腔内、坐剤、皮下、皮内、経皮、噴霧、胸膜内、脳室内、関節内、眼内、または脊髄内を含む任意のルートを通して、対象へ投与される。

【0361】

経口組成物は、一般に、不活性の希釈剤または食用担体を含む。それらは、ゼラチンカプセルに封入されてもよいし、または錠剤へと圧縮されてもよい。経口治療的投与のため、活性化合物は、錠剤、トローチ、またはカプセルの形態に、賦形剤と共に組み入れられ

50

、使用され得る。経口組成物は、液体担体中の化合物が口内に適用され、含嗽され、嚥出されるかまたは嚥下される、口内洗浄液として使用するため、液体担体を使用して調製されてもよい。薬学的に適合性の結合剤および/または補助材料が、組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸薬、カプセル、トローチ等は、以下の成分または類似した性質の化合物のいずれかを含有してよい：結晶セルロース、トラガントゴム、もしくはゼラチンのような結合剤；デンプンもしくは乳糖のような賦形剤、アルギン酸、プリモゲル（Primogel）、もしくはコーンスターチのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムもしくはステロテス（Sterotes）のような滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素のような流動性改善剤；シヨ糖もしくはサッカリンのような甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ風味のような風味剤。

10

【0362】

吸入による投与のため、多重特異性ポリペプチド構築物は、適当な噴霧剤、例えば、二酸化炭素のような気体を含有している加圧容器もしくはディスペンサー、または噴霧器からエアロゾルスプレーの形態で送達される。

【0363】

全身投与は、経粘膜または経皮の手段によることもできる。経粘膜投与または経皮投与のため、浸透すべき閥門にとって適切な浸透剤が、製剤中に使用される。そのような浸透剤は、当技術分野において一般に公知であり、例えば、経粘膜投与の場合、界面活性剤、胆汁酸、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、点鼻薬または坐剤の使用を通して達成され得る。経皮投与の場合、活性化化合物は、当技術分野において一般に公知の軟膏、膏薬、ゲル、またはクリームに製剤化される。

20

【0364】

化合物は、直腸送達のため、（例えば、カカオ脂およびその他のグリセリドのような従来の坐剤基剤を含む）坐剤または停留浣腸の形態に調製されてもよい。

【0365】

一つの態様において、治療薬は、インプラントおよびマイクロカプセル送達系を含む、徐放性/コントロールドリリース製剤のような、身体からの迅速な排除から化合物を保護する担体によって調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような生分解性の生体適合性ポリマーが使用され得る。そのような製剤の調製の方法は、当業者に明白であろう。

30

【0366】

例えば、治療薬は、コアセルベーション技術によって、もしくは界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）、またはマクロエマルジョンに捕捉されてもよい。

【0367】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、薬学的に許容される賦形剤、例えば、増量剤、結合剤、コーティング、保存剤、滑沢剤、風味剤、甘味剤、着色剤、溶媒、緩衝剤、キレート剤、または安定剤を含む。薬学的に許容される増量剤の例には、セルロース、第二リン酸カルシウム、炭酸カルシウム、結晶セルロース、シヨ糖、乳糖、グルコース、マンニトール、ソルビトール、マルトール、アルファ化デンプン、コーンスターチ、またはジャガイモデンプンが含まれる。薬学的に許容される結合剤の例には、ポリビニルピロリドン、デンプン、乳糖、キシリトール、ソルビトール、マルチトール、ゼラチン、シヨ糖、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、またはセルロースが含まれる。薬学的に許容されるコーティングの例には、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、シェラック、トウモロコシタンパク質ゼイン、またはゼラチンが含まれる。薬学的に許容される崩壊剤の例には、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロース、またはデンプングリコール酸ナトリウムが含まれる。薬学的に許容される滑沢剤の例には、ポリエチレングリコール、ステアリン酸マグネシウム、またはステアリン酸が含まれる。薬学的に

40

50

許容される保存剤の例には、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸、またはソルビン酸が含まれる。薬学的に許容される甘味剤の例には、ショ糖、サッカリン、アスパルテーム、またはソルビトールが含まれる。薬学的に許容される緩衝剤の例には、炭酸、クエン酸、グルコン酸、酢酸、リン酸、または酒石酸が含まれる。

【0368】

徐放性調製物が調製されてもよい。徐放性調製物の適当な例には、成形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である、抗体を含有している固体疎水性ポリマーの半透マトリックスが含まれる。いくつかの態様において、薬学的組成物は、注射可能マイクロスフェア、生体侵食性粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸、ポリグリコール酸）、ビーズ、またはリポソームのような生成物のコントロールドリリースまたは徐放のための作用物質をさらに含む。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸およびγエチル-L-グルタミン酸のコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸グリコール酸コポリマーおよびリユープロリド酢酸塩から構成される注射可能マイクロスフェア）のような分解性の乳酸グリコール酸コポリマー、ならびにポリD-(-)-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。エチレン酢酸ビニルおよび乳酸グリコール酸のようなポリマーは、100日以上にわたる分子の放出を可能にするが、ある種のヒドロゲルは、より短い期間にわたりタンパク質を放出する。

【0369】

材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Incから商業的に入手されてもよい。（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を含む感染細胞を標的とするリポソームを含む）リポソーム懸濁液も、薬学的に許容される担体として使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるように、当業者に公知の方法によって調製され得る。

【0370】

投与の容易さおよび投薬量の均一性のため、投薬単位形態で経口または非経口の組成物を製剤化することは、特に有利である。投薬単位形態とは、本明細書中で使用されるように、処置される対象のための単位投薬量として適した物理的に不連続の単位をさし；各単位は、必要とされる薬学的担体と共に所望の治療効果を生じるよう計算された予め決定された量の活性化化合物を含有している。本開示の投薬単位形態の詳細は、活性化化合物の独特の特徴、および達成すべき特定の治療効果、および個体の処置のためのそのような活性化化合物の合成の分野に固有の限界によって指示され、それらに直接依存する。

【0371】

本明細書中に記載された薬学的組成物（または製品）を含むキットが、さらに提供される。薬学的組成物は、投与のための説明書と共に、容器、パック、またはディスペンサーに含まれ得る。本明細書中に記載されたキットは、他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、注射器、および本明細書中に記載された方法を実施するための説明書を含むパッケージインサートを含む、商業的見地および使用者見地から望ましい他の材料も含んでよい。

【0372】

製剤は、処置されている特定の適応症のために必要な複数の多重特異性ポリペプチド構築物、例えば、相互に悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものを含有していてもよい。いくつかの態様において、またはさらに、組成物は、例えば、細胞傷害性薬剤、サイトカイン、化学療法剤、または成長阻害剤のような、その機能を増強する薬剤を含んでよい。そのような分子は、意図された目的のために有効な量で組み合わせられて適当に存在する。

【0373】

いくつかの態様において、薬学的組成物の投薬は、単回投与または反復投与である。いくつかの態様において、投与は、1日1回、1日2回、1日3回、または1日4回以上、対象へ与えられる。いくつかの態様において、約1回以上（例えば、約2回以上、約3回以上、約

4回以上、約5回以上、約6回以上、または約7回以上)の投与が、1週間に与えられる。いくつかの態様において、複数回投与は、数日、数週間、数か月、または数年にわたり与えられる。いくつかの態様において、処置の課程は、約1回または複数回(例えば、約2回以上、約3回以上、約4回以上、約5回以上、約7回以上、約10回以上、約15回以上、約25回以上、約40回以上、約50回以上、または約100回以上)の投与である。

【0374】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、対象へ投与される。一般に、薬学的組成物の投薬量および投与ルートは、標準的な薬学的実務に従って、対象のサイズおよび状態によって決定される。例えば、治療的に有効な用量は、最初に、細胞培養アッセイ、またはマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、もしくはサルのような動物モデルのいずれかにおいて評価され得る。動物モデルは、適切な濃度範囲および投与ルートを決定するためにも使用され得る。次いで、そのような情報を、ヒトにおける投与のための有用な用量およびルートを決定するために使用することができる。正確な投薬量は、処置を必要とする対象に関係のある因子を考慮して決定されるであろう。投薬量および投与は、十分なレベルの活性化化合物を提供するため、または所望の効果を維持するため、調整される。考慮に入れられ得る因子には、疾患状態の重症度、対象の健康状態、対象の年齢、体重、および性別、投与の時間および頻度、薬物の組み合わせ、反応感度、ならびに治療に対する応答が含まれる。特定の患者のための最適の投薬量および処置計画は、疾患の兆候について患者をモニタリングし、それに応じて、処置を調整することによって、医療の当業者によって容易に決定され得る。

【0375】

IV. 使用および治療的投与の方法

多重特異性ポリペプチド構築物を使用する方法およびその使用が提供される。そのような方法および使用には、例えば、分子またはそれを含有している組成物の、腫瘍またはがんのような疾患、状態、または障害を有する対象への投与を含む、治療的な方法および使用が含まれる。いくつかの態様において、分子および/または組成物は、疾患または障害の処置を達成するため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多重特異性ポリペプチド構築物の使用、ならびにそのような治療方法を実施するための医薬の調製における使用が含まれる。いくつかの態様において、方法は、多重特異性ポリペプチド構築物またはそれを含む組成物を、疾患または状態を有するかまたは有すると推測される対象へ投与することによって実施される。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。

【0376】

一つの態様において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、治療剤として使用され得る。そのような薬剤は、一般に、対象における疾患または病理を診断し、予後判定し、モニタリングし、処置し、緩和し、かつ/または防止するため、利用されるであろう。治療計画は、標準的な方法を使用して、障害に罹患している(または発症するリスクを有する)対象、例えば、ヒト患者またはその他の哺乳動物を同定することによって実施される。多重特異性ポリペプチド構築物は、対象へ投与される。多重特異性ポリペプチド構築物は、対象へ投与され、一般に、標的との結合によって効果を及ぼすであろう。

【0377】

いくつかの態様において、提供された多重特異性コンジュゲートまたは薬学的組成物のいずれかを、治療的に有効な量で、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、本明細書中に提供される。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させるかまたは増強する。例えば、増加したまたは増強された応答は、細胞性免疫の増加であり得る。いくつかの例において、方法は、細胞溶解性T細胞(CTL)活性のようなT細胞活性を増加させる。いくつかの態様において、調節された(例えば、増加した)免疫応答は、腫瘍またはがんに対するものである。

【0378】

多重特異性ポリペプチド構築物の投与は、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域を通

したFcγRの係合を介して、自然免疫細胞を活性化することができる。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誘起し、刺激し、活性化し、かつ/または強化することができる。多重特異性ポリペプチド構築物の投与は、第1および第2の成分を接合するリンカーがプロテアーゼによって切断され、それによって、抗CD3結合部分がT細胞上のCD3εに結合することが可能になった後、T細胞を活性化することができる。多重特異性ポリペプチド構築物の投与は、CD3によって媒介されるT細胞活性化、細胞傷害、サイトカイン放出、および/または増殖を誘起し、刺激し、活性化し、かつ/または強化することができる。

【0379】

いくつかの態様において、提供された方法は、提供された多重特異性コンジュゲートまたは薬学的組成物のいずれかを、治療的に有効な量で、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、疾患または障害の緩和または処置は、疾患または障害に関連した一つまたは複数の症状または医学的問題の低減を含む。例えば、がんのケースにおいて、治療的に有効な量の薬物は、以下のうちの一つまたは組み合わせを達成することができる：がん細胞の数の低下；腫瘍サイズの低下；末梢器官へのがん細胞浸潤の阻害（即ち、ある程度の減少および/もしくは中止）；腫瘍転移の阻害；腫瘍成長のある程度の阻害；ならびに/またはがんに関連した症状のうちの一つもしくは複数のある程度の軽減。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、または非ヒト霊長類、ペット（例えば、ネコ、イヌ、ウマ）、家畜、実験動物、もしくは動物園の動物のようなその他の哺乳動物において、疾患または障害の発病または再発を防止するために使用され得る。対象および患者という用語は、本明細書中で交換可能に使用される。

【0380】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、（ヒトがん細胞のような）哺乳動物がん細胞の成長を阻害するために使用され得る。がんを処置する方法は、本明細書中に記載された薬学的組成物のいずれかを、有効量、がんを有する対象へ投与する工程を含み得る。有効量の薬学的組成物は、がんの進行を阻害するか、停止させるか、または逆転させるために投与され得る。ヒトがん細胞は、インビボまたはエクスピボで処置され得る。ヒト患者のエクスピボ処置においては、がん細胞を含有している組織または液体が、体外で処置され、次いで、組織または液体が、患者へ戻し再導入される。いくつかの態様において、がんは、治療用組成物の患者への投与によって、インビボでヒト患者において処置される。

【0381】

疾患の非限定的な例には、全ての型のがん（乳がん、肺がん、結腸直腸がん、前立腺がん、黒色腫、頭頸部がん、膵臓がん等）、関節リウマチ、クローン病、SLE、心血管傷害、虚血等が含まれる。例えば、適応症には、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、ならびに肺がん、結腸直腸がん、前立腺がん、膵臓がん、および三種陰性乳がんを含む乳がんを含む固形腫瘍が含まれるであろう。例えば、適応症には、原発腫瘍起源に関与しない、がんにおける骨疾患もしくは転移；非限定的な例として、ER/PR+乳がん、Her2+乳がん、三種陰性乳がんを含む乳がん；結腸直腸がん；子宮内膜がん；胃がん；膠芽腫；食道がんのような頭頸部がん；非限定的な例として、非小細胞肺がんのような肺がん；多発性骨髄腫；卵巣がん；膵臓がん；前立腺がん；骨肉腫のような肉腫；非限定的な例として、腎細胞がんのような腎臓がん；および/または、非限定的な例として、扁平上皮がん、基底細胞がん、もしくは黒色腫のような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。

【0382】

本開示の多重特異性ポリペプチド構築物の治療的に有効な量は、一般に、治療目的を達

10

20

30

40

50

成するために必要とされる量に関する。前述のように、これは、ある種のケースにおいて、FcγRによって媒介される自然免疫細胞活性化またはCD3によって媒介されるT細胞活性化を誘起し、刺激し、活性化し、かつ/または強化する、多重特異性ポリペプチド構築物とその標的抗原との間の結合相互作用であり得る。投与される必要がある量は、さらに、多重特異性ポリペプチド構築物の特定の抗原に対する結合親和性に依り、投与された多重特異性ポリペプチド構築物が、それが投与された対象の自由体積から枯渇する速度にも依るのである。多重特異性ポリペプチド構築物の治療的に有効な用量の一般的な範囲は、例えば、非限定的に、約0.01 μg/kg体重～約10mg/kg体重であり得る。いくつかの態様において、本開示の多重特異性ポリペプチド構築物の治療的に有効な用量は、例えば、非限定的に、約0.01mg/kg体重から約5～10mg/kg体重までであり得る。一般的な投薬頻度は、例えば、1日2回～週1回であり得る。

10

【0383】

処置の有効性は、特定の障害を診断するかまたは処置する任意の公知の方法と共に決定される。所望の特異性を保有する多重特異性ポリペプチド構築物のスクリーニングの方法には、当技術分野において公知の酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）およびその他の免疫学的に媒介される技術が含まれるが、これらに限定されるわけではない。提供された多重特異性ポリペプチド構築物の投与が、望まれない免疫応答を媒介するかもしれないか、あるいは媒介することができる免疫細胞の排除、隔離、もしくは不活化；防御免疫応答を媒介するかもしれないか、あるいは媒介することができる免疫細胞の誘導、生成、もしくは活性化；免疫細胞の物理的もしくは機能的な特性の変化；またはこれらの効果の組み合わせによって、免疫活性を十分に調節するか否かを決定するため、多様な手段が公知である。免疫活性の調節の測定の例には、（フローサイトメトリー、免疫組織化学、組織学、電子顕微鏡法、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用した）免疫細胞集団の存在または欠如の調査；シグナルに応答して増殖するかまたは分裂する能力または抵抗性を含む免疫細胞の機能的能力の測定（例えば、T細胞増殖アッセイ、および抗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-ミリステート13-アセテート）、ペプチドまたはタンパク質抗原が負荷された抗原提示細胞による刺激後の3Hチミジン取り込みに基づくp epscan分析；B細胞増殖アッセイの使用）；（細胞傷害性T細胞アッセイのような）他の細胞を死滅させるかまたは溶解する能力の測定；（例えば、フローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着アッセイ、ウエスタンブロット分析、タンパク質マイクロアレイ分析、免疫沈降分析による）サイトカイン、ケモカイン、細胞表面分子、抗体、および細胞の他の生成物の測定；免疫細胞または免疫細胞内のシグナリング経路の活性化の生化学的マーカーの測定（例えば、ウエスタンブロット、およびチロシン、セリン、またはトレオニンのリン酸化の免疫沈降分析、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；タンパク質アレイ分析；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使用したDNA転写プロファイリング）；アポトーシス、壊死、またはその他の機序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ラダー形成を測定するゲル電気泳動、組織学；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分析）；免疫細胞によって産生された遺伝子、タンパク質、およびその他の分子の測定（例えば、ノーザンブロット分析、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、二次元ゲル電気泳動、ウエスタンブロット分析、酵素結合免疫吸着アッセイ、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を測定することによる、自己タンパク質または自己ポリペプチドを含む自己免疫疾患、神経変性疾患、およびその他の疾患の改善のような臨床的な症状または転帰の測定（臨床スコア、付加的な治療の使用の必要性、機能的状態、画像研究）が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

20

30

40

【0384】

多重特異性ポリペプチド構築物は、多様な診断用および予防用の製剤においても有用である。一つの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、前記の障害のうちの一つまたは複数を発症するリスクを有する患者へ投与される。患者または器官の、障害のうち

50

の一つまたは複数の素因は、遺伝子型マーカー、血清学的マーカー、または生化学的マーカーを使用して決定され得る。

【0385】

本開示の別の態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、前記の障害のうちの一つまたは複数に関連した臨床的適応症を有すると診断されたヒト個体へ投与される。診断時に、多重特異性ポリペプチド構築物は、臨床的適応症の効果を和らげるかまたは逆転させるために投与される。

【0386】

併用療法

いくつかの態様において、本明細書中で集合的に治療薬と呼ばれる多重特異性ポリペプチド構築物、コンジュゲートされた多重特異性ポリペプチド構築物、およびそれらの組成物は、1種もしくは複数種の付加的な薬剤または付加的な薬剤の組み合わせと共に投与される。適当な付加的な薬剤には、意図された適用のための現在の医薬および/または外科的治療が含まれる。例えば、治療薬は、付加的な化学療法剤または抗腫瘍剤と共に使用され得る。例えば、治療薬および付加的な薬剤は、単一の治療用組成物へ製剤化され、治療薬および付加的な薬剤は、同時に投与される。いくつかの態様において、治療薬および付加的な薬剤は、相互に別々であり、例えば、各々、別々の治療用組成物へ製剤化され、治療薬および付加的な薬剤は、同時に投与されるか、または治療薬および付加的な薬剤は、処置計画中の異なる時点で投与される。例えば、治療薬が付加的な薬剤の投与の前に投与されるか、治療薬が付加的な薬剤の投与の後に投与されるか、または治療薬および付加的な薬剤が交互に投与される。本明細書中に記載されるように、治療薬および付加的な薬剤は、単回投与されるかまたは複数回投与される。いくつかの態様において、付加的な薬剤は、治療薬へカップリングされるかまたは他の方法で付着させられる。適当な付加的な薬剤は、意図された適用の目的（即ち、死滅、細胞増殖の防止、ホルモン治療、または遺伝子治療）によって選択される。そのような薬剤には、例えば、薬学的薬剤、毒素、毒素の断片、アルキル化剤、酵素、抗生物質、代謝拮抗薬、抗増殖剤、ホルモン、神経伝達物質、DNA、RNA、siRNA、オリゴヌクレオチド、アンチセンスRNA、アプタマー、診断薬、放射線不透過性色素、放射性同位体、蛍光発生化合物、磁気標識、ナノ粒子、マーカー化合物、レクチン、細胞膜透過性を変更する化合物、光化学的化合物、低分子、リボソーム、ミセル、遺伝子治療ベクター、ウイルスベクター等が含まれ得るが、これらに限定されるわけではない。最後に、薬剤の組み合わせまたは異なるクラスの薬剤の組み合わせが使用されてもよい。

【0387】

一つの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、併用療法において投与され、即ち、他の薬剤、例えば、自己免疫障害および炎症性疾患のような病理学的状態または障害を処置するため有用である治療剤と組み合わせられる。この状況において「組み合わせ」という用語は、薬剤が、実質的に同時期に、同時にまたは連続的に与えられることを意味する。連続的に与えられる場合、2種の化合物のうちの第1の化合物は、第2の化合物の投与の開始時に、未だ、処置の部位に有効な濃度で検出可能である。

【0388】

例えば、併用療法には、以下により詳細に記載されるように、1種または複数種の付加的な治療剤、例えば、1種または複数種のサイトカインおよび増殖因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、ならびに/または細胞傷害性薬剤もしくは細胞分裂阻害剤と共に製剤化されかつ/または同時投与される、1種または複数種の本開示の多重特異性ポリペプチド構築物が含まれ得る。さらに、本明細書中に記載された1種または複数種の多重特異性ポリペプチド構築物は、本明細書中に記載された治療剤のうちの2種以上と組み合わせ使用されてもよい。そのような併用療法は、有利に、投与される治療剤のより低い用量を利用し、従って、様々な単独治療に関連した可能性のある毒性または合併症を回避することができる。

【0389】

他の態様において、1種または複数種の本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、1種または複数種の抗炎症薬、免疫抑制薬、代謝阻害剤、または酵素阻害剤と共に製剤化されかつ/または同時投与され得る。本明細書中に記載された抗体と組み合わせて使用され得る薬物または阻害剤の非限定的な例には、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）、例えば、イブプロフェン、テニダブ（tenidap）、ナプロキセン、メロキシカム（meloxicam）、ピロキシカム（piroxicam）、ジクロフェナク、およびインドメタシン；スルファサラジン；プレドニゾロンのような副腎皮質ステロイド；サイトカイン抑制性抗炎症薬（CSAID）；ヌクレオチド生合成の阻害剤、例えば、プリン生合成の阻害剤、葉酸アンタゴニスト（例えば、メトトレキサート（N-[4-[[[(2,4-ジアミノ-6-プテリジニル)メチル]メチルアミノ]ベンゾイル]-L-グルタミン酸））；ならびにピリミジン生合成の阻害剤、例えば、ジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ（DHODH）阻害剤のうちの1種または複数種が含まれるが、これらに限定されるわけではない。本開示の抗体と組み合わせて使用するために適当な治療剤には、NSAID、CSAID、（DHODH）阻害剤（例えば、レフルノミド）、および葉酸アンタゴニスト（例えば、メトトレキサート）が含まれる。

【0390】

付加的な阻害剤の例には、副腎皮質ステロイド（経口、吸入、および局所注射）；免疫抑制薬、例えば、シクロスポリン、タクロリムス（FK-506）；ならびにmTOR阻害剤、例えば、シロリムス（ラパマイシン-RAPAMUNE（商標））またはラパマイシン誘導体、例えば、可溶性ラパマイシン誘導体（例えば、エステルラパマイシン誘導体、例えば、CCI-779）；TNF α またはIL-1のような炎症誘発性サイトカインによるシグナリングに干渉する薬剤（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38、またはMAPキナーゼ阻害剤）；COX2阻害剤、例えば、セレコキシブ、ロフェコキシブ、およびそれらのバリエーション；ホスホジエステラーゼ阻害薬、例えば、R973401（ホスホジエステラーゼIV型阻害剤）；ホスホリパーゼ阻害剤、例えば、サイトゾルホスホリパーゼ2（cPLA2）の阻害剤（例えば、トリフルオロメチルケトン類似体）；血管内皮細胞増殖因子または増殖因子受容体の阻害剤、例えば、VEGF阻害剤および/またはVEGF-R阻害剤；ならびに血管形成の阻害剤のうちの1種または複数種が含まれる。本開示の抗体と組み合わせて使用するために適当な治療剤は、免疫抑制薬、例えば、シクロスポリン、タクロリムス（FK-506）；mTOR阻害剤、例えば、シロリムス（ラパマイシン）またはラパマイシン誘導体、例えば、可溶性ラパマイシン誘導体（例えば、エステルラパマイシン誘導体、例えば、CCI-779）；COX2阻害剤、例えば、セレコキシブおよびそのバリエーション；ならびにホスホリパーゼ阻害剤、例えば、サイトゾルホスホリパーゼ2（cPLA2）の阻害剤、例えば、トリフルオロメチルケトン類似体である。多重特異性ポリペプチド構築物と組み合わせられ得る治療剤の付加的な例には、6-メルカプトプリン（6-MP）；アザチオプリンスルファサラジン；メサラジン；オルサラジン；クロロキン/ヒドロキシクロロキン（PLAQUENIL（登録商標））；ペニシラミン；金チオマレイン酸（筋肉内および経口）；アザチオプリン；コルヒチン； β 2アドレナリン受容体アゴニスト（サルブタモール、テルブタリン、サルメテロール）；キサンチン（テオフィリン、アミノフィリン）；クロモグリク酸；ネドクロミル；ケトチフェン；イプラトロピウムおよびオキシトロピウム；ミコフェノール酸モフェチル；アデノシンアゴニスト；抗血栓剤；補体阻害剤；ならびにアドレナリン作用薬のうちの1種または複数種が含まれる。

【0391】

V. 例示的な態様

提供された態様には、以下のものが含まれる。

1.

免疫グロブリンFc領域を含む第1の成分およびCD3結合領域を含む第2の成分を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

第1および第2の成分がリンカーによってカップリングされており、Fc領域がCD3結合領域に対してN末端側に位置付けられており；

第1および第2の成分のうちの一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少な

10

20

30

40

50

くとも1つの抗原結合ドメインを含み；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、多重特異性ポリペプチド構築物。

2．

免疫グロブリンFc領域を含む第1の成分およびCD3結合領域を含む第2の成分を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

第1および第2の成分がリンカーによってカップリングされており、Fc領域がCD3結合領域に対してN末端側に位置付けられており；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、多重特異性ポリペプチド構築物。

3．

免疫グロブリンFc領域を含む第1の成分およびCD3結合領域を含む第2の成分を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

第1および第2の成分がリンカーによってカップリングされており、Fc領域がCD3結合領域に対してN末端側に位置付けられており；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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）を含み；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、多重特異性ポリペプチド構築物。

4．

CD3結合領域がCD3（CD3 ϵ ）に結合する、態様1～3のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

5．

少なくとも1つの抗原結合ドメインが、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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、態様1～4のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

6．

少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）が、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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、態様1および3～5のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

7．

少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）が、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側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、態様2～5のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

8．

第1の成分が第1の抗原結合ドメインを含み、第2の成分が第2の抗原結合ドメインを含み、抗原結合ドメインの各々が腫瘍関連抗原（TAA）に結合する、態様1～7のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

9．

第1の抗原結合ドメインが、多重特異性構築物のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、第2の抗原結合ドメインが、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側に位置付けられている、態様8の多重特異性ポリペプチド構築物。

10．

10

20

30

40

50

第1または第2の成分が共刺激受容体結合領域（CRBR）をさらに含む、態様8または態様9の多重特異性ポリペプチド構築物。

11.

第1または第2の成分が抑制性受容体結合領域（IRBR）をさらに含む、態様8または態様9の多重特異性ポリペプチド構築物。

12.

N末端からC末端へ順に、

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/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン；

免疫グロブリンFc領域；

リンカー；

CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；ならびに

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/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン

を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

少なくとも1つのCRBRおよび少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

13.

1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）のみを含む、態様12の多重特異性ポリペプチド構築物。

14.

N末端からC末端へ順に、

抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）および/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン；

免疫グロブリンFc領域；

リンカー；

CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；ならびに

抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）および/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン

を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

少なくとも1つのIRBRおよび少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

15.

1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）のみを含む、態様14の多重特異性ポリペプチド構築物。

16.

N末端からC末端へ順に、

抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）もしくは共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）のうちの一方、および/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン；

免疫グロブリンFc領域；

リンカー；

CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；ならびに

IRBRもしくはCRBRのうちの他方、および/または腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン

を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

少なくとも1つのIRBR、少なくとも1つのCRBR、および少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

17.

TAAに結合する2つの抗原結合ドメインを含む、態様12～16のいずれかの多重特異性ポ

10

20

30

40

50

リペプチド構築物。

18.

抗原結合ドメインが同一の腫瘍関連抗原（TAA）に結合する、態様17の多重特異性ポリペプチド構築物。

19.

1つの抗原結合ドメインがFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、1つの抗原結合ドメインがCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、態様17または態様18の多重特異性ポリペプチド構築物。

20.

N末端からC末端へ順に、
免疫グロブリンFc領域；
リンカー；
CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；ならびに
腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン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、多重特異性ポリペプチド構築物。

10

21.

N末端からC末端へ順に、
腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン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）；
免疫グロブリンFc領域；
リンカー；ならびに
CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域
を含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

20

22.

N末端からC末端へ順に、
免疫グロブリンFc領域；
リンカー；
CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域；ならびに
腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン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、多重特異性ポリペプチド構築物。

30

23.

N末端からC末端へ順に、
腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメイン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）；
免疫グロブリンFc領域；
リンカー；ならびに
CD3（CD3ε）に結合するCD3結合領域
を含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

40

24.

Fc領域がホモ二量体Fc領域である、態様1～23のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

25.

Fc領域が、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、もしくはヒトIgG4のFc領域であるか、またはそれらの免疫活性断片である、態様1～24のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

26.

Fc領域が、SEQ ID NO:1に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:1との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を

50

有するアミノ酸の配列を含むポリペプチドを含む、態様1～25のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

27.

Fc領域が、SEQ ID NO:2に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:2との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチドを含むか；

Fc領域が、SEQ ID NO:4に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:4との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチドを含むか；または

Fc領域が、SEQ ID NO:5に示されるアミノ酸配列、もしくはSEQ ID NO:5との少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むポリペプチドを含む、態様1～25のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

28.

Fc領域がヘテロ二量体Fc領域である、態様1～19、25～27のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

29.

ヘテロ二量体Fc領域の一方または両方のFcポリペプチドが、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:1に示されるFcポリペプチドまたはその免疫活性断片と比較して、ヘテロ二量体化を誘導するための少なくとも1つの修飾を含む、態様28の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

30.

ヘテロ二量体FcのFcポリペプチドの各々が独立に少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む、態様29の多重特異性ポリペプチド構築物。

31.

ヘテロ二量体FcのFcポリペプチドの各々が、ノブイントゥホール (knob-into-hole) 修飾を含むか、またはポリペプチドの静電的相補性を増加させるための電荷変異を含む、態様30の多重特異性ポリペプチド構築物。

32.

アミノ酸修飾がノブイントゥホール修飾である、態様31の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

33.

ヘテロ二量体Fcの第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より選択される修飾を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のFcポリペプチドが修飾Thr366Trpを含む、態様28～32のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

34.

第1および第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修飾をさらに含み、第1のポリペプチドの修飾が、位置Ser354およびTyr349のうちの一方にあり、第2のFcポリペプチドの修飾が、位置Ser354およびTyr349のうちの他方にある、態様33の多重特異性ポリペプチド。

40

35.

アミノ酸修飾が、ポリペプチドの静電的相補性を増加させるための電荷変異である、態様31の多重特異性ポリペプチド構築物。

36.

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が、相補的な位置に修飾を含み、修飾が、他方のポリペプチドの相補的なアミノ酸と反対の電荷を有するアミノ酸への置換である、態様28～31および35のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

37.

50

ヘテロ二量体Fcの第1または第2のFcポリペプチドのうち的一方が、残基Ile253における修飾をさらに含む、態様29～36のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

38.

前記修飾がIle253Argである、態様37の多重特異性ポリペプチド構築物。

39.

ヘテロ二量体Fcの第1または第2のFcポリペプチドのうち的一方が残基His435における修飾をさらに含む、態様29～38のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40.

前記修飾がHis435Argである、態様39の多重特異性ポリペプチド構築物。

41.

Fc領域が、Lys447を欠くポリペプチドを含む、態様1～40のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

42.

Fc領域が、FcRn結合を増強するための少なくとも1つの修飾を含むポリペプチドを含む、態様1～41のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

43.

前記修飾が、Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される位置にある、態様42の多重特異性ポリペプチド構築物。

44.

前記修飾が、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位置にある、態様43の多重特異性ポリペプチド構築物。

45.

前記修飾が位置Met252および位置Met428にある、態様43の多重特異性ポリペプチド構築物。

46.

前記修飾がMet252YおよびMet428Lである、態様45の多重特異性ポリペプチド構築物。

47.

前記修飾がMet252YおよびMet428Vである、態様45の多重特異性ポリペプチド構築物。

48.

ヘテロ二量体Fcの第1のポリペプチドが、SEQ ID NO:82、86、94、または96のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のポリペプチドが、SEQ ID NO:83、87、90、92、98、または100のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、態様28～47のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

49.

Fc領域が、

エフェクター機能を低下させ、かつ/またはFcγ受容体もしくはC1qより選択されるエフェクター分子との結合を低下させる、少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むポリペプチドを含む、態様1～48のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

50.

1つまたは複数のアミノ酸修飾が、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49の多重特異性ポリペプチド構築物。

51.

ヘテロ二量体Fcの第1のポリペプチドが、SEQ ID NO:84、88、95、または97のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のポリペプチドが、SEQ ID NO:85、89、91、93、99、または101のうちのいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、態様28～48、49、および50のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

52.

10

20

30

40

50

Fc領域が、FcγR結合を増強するための少なくとも1つの修飾を含むポリペプチドを含む、態様1～48のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

53.

前記修飾がSer239またはIle332における修飾である、態様52の多重特異性ポリペプチド構築物。

54.

Fc領域のグリコシル化が、未修飾のFc領域と比較して、FcγR結合を増強するために修飾される、態様1～48および52のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

55.

Fc領域がフコースを欠くかまたは低下したフコース含量を有する、態様54の多重特異性ポリペプチド構築物。

56.

CD3結合領域が抗CD3抗体または抗原結合断片である、態様1～55のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

57.

抗CD3抗体または抗原結合断片が可変重鎖領域（VH）および可変軽鎖領域（VL）を含む、態様56の多重特異性ポリペプチド構築物。

58.

CD3結合領域が1価である、態様1～57のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

59.

CD3結合領域が、可変重鎖領域（VH）および可変軽鎖領域（VL）を含む可変断片（Fv）である、態様1～58のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

60.

抗CD3抗体または抗原結合断片が単鎖抗体ではなく、任意で、単鎖可変断片（scFv）ではない、態様56～58のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

61.

Fcがヘテロ二量体Fcであり、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の対向するポリペプチドに連結されている、態様57～60のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

62.

抗原結合ドメインのうちの少なくとも1つがそのTAAに結合しない限り、CD3結合領域がCD3に結合もしくは係合することができないかまたは実質的にできない、態様1～61のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

63.

抗原結合ドメインのうちの少なくとも2つがそのTAAに結合しない限り、CD3結合領域がCD3に結合もしくは係合することができないかまたは実質的にできない、態様1～62のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

64.

リンカーがポリペプチドリンカーである、態様1～63のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

65.

リンカーが、最大25アミノ酸長のポリペプチドである、態様64の多重特異性ポリペプチド構築物。

66.

リンカーが、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

10

20

30

40

50

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アミノ酸のポリペプチドである、態様64または態様65の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

67.

リンカーが、3アミノ酸長、4アミノ酸長、5アミノ酸長、6アミノ酸長、7アミノ酸長、8アミノ酸長、9アミノ酸長、10アミノ酸長、11アミノ酸長、12アミノ酸長、13アミノ酸長、14アミノ酸長、15アミノ酸長、16アミノ酸長、17アミノ酸長、18アミノ酸長、19アミノ酸長、または20アミノ酸長であるポリペプチドである、態様64～66のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

68.

リンカーが、3～18アミノ酸長であるポリペプチドである、態様64～67のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

69.

リンカーが、12～18アミノ酸長であるポリペプチドである、態様64～67のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

70.

リンカーが、15～18アミノ酸長であるポリペプチドである、態様64～67のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

71.

リンカーが非切断可能リンカーである、態様1～70のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

72.

非切断可能リンカーが、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有していない、態様71の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

73.

非切断可能リンカーが、GS、GGG、GGGG (SEQ ID NO:149)、GGGGG (SEQ ID NO:135)、およびそれらの組み合わせを含む、態様71または態様72の多重特異性ポリペプチド構築物。

74.

非切断可能リンカーが、(GGG) n を含み、 n は1～10である、態様71～73のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

75.

非切断可能リンカーが、(GGGG) n (SEQ ID NO:173)を含み、 n は1～10である、態様71～74のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

76.

非切断可能リンカーが、(GGGGG) n (SEQ ID NO:172)を含み、 n は1～4である、態様71～75のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

77.

非切断可能リンカーが、GGGを含む、態様71～76のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

78.

非切断可能リンカーが、GGGG (SEQ ID NO:149)を含む、態様71～76のいずれか

50

の多重特異性ポリペプチド構築物。

79.

非切断可能リンカーが、GGGGGS (SEQ ID NO:135) を含む、態様71~76のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

80.

非切断可能リンカーが、(GGS)₂ (SEQ ID NO:10) を含む、態様71~76のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

81.

非切断可能リンカーが、GSGSGSGGS (SEQ ID NO:11) を含む、態様71~76のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

82.

非切断可能リンカーが、GSGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO:12) を含む、態様71~76のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

83.

非切断可能リンカーが、
GSGSGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO: 13)

を含む、態様71~76のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

84.

非切断可能リンカーが、
GGGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 119)

を含む、態様71~76のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

85.

非切断可能リンカーが、
GSGGGGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:147)

を含む、態様71~76のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

86.

非切断可能リンカーが、
GGGGSGGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:170)

を含む、態様71~76のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

87.

リンカーが切断可能リンカーである、態様1~70のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

88.

ヘテロ二量体Fc領域を含む第1の成分と、可変重鎖領域 (VH) および可変軽鎖領域 (VL) を含む抗CD3抗体または抗原結合断片を含む第2の成分とを含む、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の対向するポリペプチドに連結されており；

第1および第2の成分が切断可能リンカーによってカップリングされており、ヘテロ二量体Fc領域が抗CD3抗体に対してN末端側に位置付けられており；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原 (TAA) に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、
多重特異性ポリペプチド構築物。

89.

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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）をさらに含む、態様88の多重特異性ポリペプチド構築物。

90.

ヘテロ二量体Fc領域を含む第1の成分と、可変重鎖領域（VH）および可変軽鎖領域（VL）を含む抗CD3抗体または抗原結合断片を含む第2の成分とを含む、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の対向するポリペプチドに連結されており；

第1および第2の成分が切断可能リンカーによってカップリングされており、ヘテロ二量体Fc領域が抗CD3抗体に対してN末端側に位置付けられており；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み；

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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、多重特異性ポリペプチド構築物。

91.

第1および第2の成分のうち的一方または両方が、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）をさらに含む、態様90の多重特異性ポリペプチド構築物。

92.

多重特異性ポリペプチド構築物が未切断状態にある時、切断状態と比較して、CD3結合領域のCD3との結合が実質的に低下する、態様88～91のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

93.

切断状態において、第1および第2の成分が連結されていない、態様88～92のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

94.

切断可能リンカーが、プロテアーゼの基質として機能するポリペプチドである、態様88～93のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

95.

免疫エフェクター細胞によって、腫瘍によって、または腫瘍微小環境に存在する細胞によって、プロテアーゼが産生される、態様94の多重特異性ポリペプチド構築物。

96.

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、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95の多重特異性ポリペプチド構築物。

97.

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より選択される、態様94～96のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

98.

プロテアーゼがグランザイムBである、態様97の多重特異性ポリペプチド構築物。

99.

切断可能リンカーが、一般式P4 P3 P2 P1↓P1'（SEQ ID NO:150）の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；P1'はアミノ酸I、L、Y、M、F、V、T、S、G、またはAである、態様88～98のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

100.

10

20

30

40

50

切断可能リンカーが、一般式P4 P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:151) の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；P1'はアミノ酸I、V、T、S、またはGである、態様88～99のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

101.

切断可能リンカーが、アミノ酸配列IEPDI (SEQ ID NO:136)、LEPDG (SEQ ID NO:152)、LEADT (SEQ ID NO:137)、IEPDG (SEQ ID NO:138)、IEPDV (SEQ ID NO:139)、IEPDS (SEQ ID NO:140)、IEPDT (SEQ ID NO:141)、またはLEADG (SEQ ID NO:153) を含む、態様88～100のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

102.

切断可能リンカーが、SEQ ID NO:22、105～112、136～141、148、150～153からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、態様88～101のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

103.

切断可能リンカーが、SEQ ID NO:105に示されるアミノ酸配列を含む、態様88～102のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

104.

プロテアーゼがマトリプターゼである、態様103の多重特異性ポリペプチド構築物。

105.

切断可能リンカーが、配列P1QAR↓(A/V) (SEQ ID NO:154) (P1は任意のアミノ酸である) を含むか；または

切断可能リンカーが、配列RQAR(A/V) (SEQ ID NO:155) を含む、態様88～105のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

106.

切断可能リンカーが、配列RQARV (SEQ ID NO:156) を含む、態様88～105のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

107.

切断可能リンカーが、SEQ ID NO:23、154～156からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、態様88～106のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

108.

プロテアーゼがMMPである、態様97の多重特異性ポリペプチド構築物。

109.

MMPがMMP-2である、態様108の多重特異性ポリペプチド構築物。

110.

切断可能リンカーが、一般式P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:157) 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；P1'はL、I、またはMである、態様88～109のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

111.

切断可能リンカーが、一般式P3 P2 P1↓P1' (SEQ ID NO:158) 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；P1'はLまたはIである、態様88～110のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

112.

切断可能リンカーが、配列PAGL (SEQ ID NO:24) を含む、態様88～111のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

113.

切断可能リンカーが、SEQ ID NO:22～31、104～114、117～118、136～144、148、150～158からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、態様88～112のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

114.

多重特異性ポリペプチド構築物が、

10

20

30

40

50

(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ドメインまたはVLドメインを含む、第1のポリペプチド；ならびに

(ii) ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意で、第1のポリペプチドに存在するのと同じのリンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHドメインまたはVLドメインのうちの他方を含む、第2のポリペプチドを少なくとも含み、

第1および第2のポリペプチドのうちの一方または両方が、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み、第1および第2の成分のうち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）を含み、

多重特異性ポリペプチド構築物が、少なくとも1つのCRBRおよび少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、

態様61～113のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

115.

TAAに結合する1つまたは複数の抗原結合ドメインが、TAAとの1価、2価、3価、または4価の結合をもたらす、態様1～114のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

116.

第1または第2のポリペプチドのうちの一方のみが、TAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む、態様114または態様115の多重特異性ポリペプチド構築物。

117.

少なくとも1つの抗原結合ドメインが、多重特異性ポリペプチド構築物の第1または第2のポリペプチドのうちの一方のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、かつ/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、態様114～116のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

118.

少なくとも1つの抗原結合ドメインが、多重特異性構築物のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられており、第2の抗原結合ドメインが、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側に位置付けられている、態様114～116のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

119.

第1または第2のポリペプチドのうちの一方のみが、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114～118のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

120.

共刺激受容体結合領域（CRBR）が、多重特異性ポリペプチド構築物の第1または第2のポリペプチドのうちの一方のFc領域に対してアミノ末端側に位置付けられているか、またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、態様114～119のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

121.

第1のポリペプチドが、N末端からC末端へ順に、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第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のVLまたはVH、および腫瘍関連抗原（TAA）に結合する第2の抗原結合ドメインを含み；

第2のポリペプチドが、N末端からC末端へ順に、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のポリペプチドに存在するのと同じのリンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVLまたはVHのうちの他方、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、

態様1114～120のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

122.

抗原結合ドメインが、または抗原結合ドメインの各々が独立に、TAAのネイティブ同族

10

20

30

40

50

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TAAとの結合活性を示すそれらのバリエーションを含む、態様1～121のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

123.

抗原結合ドメインが、または抗原結合ドメインの各々が独立に、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1～121のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

124.

少なくとも1つの共刺激受容体結合領域 (CRBR) が、共刺激受容体のネイティブ同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、または共刺激受容体との結合活性を示すそれらのバリエーションであるかまたはそれを含む、態様1～123のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

125.

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1～123のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

126.

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123または態様125の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

127.

抗体または抗原結合断片がsdAbである、態様123、態様125、または態様114の多重特異性ポリペプチド構築物。

128.

sdAbが、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、態様127の多重特異性ポリペプチド構築物。

129.

sdAbが、VHH、VNAR、改変型VHドメイン、または改変型VKドメインである、態様127または128のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

130.

30

抗体またはその抗原結合断片がscFvである、態様123、態様125、または態様126の多重特異性ポリペプチド構築物。

131.

抗体またはその抗原結合断片がFabである、態様123、態様125、または態様126の多重特異性ポリペプチド構築物。

132.

多重特異性ポリペプチド構築物が、

(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ドメインを含む、第1のポリペプチド；

(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、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVLドメインを含む、第2のポリペプチド；

40

(iii) 腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLを含む、第3のポリペプチド、

(iv) 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4のポリペプチド

を含み、

第1および/または第2のポリペプチドが、

(1) 腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方、および

(2) 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のうちの他方

50

をさらに含む、

態様1～123および125～131のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

133.

多重特異性ポリペプチド構築物が、

(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ドメインを含む、第1のポリペプチド；

(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、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVLドメインを含む、第2のポリペプチド；ならびに

(iii) 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3のポリペプチド

を含み、

第1および/または第2のポリペプチドが、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のうちの他方をさらに含み、

第1および/または第2のポリペプチドが、腫瘍関連抗原 (TAA) に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインをさらに含む、

態様1～123および125～131のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

134.

多重特異性ポリペプチド構築物が、

(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ドメインを含む、第1のポリペプチド；

(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、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVLドメインを含む、第2のポリペプチド；ならびに

(iii) 腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLを含む、第3のポリペプチド

を含み、

第1および/または第2のポリペプチドが、腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方をさらに含み、

第1および/または第2のポリペプチドが、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) をさらに含む、

態様1～123および125～131のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

135.

第1または第2のポリペプチドのうちの一方のみが、Fab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方を含む、態様133または態様134の多重特異性ポリペプチド構築物。

136.

第1または第2のポリペプチドの両方が、Fab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方を含む、態様133または態様134の多重特異性ポリペプチド構築物。

137.

Fab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方が、多重特異性ポリペプチド構築物の第1または第2のポリペプチドのうちの一方のFc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、態様135または態様136の多重特異性ポリペプチド構築物。

138.

Fab抗体断片のVH-CH1 (Fd) またはVL-CLのうちの他方が、第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのFc領域に対してアミノ末端側および第1または第2のポリペプチドのうちの他方のCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられている、態様135～137のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

139.

抗原結合ドメインが、または抗原結合ドメインの各々が独立に、1-92-LFA-3、5T4、 $\alpha 4$ インテグリン、 αV インテグリン、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリン、AGR

10

20

30

40

50

2、抗リイスY、アペリンJ受容体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5補体、C-242、CA9、CA19-9（リイスa）、炭酸脱水酵素9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132（IL-2RG）、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5（CEA）、CEACAM6（NCA-90）、クローディン3、クローディン4、cMet、コラーゲン、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、エンドセリンB受容体（ETBR）、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSVのFタンパク質、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、葉酸受容体 α （FR α ）、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-CSF、GM-CSFR、GP IIb/IIIa受容体、Gp130、GPIIB/IIIA、GPNMB、GRP78、HER2/neu、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、ヒアルロニダーゼ、ICOS、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IgE、IgE受容体（Fc ϵ RI）、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12R β 1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27/IL27R（wsx1）、IL29、IL-31R、IL31/IL31R、IL2R、IL4、IL4R、IL6、IL6R、インスリン受容体、Jaggedリガンド、Jagged1、Jagged2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、リイスX、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LyPD1、MCSP、メソテリン、MRP4、MUC1、ムチン16（MUC16、CA-125）、Na/K ATPアーゼ、NGF、ニカストリン（Nicastrin）、ノッチ受容体、ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFR α 、PDGFR β 、PD-1、PD-L1、PD-L2、ホスファチジルセリン、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、スフィンゴシン1リン酸、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGF β 、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNF α 、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、トランスフェリン、トランスフェリン受容体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2、およびWISP-3より選択される腫瘍抗原に結合する、態様1～138のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

20

30

140.

抗原結合ドメインが、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を少なくとも含み、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が、同一のTAAに結合する、態様1～139のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

141.

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が、同一のTAAの異なるエピトープに結合する、態様140の多重特異性ポリペプチド構築物。

142.

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が、同一のTAAの同一のエピトープに結合する、態様140の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

143.

抗原結合ドメインが、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を少なくとも含み、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が、異なるTAAに結合する、態様1～142のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

144.

共刺激受容体結合領域（CRBR）が、第1のCRBRおよび第2のCRBRを少なくとも含み、第1のCRBRおよび第2のCRBRが、同一の共刺激受容体に結合する、態様1～143のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

145.

第1の共刺激受容体結合領域（CRBR）および第2のCRBRが、同一の共刺激受容体の異

50

なるエピトープに結合する、態様144の多重特異性ポリペプチド構築物。

146.

第1の共刺激受容体結合領域 (CRBR) および第2のCRBRが、同一の共刺激受容体の同一のエピトープに結合する、態様144の多重特異性ポリペプチド構築物。

147.

共刺激受容体結合領域 (CRBR) が、第1のCRBRおよび第2のCRBRを少なくとも含む、態様1~146のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

148.

第1のCRBRおよび第2のCRBRが、異なる共刺激受容体に結合する、態様1~147のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

149.

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、グルコルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質 (GITR)、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体 (BAFF-R)、B細胞成熟抗原 (BCMA)、膜貫通型活性化因子およびCAML相互作用因子 (Transmembrane activator and CAML interactor) (TACI)、ならびにNKG2Dより選択される共刺激受容体に結合する、態様1~148のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

150.

少なくとも1つの共刺激受容体結合領域 (CRBR) が、41BB (CD137)、OX40 (CD134)、およびグルコルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質 (GITR) より選択される共刺激受容体に結合する、態様1~149のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

151.

少なくとも1つの抑制性受容体結合領域 (IRBR) が、共刺激受容体のネイティブ同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、または共刺激受容体との結合活性を示すそれらのバリエーションであるかまたはそれを含む、態様1~150のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

152.

少なくとも1つの抑制性受容体結合領域 (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1~150のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

153.

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152の多重特異性ポリペプチド構築物。

154.

抗体またはその抗原結合断片がsdAbである、態様152または態様114の多重特異性ポリペプチド構築物。

155.

sdAbがヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、態様154の多重特異性ポリペプチド構築物。

156.

sdAbが、VHH、VNAR、改変型VHドメイン、または改変型VKドメインである、態様154または態様155の多重特異性ポリペプチド構築物。

157.

抗体またはその抗原結合断片がscFvである、態様152または態様153の多重特異性ポリペプチド構築物。

158.

抗体またはその抗原結合断片がFabである、態様152または態様153の多重特異性ポリペプチド構築物。

159.

10

20

30

40

50

抑制性受容体結合領域（IRBR）が、第1のIRBRおよび第2のIRBRを少なくとも含み、第1のIRBRおよび第2のIRBRが、同一の抑制性受容体に結合する、態様1～158のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

160.

第1の抑制性受容体結合領域（IRBR）および第2のCRBRが、同一の抑制性受容体の異なるエピトープに結合する、態様159の多重特異性ポリペプチド構築物。

161.

第1の抑制性受容体結合領域（IRBR）および第2のIRBRが、同一の抑制性受容体の同一のエピトープに結合する、態様159の多重特異性ポリペプチド構築物。

162.

抑制性受容体結合領域（IRBR）が、第1のIRBRおよび第2のIRBRを少なくとも含む、態様1～161のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

163.

第1のIRBRおよび第2のIRBRが、異なる抑制性受容体に結合する、態様1～162のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

164.

少なくとも1つの受容体結合領域（IRBR）が、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、またはTIM3より選択される抑制性受容体に結合する、態様1～163のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

165.

少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）がPD-1に結合する、態様1～164のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

166.

第1の抗原結合ドメインとFc領域との間の第1の連結ペプチド（LP1）を含む、態様1～165のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

167.

CD3結合領域と第2の抗原結合ドメインとの間の第2の連結ペプチド（LP2）を含む、態様1～166のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

168.

共刺激受容体結合領域（CRBR）とFc領域との間の第1の連結ペプチド（LP1）を含む、態様1～166のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

169.

CD3結合領域と第2の共刺激受容体結合領域（CRBR）との間の第2の連結ペプチド（LP2）を含む、態様1～168のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

170.

抗原結合ドメインまたは共刺激受容体結合領域とFc領域との間の第1の連結ペプチド（LP1）およびCD3結合領域と抗原結合ドメインまたはCRBRとの間の第2の連結ペプチド（LP2）を含み、

N末端からC末端へ、第1の抗原結合ドメインまたはCRBR - LP1 - Fc領域 - リンカー - CD3結合領域 - LP2 - 第2の抗原結合ドメインまたはCRBRという構造的配置を有する、態様1～169のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

171.

リンカーが切断可能リンカーである、態様170の多重特異性ポリペプチド構築物。

172.

2つの連結ペプチドが相互に同一ではない、態様170および171の多重特異性ポリペプチド構築物。

173.

LP1またはLP2が独立に約1～20アミノ酸長のペプチドである、態様166～172のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

174.

10

20

30

40

50

LP1またはLP2が独立に、SEQ ID NO:10～13、119、135、147、149に示されるGly-SerリンカーもしくはGGGであるかまたはそれを含むペプチドを含む、態様173の多重特異性ポリペプチド。

175.

抗CD3抗体または抗原結合断片がFv抗体断片である、態様1～174のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

176.

Fv抗体断片が、ジスルフィド安定化抗CD3結合Fv断片(dsFv)である、態様175の多重特異性ポリペプチド構築物。

177.

抗CD3抗体または抗原結合断片が、
アミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO:16) を含むVH CDR1；アミノ酸配列
RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 17)

を含むVH CDR2；アミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:18) を含むVH CDR3
；アミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:19) を含むVL CDR1；アミノ酸配列
GTNKRAP (SEQ ID NO:20) を含むVL CDR2；およびアミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO:21) を含むVL CDR3
を含む、態様1～176のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

178.

抗CD3 dsFvが、
SEQ ID NO:14および32～62のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:14
および32～62のうちのいずれかとの少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有する、VH；ならびに
SEQ ID NO:15および63～81のうちのいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:15、63～81、および241のうちのいずれかとの少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示す配列を有する、VL
を含む、態様149または態様150の多重特異性ポリペプチド構築物。

179.

抗CD3 dsFvが、SEQ ID NO:14のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:15のアミノ酸配列
を含む、態様175～178のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

180.

抗CD3 dsFvが、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:72のアミノ酸配列
を含むか；または抗CD3 dsFvが、SEQ ID NO:44のアミノ酸配列およびSEQ ID NO:241
のアミノ酸配列を含む、態様175～179のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

181.

作用物質にコンジュゲートされている、態様1～181のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

182.

作用物質が、治療剤、抗腫瘍剤、毒素もしくはその断片、検出可能部分、または診断剤
である、態様181の多重特異性ポリペプチド構築物。

183.

作用物質が、リンカーを介して多重特異性ポリペプチド構築物にコンジュゲートされている、態様182の多重特異性ポリペプチド構築物。

184.

態様1～183のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物をコードする、ポリヌクレオチド。

185.

態様1～183のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物のうちのいずれかのポリペプチド鎖をコードする、ポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

186.

態様1～183のいずれかの多重特異性構築物の第1のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、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、

第1および第2の核酸配列が、配列内リボソーム進入部位（IRES）によって、または自己切断ペプチドもしくはリボソームスキッピングを引き起こすペプチドをコードする核酸によって、分離されている、
ポリヌクレオチド。

187.

第1の核酸配列および第2の核酸配列が同一のプロモーターに機能的に連結されている、
態様186のポリヌクレオチド。

10

188.

多重特異性ポリペプチド構築物が第3のポリペプチド鎖を含み、ポリヌクレオチドが、多重特異性構築物の第3のポリペプチドをコードする第3の核酸をさらに含む、態様186または態様187のポリヌクレオチド。

189.

第3の核酸が、配列内リボソーム進入部位（IRES）によって、または自己切断ペプチドもしくはリボソームスキッピングを引き起こすペプチドをコードする核酸によって、第1および/または第2のポリペプチドから分離されており、かつ/または

第3の核酸配列が、第1および/または第2の核酸配列と同一のプロモーターに機能的に連結されている、
態様188のポリヌクレオチド。

20

190.

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核酸が、T2A、P2A、E2A、またはF2Aより選択される、態様186～189のいずれかのポリヌクレオチド。

191.

態様184～190のいずれかのポリヌクレオチドを含む、ベクター。

192.

発現ベクターである、態様191のベクター。

30

193.

ウイルスベクターまたは真核生物ベクターであるベクターであって、任意で、真核生物ベクターが哺乳動物ベクターである、態様191または192のベクター。

194.

態様184～190のいずれかの1種または複数種のポリヌクレオチドまたは態様191～193のいずれかの1種または複数種のベクターを含む、細胞。

195.

組換えであるかまたは単離されている、態様194の細胞。

196.

哺乳動物細胞である、態様195の細胞。

40

197.

HEK293細胞またはCHO細胞である、態様196の細胞。

198.

態様184～190のいずれかの1種または複数種のポリヌクレオチドまたは態様191～193のいずれかの1種または複数種のベクターを、細胞に導入する工程、および

多重特異性ポリペプチド構築物が産生される条件の下で、該細胞を培養する工程を含む、多重特異性ポリペプチド構築物を作製する方法。

199.

細胞によって多重特異性ポリペプチドが産生される条件の下で、態様194～198のいずれかの細胞を培養する工程を含む、多重特異性ポリペプチド構築物を作製する方法。

50

200.

哺乳動物細胞である、態様198または態様199の細胞。

201.

HEK293細胞またはCHO細胞である、態様200の細胞。

202.

多重特異性ポリペプチド構築物を細胞から単離するかまたは精製する工程をさらに含む、態様198または態様199の方法。

203.

多重特異性ポリペプチド構築物がヘテロ二量体である、態様198～202のいずれかの方法。

204.

態様198～203のいずれかの方法によって作製された、多重特異性ポリペプチド構築物。

205.

態様1～183または態様204のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

206.

無菌である、態様205の薬学的組成物。

207.

標的細胞およびT細胞を態様1～183もしくは態様204のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物または態様205もしくは態様206の薬学的組成物と接触させる工程を含む、免疫応答を刺激するかまたは誘導する方法であって、標的細胞が、多重特異性ポリペプチド構築物によって認識される腫瘍関連抗原を発現している、方法。

208.

標的細胞が、腫瘍関連抗原（TAA）を発現している腫瘍細胞である、態様207の方法。

209.

多重特異性ポリペプチド構築物が、プロテアーゼの基質として機能する切断可能リンカーを含み、免疫応答の誘導または刺激がプロテアーゼの存在下で増加する、態様207または態様208の方法。

210.

免疫エフェクター細胞によって、腫瘍によって、または腫瘍微小環境に存在する細胞によって、プロテアーゼが産生される、態様209の方法。

211.

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、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209または態様210の方法。

212.

免疫エフェクター細胞が、抗原を発現する細胞の近傍にある、態様211の方法。

213.

プロテアーゼが、組織内のTAAを発現する細胞の近傍にある腫瘍によって産生され、かつ/または組織内のTAAと共局在している腫瘍によって産生され、

多重特異性ポリペプチド構築物がプロテアーゼに曝された時に、プロテアーゼが多重特異性ポリペプチド構築物内の切断可能リンカーを切断する、態様207～212のいずれかの方法。

214.

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より選択される、態様207～213のいずれかの方法。

215.

プロテアーゼがグランザイムBである、態様214の方法。

216.

10

20

30

40

50

接触させる工程が、エキスピボまたはインビトロで実施される、態様207～215のいずれかの方法。

217.

接触させる工程が、対象においてインビボで実施される、態様207～216のいずれかの方法。

218.

態様1～183もしくは態様204のいずれかの多重特異性コンジュゲートまたは態様205もしくは態様206の薬学的組成物を治療的に有効な量で、それを必要とする対象へ投与する工程を含む、対象における免疫応答を刺激するかまたは誘導する方法。

219.

細胞性免疫を増加させる、態様207～218のいずれかの方法。

220.

T細胞活性を増加させる、態様207～219のいずれかの方法。

221.

細胞溶解性T細胞（CTL）活性を増加させる、態様207～220のいずれかの方法。

222.

腫瘍または癌に対する免疫応答が増加する、態様207～221のいずれかの方法。

223.

対象における疾患または状態を処置する、態様207～222のいずれかの方法。

224.

態様1～183のいずれかの多重特異性コンジュゲートまたは態様205もしくは態様206の薬学的組成物を治療的に有効な量で、それを必要とする対象へ投与する工程を含む、対象における疾患または状態を処置する方法。

225.

疾患または状態が腫瘍または癌である、態様223または態様224の方法。

226.

対象がヒトである、態様207～225のいずれかの方法。

【実施例】

【0392】

VI. 実施例

以下の実施例は、例示的な目的のために含まれるに過ぎず、本発明の範囲を限定するためのものではない。

【0393】

実施例1：制約されたCD3結合領域および共刺激受容体結合ドメインを含有している多重特異性ポリペプチド構築物の生成

実施例1は、制約されたCD3結合を示すCD3結合領域、共刺激受容体に結合する結合ドメイン、および腫瘍関連抗原（TAA）のような細胞表面抗原に結合する1つまたは複数の抗原結合ドメインを含有している多重特異性ポリペプチド構築物の生成および発現を記載する。CD3結合領域にリンカー（例えば、切断可能リンカーまたは非切断可能）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、Fc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられた腫瘍関連抗原（TAA）に結合する1つまたは複数の抗原結合ドメイン、ならびにFc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられた少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）を含有している多重特異性構築物を、図1に示され、図2A～2Fおよび図3にさらに例示される様々な配置で生成した。

【0394】

異なるTAA抗原結合ドメイン、共刺激受容体結合領域、およびリンカーを含む例示的な代表的な構築物を生成した。他のヘテロ二量体Fc配置、例えば、記載された任意のもののような他のノブイントゥホール配置；他のリンカー、例えば、非切断可能リンカー、もしくは他の切断可能リンカー、具体的には、グランザイムB、マトリプターゼ、および/もし

10

20

30

40

50

くはMMPのようなプロテアーゼの基質認識部位を含むポリペプチドリinker；他のCD3結合領域、例えば、他の抗CD3抗体、例えば、dsFvもしくはその他の1価断片；scFvフォーマット、sdAbフォーマット、もしくはFabフォーマットのような他のTAA抗原結合断片；またはscFvフォーマット、sdAbフォーマット、もしくはFabフォーマットのような他の共刺激受容体結合領域を使用して、類似の構築物が生成されてもよい。

【0395】

例示的な構築物において、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を少なくともコードするポリヌクレオチドを、生成し、発現のためのプラスミドにクローニングした。第1のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端へ順に、（例えば、SEQ ID NO:83または292に示される）Fcホールポリペプチド；プロテアーゼのための1つまたは複数の基質認識部位を含有しているもののような切断可能リンカー；および（例えば、SEQ ID NO:72に示される）dsFv抗CD3抗体の可変軽鎖（VL）ドメインを含んでいた。第2のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端へ順に、（例えば、SEQ ID NO:82または291に示される）Fcノブポリペプチド；第1のポリペプチド鎖と同一の切断可能リンカー；および（例えば、SEQ ID NO:44に示される）dsFv抗CD3抗体の可変重鎖ドメインを含んでいた。グランザイムBの基質認識部位を含有している例示的な切断可能リンカー
GGSGGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO:105)

を、例示的な構築物において使用した。

【0396】

ポリペプチド鎖のうち的一方または両方は、さらに、様々な配置で、Fc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側の1つまたは複数のTAA抗原結合ドメイン、ならびにFc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側の共刺激受容体結合ドメインをコードした。例示的な生成されたタンパク質には、シングルドメイン抗体（sdAb）としてのTAA結合ドメインおよび共刺激受容体結合ドメインが組み入れられた。

【0397】

例示的な構築物において、TAA抗原結合ドメイン（例えば、sdAb）は、ペプチドリinker、例えば、PGGGG (SEQ ID NO:102) によって、Fcヘテロ二量体的一方もしくは両方のポリペプチド鎖（例えば、ホールおよび/もしくはノブ）にN末端で連結され、かつ/またはペプチドリinker、例えば、GGGG (SEQ ID NO:103) によって、CD3結合領域的一方もしくは両方のドメイン（例えば、VHおよび/もしくはVL）にC末端で連結された。他の類似したペプチドリinkerが利用されてもよい。TAAに結合する任意の抗原結合ドメインが、提供された多重特異性ポリペプチド構築物において利用され得る。例示的な生成されたタンパク質は、腫瘍関連抗原B7H3および5T4のうちの一つに結合する抗原結合ドメインを含有していた。いくつかのケースにおいて、TAA抗原結合ドメインは、同一であった。いくつかのケースにおいて、TAA抗原結合ドメインは異なっており、従って、生成された多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも2種の異なるTAA、同一のTAAの異なるエピトープ、または同一のTAAの同一のエピトープに対する特異性を示した。

【0398】

例示的な構築物において、共刺激結合領域（例えば、sdAb）は、ペプチドリinker、例えば、GGGG (SEQ ID NO:103) によって、C末端でFcヘテロ二量体のポリペプチド鎖（例えば、ホールおよび/またはノブ）に連結された。一般に、共刺激結合領域（例えば、sdAb）は、CD3結合領域に対してカルボキシ末端側にあった。他の類似したペプチドリinkerが利用されてもよい。共刺激受容体に結合する任意の共刺激結合領域が、提供された多重特異性ポリペプチド構築物において利用され得る。例示的な生成されたタンパク質は、以下の共刺激受容体：41BB、OX40、GITR、ICOS、CD28、またはCD27のうちの一つに結合する共刺激結合領域を含有していた。

【0399】

B7H3の同一のエピトープに特異的な2つのTAA抗原結合ドメインを含有しており、41BBを標的とする付加的な共刺激受容体結合領域（cx3091）、OX40を標的とする付加的な共刺激受容体結合領域（cx3723）、GITRを標的とする付加的な共刺激受容体結合領域（cx3724）、ICOSを標的とする付加的な共刺激受容体結合領域（cx3721）、またはCD28を標的とする付加的な共刺激受容体結合領域（cx3726）をさらに含有している例示的な多重特異性ポリペプチド構築物を生成した（図2A～2F）。比較のため、B7H3の同一のエピトープに特異的な2つのTAA抗原結合ドメインを含有しており、CRBRを含まない多重特異性ポリペプチド構築物（cx3095または3834）を生成した（図2A）。cx3834は、cx3095と比較して逆のノブおよびホール配置を有し、従って、図2Aに図示されたcx3834の第1のポリペプチド鎖は、Fcホールポリペプチドを含有しており、図示された第2のポリペプチドは、Fcノブポリペプチドを有する。

10

【0400】

4-1BBを標的とする付加的なCRBRと共に、5T4に特異的なTAA抗原結合ドメインを含有している例示的な多重特異性ポリペプチド構築物を生成した。生成されたいくつかの例示的な構築物は、4-1BB共刺激受容体を標的とする（それぞれ、SEQ ID No:308、309、および310に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有しており；例えば、SEQ ID NO:215に示される）sdAbを含有していた。生成された構築物には、5T4を標的とする異なる抗原結合ドメインを各々含むcx3497およびcx3499が含まれていた。それぞれ、cx3547およびcx3546と名付けられた、CRBRを含まない、cx3497およびcx3499のための対照構築物も生成した（図3）。

20

【0401】

例示的な多重特異性ポリペプチド構築物において使用されたCRBRは、表E1に示される。

【0402】

（表E1）例示的な多重特異性ポリペプチド構築物におけるCRBR

例示的な生成された分子	CRBR	SEQ ID NO
cx3091, cx3497, cx3499	41BB sdAb RH3v5-1	215
cx3723	OX40 sdAb 1D10v1	225
cx3724	GITR sdAb C06v3	235
cx3721	ICOS sdAb	239
cx3726	CD28 sdAb	240

30

【0403】

（各々B7H3を標的とする）cx3095、cx3834、cx3723、cx3724、cx3721、cx3726、およびcx3091；（各々5T4を標的とする）cx3546、cx3547、cx3497、およびcx3499と名付けられた例示的な多重特異性ポリペプチド構築物のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドを生成した。切断可能リンカーまたは非切断可能リンカーを含有する構築物を生成した。

【0404】

ヘテロ二量体制約CD3結合タンパク質の各鎖をコードする別々のプラスミドを、ポリエチレンジオキサンを使用して、哺乳動物細胞（HEK293またはCHOのいずれか）に等モル比で一過性トランスフェクトした。上清中に分泌された組換えタンパク質を、3～7日後に収集し、プロテインAクロマトグラフィ後の調製用サイズ排除クロマトグラフィ（SEC）またはフロースルー疎水性相互作用クロマトグラフィ（HIC）のいずれかによって精製した。プロテインAに結合しないよう、ヘテロ二量体Fcの一方の鎖（一般的には、ホールFc）の位置I253RまたはH435Rにおいて設計された変異によって、ヘテロ二量体タンパク質を選択的に精製した。より疎水性であり、予想される分子量の2倍である、2つのヘテロ二量体Fcを含有している不要のクロスペア種を除去するため、SEC（Superdex-200樹脂を含むAKTA）またはFT-HIC（ブチル/フェニルセファロースを含むAKTA）における第2のクロマ

40

50

トグラフィ工程を使用した。

【0405】

方法は、ヘテロ二量体Fcの適切に対合した種ならびに記載されたようなジスルフィド安定化抗CD3 Fv（抗CD3のSEQ ID NO:44に示される変異G44Cを含むVHおよびSEQ ID NO:72に示される変異G100Cを含むVL）を含有しているヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の生成に有利であった。精製されたヘテロ二量体制約CD3結合タンパク質は、安定しており、4℃でのインキュベーションの延長、またはタンパク質濃度の増加によって、クロスペア種を蓄積しなかった。

【0406】

実施例2：フローサイトメトリーによる癌細胞および初代T細胞との結合

10

この実施例は、例示的な構築物のT細胞または癌細胞との結合を評価する研究を記載する。これらの研究は、相互に単離されたT細胞のみまたは癌細胞のみのいずれかを含有している単一培養物において実施された。

【0407】

cx3091（共刺激受容体結合領域を含む）およびcx3095（共刺激受容体結合領域を含まない）と本明細書中で呼ばれる本開示の例示的な多重特異性ポリペプチド構築物の、初代T細胞の表面上のCD3、およびB7H3発現細胞（A375）との結合を評価した。実施例1に記載されるように、cx3091およびcx3095は、シングルドメイン抗体であるB7H3結合ドメインを含有していた。さらに、cx3091は、シングルドメイン抗体である41BB結合ドメインを含有している。試験された構築物の腫瘍抗原結合ドメインは、初代T細胞において発現されないB7H3に結合する。比較のため、SEQ ID NO:169、145、または146に示されるポリペプチド配列が組み入れられたDART-Fcフォーマットを、類似した方法を使用して作製した。初代T細胞を、健常ヒトドナーのleukopaksから単離されたPBMCからネガティブ濃縮した。結合した構築物を、いずれかのヒトに特異的なフルオロフォアがコンジュゲートされた二次抗体によって検出し、フローサイトメトリーによって結合を測定した。二次抗体のみと共にインキュベートされた細胞は、陰性対照として役立った。

20

【0408】

研究のため、各構築物cx3091、cx3095、またはB7H3×CD3 DART-Fcの48pM～200nMの滴定液を使用した。B7H3を標的とする代表的な制約CD3係合構築物は、B7H3発現細胞（A375）に結合することが見出されたが（図4Aおよび4B）、T細胞に結合する能力を欠いていた（図4Cおよび4D）。注目すべきことに、DART-Fcフォーマットのみが、B7H3係合の非存在下で、T細胞結合を可能にすることが観察された。重要なことに、41BB結合ドメインの付加は、T細胞結合を媒介しないことが観察され、41BB発現のためにT細胞活性化が必要とされることと一致していた。

30

【0409】

さらなる研究において、実質的に実施例1に記載されるように生成された、5T4を標的とする代表的な制約CD3係合構築物について、類似した制約された結合が観察された；cx3497には、付加的な41BB結合ドメインが組み入れられたが、cx3547には、共刺激受容体結合領域が組み入れられなかった。両方の構築物の5T4結合ドメインとしても、cx3497の41BB結合ドメインとしても、シングルドメイン抗体が組み入れられた。図5Aおよび5Bに示されるように、両方の構築物が、5T4発現細胞Ovar-5との結合を示した。しかしながら、それらの構築物は、単離されたT細胞には結合することができなかった（図5Cおよび5D）。

40

【0410】

実施例3：レポーターアッセイを使用した共刺激受容体シグナリングの評価

この実施例は、標的抗原発現細胞と共培養された41BBまたはOX40レポーターJurkat細胞株のいずれかを活性化する、様々な構築物の能力の評価を記載する。標的細胞と、細胞表面41BBまたはOX40およびNFκBによって駆動されるルシフェラーゼを発現する改変型Jurkat細胞との共培養物において、抗原を標的とする制約CD3係合構築物を滴定した。41BBまたはOX40の係合は、NFκBシグナリングおよびルシフェラーゼの産生をもたらす

50

。接着標的細胞を利用したレポーターアッセイのため、標的細胞を播種し、均一な分布のために室温で静置し、接着を可能にするため、37℃で数時間インキュベートした後、レポーター細胞および抗原を標的とする制約CD3係合構築物を添加した。レポーター細胞、標的細胞（陽性抗原または陰性細胞）、および制約CD3係合構築物の6時間のコインキュベーションの後、BioGlo試薬（Promega）を添加し、発光をSpectraMaxLにおいて測定した。

【0411】

この例示的なアッセイにおいて、試験された多重特異性構築物には、41BB結合共刺激受容体結合領域（cx3091）またはOX40結合領域（cx3723）を含むB7H3標的型制約CD3が含まれていた。対照として、共刺激受容体結合領域を含まない、対応するB7H3標的型制約CD3構築物も試験した（cx3095またはcx3834のいずれか）。標的細胞は、B7H3を発現するA375細胞（A375）またはB7H3がノックダウンされた（欠失された）A375（A375(Δ)B7H3）であった。

【0412】

図6Aに示されるように、41BB結合ドメインを含有している例示的なB7H3標的型制約CD3係合構築物（cx3091）は、共刺激結合領域を含有していない対応する構築物（cx3095）の存在下でインキュベートされた共培養物と比較した、レポーターシグナルの増加によって示されるように、標的抗原特異的な41BB作動を媒介することが示された。同様に、B7H3標的抗原を発現しない標的細胞と共培養されたT細胞においては、41BB作動が観察されず、それは、共刺激結合領域を含むB7H3標的型制約CD3構築物が、もっぱら標的抗原依存的にT細胞共刺激シグナリングを媒介する能力を示すという観察と一致していた。

【0413】

図6Bおよび6Cに示されるように、OX40結合ドメインを含有しているB7H3標的型制約CD3係合構築物（cx3723）について、類似した結果が観察された。注目すべきことに、共刺激結合ドメインを欠くB7H3標的型制約CD3係合構築物について観察されたレベルと比べて、OX40結合ドメインを含有しているB7H3標的型制約CD3係合構築物は、41BB発現レポーター細胞においてNFκBシグナリングを増強せず（図6C）、41BB結合ドメインを含有しているB7H3標的型制約CD3係合構築物は、OX40発現レポーター細胞におけるNFκBシグナリングを増強しなかった（図6B）。

【0414】

これらの結果は、共刺激受容体結合領域が組み入れられた抗原標的型制約CD3係合構築物の、抗原依存的な特異的な共刺激シグナリングを媒介する付加的な機能的特性を証明している。

【0415】

実施例4：レポーターアッセイを使用したCD3レポーターT細胞活性化の評価

この実施例は、標的抗原発現細胞と共培養されたCD3 NFATレポーターJurkat細胞株を活性化する、様々な構築物の能力の評価を記載する。抗原を標的とする制約CD3係合構築物を、標的細胞（B7H3発現細胞、またはB7H3がノックダウンされたB7H3^{-/-}細胞）と、NFATによって駆動される緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する改変型Jurkat細胞との共培養物において滴定した。CD3の係合は、NFATシグナリングおよび緑色蛍光の生成をもたらす。接着性標的細胞を利用したレポーターアッセイのため、標的細胞を播種し、均一な分布のために室温で静置し、接着を可能にするため、37℃で数時間インキュベートした後、レポーター細胞および抗原を標的とする制約CD3係合構築物を添加した。アッセイプレートをIncucyte ZOOM系を使用して連続的に画像化し、全緑色オブジェクト積分強度を測定することによってCD3レポーター細胞活性化を決定した。

【0416】

この例示的なアッセイにおいて、試験された多重特異性構築物には、41BB結合共刺激受容体結合領域を含むB7H3標的型制約CD3（cx3091）が含まれていた。対照として、共刺激受容体結合領域を含まない対応するB7H3標的型制約CD3（cx3095）も試験した。標的細胞は、B7H3を発現するA375細胞（A375）であった。

【0417】

図7Aに示されるように、例示的なB7H3標的型制約CD3係合構築物は、B7H3発現標的細胞の存在下で、レポーターT細胞共培養物においてインキュベートされた時、標的抗原特異的なT細胞活性化を媒介する能力を示した。しかしながら、B7H3標的細胞を含まない共培養物においては、レポーター活性が観察されなかった（図7B）。同様に、抗原発現A375細胞の存在下で、B7H3にも結合したが、B7H3陰性細胞には結合しなかった、例示的なDART-Fcについても、レポーター活性によって測定されるT細胞活性化が観察された。注目すべきことに、41BB含有構築物cx3091は、CRBRを含有していない構築物と比較して、増強されたNFATシグナリングを示したが、それは、Jurkat細胞生存度の増加および/またはTCR/CD3シグナリング後の消耗の低下によるものであり得る。

10

【0418】

これらの結果は、（実施例2に示されるように）単離されたT細胞においては、CD3結合ドメインを介したT細胞結合が制限または抑制されているが、本明細書中に提供された多重特異性ポリペプチドが、同族抗原に結合した後に、T細胞に係合し、T細胞活性化を媒介することができるようになることを証明する。

【0419】

実施例5：機能的活性の評価

この実施例は、ヒト初代T細胞インビトロアッセイにおいて試験された制約CD3係合構築物の評価および特徴決定を記載する。

【0420】

20

1. T細胞媒介細胞傷害

標的細胞を、CytoIDレッドによって蛍光標識した。接着性標的細胞を利用した細胞傷害アッセイのため、標的細胞を播種し、均一な分布のために室温で静置し、接着を可能にするため、37°Cで数時間インキュベートした後、その他のアッセイ成分を添加した。初代T細胞を、健康ヒトドナーのleukopakから単離されたPBMCからネガティブ濃縮し、10:1～40:1のT細胞-標的細胞比で添加した。アポトーシスを受けている細胞の核DNAを蛍光標識する緑色カスパーゼ3/7試薬を添加した。抗体を共培養物において滴定し、アッセイプレートにIncuCyte ZOOM系を使用して連続的に画像化した。（図8A、8B、9A～9E、10A、10Bに示されるように）全赤色/緑色オーバーラップオブジェクト面積を測定することによって、標的細胞死を決定した。ここでは、標的細胞をCytoIDレッドによって赤色に標識し、アポトーシスを緑色蛍光カスパーゼ3/7基質によってモニタリングしたため、アポトーシス標的細胞は、赤色および緑色に二重標識されたものである。図8Cおよび8Dに示されるアッセイの最後に残存している全赤色オブジェクトを測定することによって、標的細胞枯渇を決定した。

30

【0421】

図8A～8Dに示される例示的なアッセイにおいて、41BB結合共刺激受容体結合領域と共にB7H3標的型制約CD3を含む多重特異性構築物（cx3091）を試験した。対照として、共刺激受容体結合領域を含まない対応するB7H3標的型制約CD3（cx3095）またはB7H3に結合するDART-Fcも試験した。標的細胞は、B7H3を発現するA375またはB7H3がノックダウンされたA549細胞であった。例示的なB7H3標的型制約CD3係合構築物cx3095は、抗原陽性細胞株の強力なT細胞媒介細胞傷害を誘導したが（図8Aおよび8C）、抗原陰性細胞株においてはそれを誘導せず（図8Bおよび8D）、これは、抗原依存的なT細胞活性化を強力に誘導する能力と一致している。共刺激結合領域を含有していない対照構築物cx3095、およびDART-Fcも、細胞傷害活性を示したが、特に、試験された最低濃度においては、cx3091について観察されたものより低いレベルであった。cx3095は、41BB結合ドメインを欠く別のフォーマットDART-Fc B7H3×CD3と類似した効力を示した。

40

【0422】

類似したアッセイにおいて、他の共刺激受容体に結合する共刺激結合領域が組み入れられた他のB7H3標的型制約多重特異性ポリペプチド構築物によって、類似した結果が観察された。OX40（cx3723；図9A）、41BB（cx3091；図9B）、GITR（cx3724；図9C

50

)、ICOS (cx3721; 図9D)、またはCD28 (cx3726; 図9E) を標的とする共刺激受容体結合領域が組み入れられた多重特異性ポリペプチド構築物は、各々、共刺激受容体結合領域を欠く類似した構築物 (cx3834) と比較して、優れたB7H3陽性細胞A375のT細胞媒介細胞傷害を可能にした。

【0423】

類似したアッセイを、41BB結合共刺激受容体結合領域を含む5T4標的型制約CD3構築物 (cx3497) によって実施した。対照として、共刺激受容体結合領域を含まない対応する5T4標的型制約CD3 (cx3547) も試験した。標的細胞は、5T4を発現するOvcar-5細胞、または5T4を実質的に発現しないCCRF-CEM細胞であった。図10A~10Bに示されるように、代表的な5T4標的型制約CD3係合構築物cx3547は、抗原特異的な細胞傷害を媒介する能力を欠いていたが、41BB結合ドメインの付加は、5T4発現細胞株Ovcar-5に対する特異的なT細胞細胞傷害を誘導し、5T4陰性細胞株CCRF-CEMに対しては誘導しなかった。注目すべきことに、cx3497によって媒介されたT細胞媒介細胞傷害は、およそ40時間まで観察されなかったが、それは、TCRシグナリング後の41BBアップレギュレーションの動力学と一致している。

【0424】

これらの結果は、41BBのような共刺激受容体を標的とする共刺激受容体結合領域の付加が、共刺激受容体結合領域を欠く構築物と比べて、T細胞媒介細胞傷害の効力を増強したことを示している。これらの観察は、本明細書中に提供される付加的な共刺激受容体結合能力を有する抗原標的型制約CD3フォーマットが、抗原係合がない時にはT細胞に実質的に結合することなく、細胞傷害を媒介する増強された効力を示す能力を含む、他のCD3係合フォーマットと比較して、改善された活性を示すことを支持する。

【0425】

2. T細胞活性化

T細胞活性化を評価するため、前記のT細胞媒介細胞傷害アッセイから懸濁細胞を収集し、生死判別染料、ならびにフルオロフォアがコンジュゲートされた抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD25抗体、および/または抗CD71抗体によって染色した。細胞を、SONY SA3800スペクトル型アナライザーを使用して分析し、CD4+T細胞またはCD8+T細胞の活性化を、CD25もしくはCD71の発現レベルを測定することによって決定した。CD4集団およびCD8集団におけるCD71の発現レベルのフローサイトメトリー分析によって、T細胞活性化をモニタリングした。

【0426】

T細胞活性化を評価するため、T細胞と、標的細胞、B7H3陽性A375細胞またはB7H3がノックアウトされたA549細胞のいずれかとの共培養物において、cx3091、cx3095、またはDART-Fc B7H3×CD3を20時間インキュベートした。CD4集団およびCD8集団におけるCD71の発現レベルのフローサイトメトリー分析によって、T細胞活性化をモニタリングした。全ての試験された構築物の存在下で、B7H3を発現する標的細胞と共にインキュベートされたCD4 T細胞 (図11A) およびCD8 T細胞 (図11C) において、CD71の誘導によって測定されるT細胞活性化が明らかであった。しかしながら、示されるように、41BB結合ドメインが組み入れられたB7H3標的型制約CD3係合構築物cx3091は、観察されたT細胞活性化の程度に関して、41BB結合ドメインを欠く類似した構築物cx3095およびDART-Fcの両方より優れていた。図11Bおよび図11Dに示されるように、CD71発現によって測定されるT細胞活性化は、B7H3抗原の非存在下でのアッセイにおいて、それぞれ、CD4+T細胞またはCD8+T細胞において観察されなかった。

【0427】

3. T細胞サイトカイン産生

サイトカイン産生を評価するため、FluoroSpot膜を、4°Cで一晩、IFN γ 捕獲抗体によってコーティングした。膜を、PBSで洗浄し、抗体滴定液、標的細胞、およびPBMCからネガティブ濃縮されたT細胞を添加した。標的細胞:T細胞共培養のため、細胞を、1:10比で播種した。アッセイプレートを37°Cでおよそ24時間インキュベートし、膜を製造業者

の説明書に従って調製した。膜をCTL-ImmunoSpot S6 Universal Analyzerを使用して画像化した。アッセイウェル間で均一な曝露時間および強度設定を使用して、サイトカインスポット数を測定した。

【0428】

例示的なアッセイにおいて、試験された多重特異性構築物には、41BB結合共刺激受容体結合領域を含むB7H3標的型制約CD3 (cx3091) が含まれていた。対照として、共刺激受容体結合領域を含まない対応するB7H3標的型制約CD3 (cx3095) も試験した。標的細胞は、B7H3を発現するA375またはB7H3を発現しないCCRF-CEM細胞であった。B7H3を発現する標的細胞を含有している共培養物においてのみIFN γ が産生され (図12A)、B7H3陰性 (B7H3-) 標的細胞との共培養物においては産生されなかった (図12B) ことから示されるように、抗原標的型制約CD3係合構築物は、B7H3依存的にT細胞からのサイトカイン産生を誘発した。41BB結合ドメインの組み入れの、特異的なT細胞活性化を増強する能力と一致して、サイトカイン産生の程度は、41BB結合ドメインを含有しているcx3091構築物の存在下で、実質的により大きかった。

【0429】

4. T細胞サイトカイン産生 (ELISA)

5T4標的型制約CD3構築物による前記パート1に記載されたT細胞媒介細胞傷害アッセイからの上清を、サンドイッチELISA (BioLegend, USA) によってIFN γ 含量について分析した。さらに、41BB結合ドメインを含有している構築物cx3499、および41BB結合ドメインを含まないcx3546 (例えば、実施例1および図3を参照すること) も、アッセイにおいて評価した。製造業者の説明書に従い、標準曲線を生成し、そこから、上清試料のサイトカイン濃度値を内挿した。検出下限未満の吸光度値を有する試料には、最低標準濃度のものの半分に等しいサイトカイン濃度を割り当てた。

【0430】

図13は、代表的な5T4標的型制約CD3係合構築物が、41BB結合ドメインが構築物に組み入れられた時、T細胞によるIFN γ 産生の増強を抗原依存的に誘発することが観察され (cx3499およびcx3497)、41BB結合ドメインを含有していない類似した構築物においては、それが観察されなかったことを示している (cx3546およびcx3547)。

【0431】

5. NF κ Bルシフェラーゼレポーター

共刺激受容体結合ドメインを含有している制約CD3係合構築物の、それぞれの共刺激シグナリング経路の特異的な作動を媒介する能力も評価した。Jurkat OX40 (図14A) または41BB (図14B) NF κ Bルシフェラーゼレポーター細胞を、共刺激受容体結合ドメインを含有していないか (cx3834)、OX40結合ドメイン (cx3723) または41BB結合ドメイン (cx3091) を含有している、B7H3を標的とする例示的な制約CD3係合構築物を試験するために使用した。図14Aおよび図14Bに示されるように、それぞれ、OX40結合ドメインまたは41BB結合ドメインのいずれかが組み入れられたcx3723およびcx3091は、標的とされた共刺激受容体の特異的な作動を誘導することが見出された。NF κ Bシグナリングのある程度の誘導が、共刺激受容体結合領域を含有していない構築物を含め、全ての構築物によって観察され、このことから、この系においては、標的依存的なCD3シグナリングが、ある程度のNF κ Bシグナリングを媒介することが示唆された。B7H3陽性細胞株A375が使用された。

【0432】

実施例6: PD-1 sdAbの生成

ヒトPD-1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を介して生成した。以下に示されるヒトPD-1細胞外ドメイン (ECD; SEQ ID NO:242に示されるヒトPD-1、例えば、UniProt番号Q15116のアミノ酸25~167) の組換えバージョンによって、ラマおよびアルパカを免疫した。

10

20

30

40

50

LDSPDRPWNPPTEFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKL
 AAFPEDRSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQI
 KESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRSAGQFQ (SEQ ID NO:242の残基25～167)

【0433】

特異的な抗PD1抗体力価の発達の後、免疫された動物に由来する500mLの血液から、ラマ/アルパカ末梢血単核細胞（PBMC）を単離し、全mRNAを、Qiagen RNeasy Maxiキットを使用して単離し、その後、Thermo Superscript IV逆転写酵素およびオリゴdTプライミングを使用して、第1鎖cDNAに変換した。シングルドメイン抗体（sdAb；VHHとも呼ばれる）の配列を、鋳型としてcDNAを使用したPCRを介して特異的に増幅し、sdAb-Fc-AGA2融合タンパク質として酵母表面ディスプレイベクターにクローニングした。Fcは、（SEQ ID NO:1に示される）ヒトIgG1 Fcであった。

【0434】

これらのsdAbをディスプレイする酵母ライブラリーを、磁気ビーズ単離後の蛍光活性化細胞選別（FACS）を介して、PD-1 ECDの組換え型を使用して濃縮した。選別された酵母を播種し、単離されたコロニーを96穴ブロックに取り、sdAb-Fcの表面ディスプレイから培地への分泌に発現を切り替える培地において成長させた。例示的な同定されたsdAbは、表E2に示される。

【0435】

（表E2）PD-1 sdAb

クローン名	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
18H10	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	243

【0436】

実施例7：ラクダ科動物由来PD-1 sdAbのヒト化

例示的なラクダ科動物由来PD-1 sdAb、18H10を、足場としてヒトVH3-23生殖系列を使用してヒト化した。可溶性、特異性、安定性、および/または親和性に寄与するラクダ科動物残基は未修飾のままにした。さらに、（US20160207981に記載されたように）Leu11Glu（L11E）の修飾、ならびにSer112Lys（S112K）およびSer113Pro（S113P）のカルボキシ末端修飾は、sdAbに対する既存のADAの認識を防止するかまたは低下させることが公知であるため、ヒト化バリエーションは、全て、これらを含んでいた。表E3は、例示的なPD-1 sdAbヒト化バリエーションを示す。

【0437】

（表E3）PD-1 sdAbヒト化バリエーション

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
18H10 ヒト化バリエーション							
hz18H10v1	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	251
hz18H10v2	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	252
hz18H10v3	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	253
hz18H10v4	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	254
hz18H10v5	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	255
hz18H10v6	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	256
hz18H10v7	GSITGANTMG	273	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	257
hz18H10v8	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	258
hz18H10v9	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	259
hz18H10v10	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	260
hz18H10v11	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	261
hz18H10v12	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	262
hz18H10v13	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	263
hz18H10v14	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	264
hz18H10v15	GSITGANTMG	273	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	265
hz18H10v16	GSITGANTMG	273	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	266
hz18H10v17	GSITGANTMG	273	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	267

【0438】

実施例8：フローサイトメトリーによるsdAbのPD-1発現細胞との結合

PD-1発現細胞において、精製されたsdAb-Fcについて、特異性および相対的親和性を評価した。293細胞の一過性トランスフェクションのため、freeStyle 293細胞を新鮮なFreeStyle 293発現培地に、1mL当たり 1×10^6 細胞で再懸濁させた。トランスフェクション1回当たり50mLで細胞を播種し、37°Cでシェーカー上でインキュベートし、その間に、トランスフェクション試薬を調製した。各トランスフェクションプラスミド50 μ gを500 μ LのOptiMEMで希釈した。各トランスフェクションについて別々のチューブにおいて、150 μ gのポリエチレンイミン（PEI；75 μ Lの2mg/mL溶液）を500 μ LのOptiMEMに添加し、次いで、DNA:OptiMEM溶液と1:1で混合した。DNAおよびPEIを室温で15分間複合体化した。次いで、DNA:PEI複合体を、準備されたFreeStyle 293細胞のフラスコに滴下にて添加し、攪拌することによって混合した。トランスフェクトされた細胞を、タンパク質発現のための時間、37°Cのシェーカー上で一晩インキュベートした。使用されたトランスフェクションプラスミドは、ヒト（hu）、カニクイザル（cy）、およびマウス（mu）に由来するシトリン（citrin）タグ付きの全長PD1タンパク質をコードした。

【0439】

実施例6および7に記載された例示的なPD-1-sdAb-Fc融合タンパク質の結合を、一過性トランスフェクトされたPD-1発現細胞を使用したフローサイトメトリーによって評価した。トランスフェクトされていないFreeStyle 293細胞（UT 293）または一過性トランスフェクトされたFreeStyle 293細胞（huPD1-FL 293、cyPD1-FL 293、またはmuPD1-FL 293）を、FACS緩衝液（1 $\times$ TBS、0.01%FBS、0.002%アジ化ナトリウム）で 0.5×10^6 細胞/mLに希釈し、96穴平底アッセイプレートに100 μ L/ウェルで播種した。アッセイプレートを約750rpmで5分間遠心分離し、次いで、上清を除去し、一次抗体希釈物を以下のように添加した。18H10またはhz18H10v7の111nM $\sim$ 0.0169nMの範囲の3倍9点段階希釈物をFACS緩衝液で調製し、50 μ L/ウェルの希釈された抗体を、293細胞を含有しているアッセイプレートに添加した。細胞を4°Cで30分間抗体希釈物中でインキュベートした。30分のインキュベーションの後、アッセイプレートを約750rpmで5分間遠心分離し、150 μ LのFACS緩衝液で洗浄し、約750rpmで5分間再び遠心分離した。洗浄液を除去し、FACS緩衝液で1:1000希釈されたAlexa Fluor 647がコンジュゲートされたロバ抗ヒトIgGを50 μ L/ウェルで添加し、4°Cで20分間インキュベートした。次い

で、アッセイプレートを、750rpmで5分間遠心分離し、150 μ LのFACS緩衝液で洗浄し、750rpmで5分間再び遠心分離した。洗浄液を除去し、細胞を、フローサイトメトリー (iQue Intellicyte) による分析のため、30 μ L/ウェルのFACS緩衝液に再懸濁させた。

【0440】

非発現 (UT 293) 細胞と各々比較された、ヒトPD-1発現細胞 (huPD1-FL 293、図15A)、カニクイザルPD-1発現細胞 (cynoPD1-FL 293、図15B)、またはマウスPD-1発現細胞 (muPD1-FL 293、図15C) との結合についての例示的な結果が、18H10 (ラマに由来する親; SEQ ID NO:243) または18H10h zv7 (SEQ ID NO:257) について、図15A~15Cに示される。

【0441】

実施例9: フローサイトメトリーによるPD-1 sdAbの活性化ヒトT細胞との結合の評価

PD-1-sdAb-Fc融合タンパク質の活性化ヒトT細胞との結合を、フローサイトメトリーによって評価した。

【0442】

ヒトT細胞の濃縮および活性化のため、末梢血単核細胞 (PBMC) を、密度勾配遠心分離を使用して、ヒトドナー血液から単離した。血液試料をPBS/2%FBSで希釈し (1:2)、30mLの希釈された血液を15mLのLymphoprep密度勾配媒体に重層した。遠心分離後、血漿とLymphoprepとの界面のPBMC層を取り出し、残存している赤血球を、室温で5分間、赤血球溶解緩衝液を使用して溶解した。非T細胞集団を、CD14、CD16、CD19、CD20、CD36、CD56、CD123、TCR γ / δ に対するビオチン化された抗系統マーカー抗体によって標識し (20分、室温)、磁性ストレプトアビジン粒子を使用して枯渇させた。T細胞画分を含有している未結合細胞上清を保持した。濃縮されたヒトT細胞を、1 μ g/mLマウス抗ヒトCD3 (OKT3) によってコーティングされた組織培養プレートに、培地1mL当たり約 2×10^6 細胞の密度で播種することによって3日間活性化した。活性化されたT細胞を、PBSで1回洗浄した後、結合アッセイにおいてさらに使用した。

【0443】

ヒト活性化T細胞との結合のため、18H10 (SEQ ID NO:243) またはヒト化18H10 (h zv7; SEQ ID NO:257) の167nM~0.00847nMの範囲の4倍10点段階希釈物をインキュベーションのために使用したことを除き、実質的に実施例8に記載されたように、フローサイトメトリーによって、結合を評価し、定量化した。図16に示されるように、試験された例示的なPD-1を標的とする構築物およびそのヒト化バリエーションは、濃縮され活性化されたヒトT細胞に結合することが見出された。

【0444】

実施例10: レポーターアッセイを使用したPD-1/PD-L1阻止の評価

TCR係合がルシフェラーゼレポーター遺伝子の転写をもたらす、PD-1発現Jurkatエフェクターレポーター細胞株を、PD-1を標的とする例示的なsdAbの、PD-1とPD-L1との相互作用を阻止する能力を評価するために使用した。アッセイにおいて、TCR特異的な活性化シグナルを提供するため、PD-L1発現aAPC/CHOK1細胞をJurkatレポーター細胞と共培養し、それと同時に、エフェクター細胞におけるPD-1の係合を通して、このシグナルを抑制した。PD-1 sdAbの、抑制されたシグナルを阻止し、TCR係合を増強する能力をモニタリングした。

【0445】

PD-L1発現aAPC/CHOK1細胞を、アッセイの1日前に、10%FBSが補足された100 μ LのハムF12に播種した。アッセイ当日に、全ての培地を廃棄し、18H10 (SEQ ID NO:243) またはヒト化18H10 (h zv7; SEQ ID NO:257) を含有している試験タンパク質の滴定液 (出発濃度: 50nM、1:4滴定) を含有している40 μ Lのアッセイ培地 (1%FBSが補足されたRPMI 1640) に交換した。次いで、Jurkat PD-1レポーター細胞をプレートに添加し (40 μ L)、プレートを6時間インキュベートした (37°C、加湿雰囲気中5%CO₂)。インキュベーションの後、等しい体積のBioGloルシフェラーゼアッセイ基質をウェルに添加し、室温で10分間インキュベートし、発光を評価し、分析した。

10

20

30

40

50

【0446】

図17に示されるように、TCR係合およびルシフェラーゼ転写の存在によって示されるように、例示的な試験されたタンパク質18H10 (SEQ ID NO:243) またはヒト化18H10 (hzv7; SEQ ID NO:257) によるPD-1/PD-L1の阻止が観察された。

【0447】

実施例11:抗PD1 sdAbを含むTAA標的型制約CD3結合タンパク質を作製する方法

制約されたCD3結合を示すジスルフィド安定化抗CD3 Fv結合領域、ヘテロ二量体Fcドメイン、Fc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられた1つまたは複数のTAA抗原結合ドメイン、ならびにFc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられたPD-1に対するシングルドメイン抗体 (sdAb) を含有している抑制性受容体結合領域 (IRBR) を含有している多重特異性ポリペプチド構築物を生成した。いくつかのケースにおいて、Fc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられた少なくとも1つの共刺激受容体結合領域 (CRBR)、例えば、41BBに対するCRBRを含有している多重特異性ポリペプチド構築物を生成した。図18A~18Bに示される様々な配置で多重特異性構築物を生成した。

【0448】

例示的な構築物において、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を少なくともコードするポリヌクレオチドを生成し、発現のためのプラスミドにクローニングした。第1のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端へ順に、(例えば、SEQ ID NO:91、またはいくつかのケースにおいて、SEQ ID NO:93に示される) Fcホールポリペプチド; プロテアーゼの1つまたは複数の基質認識部位を含有しているもののような切断可能リンカーまたは非切断可能リンカー; および (例えば、SEQ ID NO:241に示される) dsFv抗CD3抗体の可変軽鎖 (VL) ドメインを含んでいた。第2のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端へ順に、(例えば、SEQ ID NO:84、またはいくつかのケースにおいて、SEQ ID NO:88に示される) Fcノブポリペプチド; 第1のポリペプチド鎖と同一の切断可能リンカーまたは同一の非切断可能リンカー; および (例えば、SEQ ID NO:44に示される) dsFv抗CD3抗体の可変重鎖ドメインを含んでいた。例示的な非切断可能リンカー
GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:119)

またはグランザイムBの基質認識部位を含有している例示的な切断可能リンカー
GGSGGGGIEPDIGGSGGS (SEQ ID NO:105)

を含む構築物を生成した。ポリペプチド鎖のうち的一方または両方は、様々な配置で、Fc領域に対してアミノ末端側および/もしくはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に、抑制性受容体結合領域としてのPD-1 sdAb (例えば、SEQ ID NO:243またはSEQ ID NO:257) を、かつ/またはFc領域に対してアミノ末端側および/もしくはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に、共刺激受容体結合ドメインとしての4-1BB sdAb (例えば、SEQ ID NO:215) をさらにコードした。

【0449】

ヘテロ二量体制約CD3結合タンパク質の各鎖をコードする別々のプラスミドを、ポリエチレンイミンを使用して、哺乳動物細胞 (HEK293またはCHOのいずれか) に等モル比で一過性トランスフェクトした。上清中に分泌された組換えタンパク質を3~7日後に収集し、分泌された組換えタンパク質を、プロテインAクロマトグラフィ後の調製用サイズ排除クロマトグラフィ (SEC) またはフロースルー疎水性相互作用クロマトグラフィ (HIC) のいずれかによって精製した。プロテインAに結合しないよう、ヘテロ二量体Fcの一方の鎖 (一般的には、ホールFc) の位置I253RまたはH435Rにおいて設計された変異によって、ヘテロ二量体タンパク質を選択的に精製した。より疎水性であり、予想される分子量の2倍である、2つのヘテロ二量体Fcを含有している不要のクロスペア種を除去するため、

SEC (Superdex-200樹脂を含むAKTA) またはFT-HIC (ブチル/フェニルセファロースを含むAKTA) における第2のクロマトグラフィ工程を使用した。

【0450】

方法は、ヘテロ二量体Fcの適切に対合した種および記載されたようなジスルフィド安定化抗CD3 Fv (抗CD3のSEQ ID NO:44に示される変異G44Cを含むVHおよびSEQ ID NO:241に示される変異G100Cを含むVL) を含有しているヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の生成に有利であった。精製されたヘテロ二量体制約CD3結合タンパク質は、安定しており、4℃でのインキュベーションの延長、またはタンパク質濃度の増加によって、クロスペア種を蓄積しなかった。

【0451】

実施例12：制約されたCD3結合を有する構築物の生成

実施例12は、制約されたCD3結合を示すCD3結合領域を含有している多重特異性ポリペプチド構築物の生成および発現を記載する。CD3結合領域にリンカー（例えば、非切断可能リンカー）によってカップリングされた免疫グロブリンのヘテロ二量体Fc領域、ならびに多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられた腫瘍関連抗原（TAA）に結合する1つまたは複数の抗原結合ドメインを含有している多重特異性構築物を、図1、19A～C、および図20に示される様々な配置で生成した。

【0452】

A. 構築物の設計および生成

ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を少なくともコードするポリヌクレオチドを生成し、発現のためのプラスミドにクローニングした。第1のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端へ順に、第1のFcポリペプチド（例えば、Fcホールポリペプチド）；非切断可能リンカー；および抗CD3抗体の可変軽鎖（VL）ドメインを含んでいた。第2のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端へ順に、第2のFcポリペプチド（例えば、Fcノブポリペプチド）；第1のポリペプチド鎖と同一の非切断可能リンカー；および抗CD3抗体の可変重鎖（VH）ドメインを含んでいた。抗CD3抗体は、表E4に示されるように、ジスルフィド安定（dsFv）抗体（抗CD3の変異G44Cを含むVHおよび変異G100Cを含むVL）を含むか、または非ジスルフィド安定化Fv抗体を含有していた。表E12に示されるように、ポリペプチド鎖のヘテロ二量体化を容易にする様々な例示的なFcポリペプチド対を使用した。ポリペプチド鎖のうちの一方または両方は、様々な配置で、Fcドメインに対してアミノ末端側および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に1つまたは複数のTAA抗原結合ドメインをさらにコードした。他のヘテロ二量体Fc配置、例えば、記載された任意のもののような他のノブポイントホール配置；他のCD3結合領域、例えば、他の抗CD3抗体、例えば、dsFvもしくはその他の1価断片；またはscFvフォーマット、sdAbフォーマット、もしくはFabフォーマットのような他のTAA抗原結合断片を使用して、類似の構築物が生成されてもよい。

【0453】

生成された構築物において、非切断可能リンカーには、3～18アミノ酸の範囲のサイズのリンカーが含まれた。例示的な生成された分子において使用された非切断可能リンカーの例は、

GGGSGSGGS (SEQ ID NO:10), GGS GGS GGS (SEQ ID

NO:11), GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:12), GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:13),

ならびに GGGGGSGGGGGSGGGGGGS (SEQ ID NO:119, 例示的な構築物cx5823および

cx5952に含有されていた)または GGS GGS GGS GGS GGS GGS (SEQ ID NO:147)

であった。

【0454】

TAAに結合する任意の抗原結合ドメインが、提供された多重特異性ポリペプチド構築物

10

20

30

40

50

において利用され得る。例示的な生成されたタンパク質は、B7H3 (CD276) またはデルタ様3 (DLL3) 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、単鎖断片 (例えば、sdAbもしくはscFv) または二本鎖抗原結合断片 (Fab) を含むことができる。TAAが単鎖断片、例えば、sdAbまたはscFvとして提供された時、TAA抗原結合ドメインは、ペプチドリinker、例えば、PGGGG (SEQ ID NO:102) によって、Fcヘテロ二量体の一方もしくは両方のポリペプチド鎖 (例えば、ホールおよび/もしくはノブ) にN末端で連結され、かつ/またはペプチドリinker、例えば、GGGG (SEQ ID NO:103) によって、CD3結合領域の一方もしくは両方のドメイン (例えば、VHおよび/もしくはVL) にC末端で連結された。他の類似したペプチドリinkerが利用されてもよい。TAAがFab抗原結合断片として提供された時、構築物は、リンカーなし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してよい。

【0455】

例えば、それぞれ、1価、2価、3価、または4価の結合を提供するため、1、2、3、または4つのTAA抗原結合ドメインを含有している多重特異性ポリペプチド構築物を生成した。いくつかのケースにおいて、TAA抗原結合ドメインは同一であった (1エピトープ性)。いくつかのケースにおいて、TAA抗原結合ドメインは異なっており、従って、生成された多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも2種の異なるTAA、同一のTAAの異なるエピトープ (2エピトープ性)、または同一のTAAの同一のエピトープ (1エピトープ性) に対する特異性を示した。

【0456】

生成されたタンパク質には、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含まれていた。非切断可能リンカーを含有している例示的な多重特異性ポリペプチド構築物のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドを生成した。これらには、図19Aおよび19Bに図示される、B7H3を標的とする、cx3072、cx5952、cx6079、cx6080、cx6081、cx5823、cx5873、およびcx5965と名付けられたsdAb含有構築物；図19Cに図示される、B7H3を標的とする、cx5067、cx6083、およびcx6084と名付けられたFab含有構築物；ならびに図20に図示される、DLL3を標的とする、sdAbを含有しているcx5352、cx5800、およびcx5801が含まれていた。dsFv抗CD3抗体のVHドメインおよびsdAbが、両方とも、Fcヘテロ二量体の同一の側 (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 (例えば、図19Aに示されるcx3072およびcx5952) を生成した。構築物は、ジスルフィド安定化Fvを含まずに改変されたか、または抗CD3抗体のVHドメインおよびVLドメインを安定化するジスルフィド連結を含んで改変された。注目すべきことに、生成された例示的な構築物のうちのいくつかは、4-1BB共刺激受容体を標的とする (それぞれ、SEQ ID No:308、309、および310に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有しており；例えば、SEQ ID NO:215に示される) sdAbをさらに含有していた (例えば、cx5823、cx5873、cx5965、cx5352、cx5801、cx5800)。sdAbおよびFab TAAドメインを有する例示的な制約CD3結合構築物のリストは、以下の表E4に与えられる。

【0457】

(表 E 4) 例示的な制約CD3係合構築物

10

20

30

40

50

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 (SEQ ID NO:301)	xELL- ノブ (SEQ ID NO:88)	GGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	B7H3 sdAb 5 (SEQ ID NO:303)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:93)	GGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激 受容体sdAb	
cx5952	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO:301)	xELL- ノブ (SEQ ID NO:88)	GGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	B7H3 sdAb 5 (SEQ ID NO: 303)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:93)	GGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	なし	
cx6079	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO:301)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO:285)	GGGGSGGGSGGG GS (SEQ ID NO:170)	VH32 (SEQ ID NO: 287)	なし	なし
	2	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO:301)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO:286)	GGGGSGGGSGGG GS (SEQ ID NO:170)	VL20 (SEQ ID NO: 288)	なし	
cx6080	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO:301)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO:285)	GGGGSGGGSGGG GS (SEQ ID NO:170)	VH33 (SEQ ID NO: 311)	なし	あり
	2	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO:301)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO:286)	GGGGSGGGSGGG GS (SEQ ID NO:170)	VL21 (SEQ ID NO: 289)	なし	
cx6081	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO:301)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO:285)	GGGGSGGGSGGG GS (SEQ ID NO:170)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	なし	あり
	2	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO:301)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 286)	GGGGSGGGSGGG GS (SEQ ID NO:170)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	なし	

10

20

30

40

50

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
cx3072	1	B7H3 sdAb 2 (SEQ ID NO:302)	IgG1-ノブ (SEQ ID NO:82, 86 または 291)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	B7H3 sdAb 1 (SEQ ID NO:305)	あり
	2	なし	IgG1-ノブ (SEQ ID NO:83, 87 または 292)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	なし	
cx5873	1	なし	xELL-ノブ (SEQ ID NO:84, 88または293)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	B7H3 sdAb 3 (SEQ ID NO: 304)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:91, 93または296)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激 受容体sdAb	
cx5965	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO:301)	xELL-ノブ (SEQ ID NO:84, 88または293)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	なし	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:91, 93または296)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激 受容体sdAb	
cx5352	1	DLL3 sdAb 1 (SEQ ID NO:306)	xELL-ノブ (SEQ ID NO:84, 88または293)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	DLL3 sdAb2 (SEQ ID NO:307)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:91, 93 または 296)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激 受容体sdAb	
cx5800	1	DLL3 sdAb 1 (SEQ ID NO: 306)	xELL-ノブ (SEQ ID NO:84, 88または293)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	なし	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:91, 93 または 296)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激 受容体sdAb	
cx5801	1	なし	xELL-ノブ (SEQ ID NO:84, 88 または 293)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	DLL3 sdAb 2 (SEQ ID NO:307)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:91, 93 または 296)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激 受容体sdAb	
cx5187	1	B7H3 sdAb 4 (SEQ ID NO:301)	xELL-ノブ (SEQ ID NO:84, 88または293)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	B7H3 sdAb 3 (SEQ ID NO:304)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:91, 93 または 296)	GGGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激 受容体sdAb	

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
cx5067	1	B7H3-Fab (SEQ ID NO: 127, 128)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO: 285)	GGGSGGGSGGG GS (SEQ ID NO:170)	VH32 (SEQ ID NO: 287)	なし	なし
	2	B7H3-Fab (SEQ ID NO: 127, 128)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 286)	GGGSGGGSGGG GS (SEQ ID NO:170)	VL20 (SEQ ID NO: 288)	なし	
cx6083	1	B7H3-Fab (SEQ ID NO: 127, 128)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO: 285)	GGGSGGGSGGG GS (SEQ ID NO:170)	VH33 (SEQ ID NO: 311)	なし	あり
	2	B7H3-Fab (SEQ ID NO: 127, 128)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 286)	GGGSGGGSGGG GS (SEQ ID NO:170)	VL21 (SEQ ID NO: 289)	なし	
cx6084	1	B7H3-Fab (SEQ ID NO: 127, 128)	Fc-Het-1 (SEQ ID NO: 285)	GGGSGGGSGGG GS (SEQ ID NO:170)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	なし	あり
	2	B7H3-Fab (SEQ ID NO: 127, 128)	Fc-Het-2 (SEQ ID NO: 286)	GGGSGGGSGGG GS (SEQ ID NO:170)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	なし	

【0458】

B. 生成された構築物の発現および精製

ヘテロ二量体制約CD3結合タンパク質の各鎖をコードする別々のプラスミドを、ポリエチレンイミンを使用して、哺乳動物細胞（HEK293またはCHOのうちのいずれか）に等モル比で一過性トランスフェクトした。上清中に分泌された組換えタンパク質を3～14日後に収集し、プロテインAクロマトグラフィ後の調製用サイズ排除クロマトグラフィ（SEC）またはフロースルー疎水性相互作用クロマトグラフィ（HIC）のいずれかによって精製した。いくつかのケースにおいて、プロテインAに結合せず、従って、I253RまたはH435Rのホモ二量体が精製されないよう、ヘテロ二量体Fcのうちの一方の鎖（一般的には、ホールFc）の位置I253RまたはH435Rにおいて設計された変異によって、精製中にヘテロ二量体タンパク質が濃縮された。より疎水性であり、予想される分子量の2倍である、2つのヘテロ二量体Fcを含有している不要のクロスペア種を除去するため、SEC（Superdex-200樹脂を含むAKTA）またはFT-HIC（ブチル/フェニルセファロースを含むAKTA）による第2のクロマトグラフィ工程を使用した。

【0459】

方法は、ヘテロ二量体Fcおよび抗CD3 Fv（例えば、ジスルフィド安定化抗CD3 Fv）の適切に対合した種を含有しているヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の生成に有利であった。精製されたヘテロ二量体制約CD3結合タンパク質は、安定しており、4℃でのインキュベーションの延長、またはタンパク質濃度の増加によって、クロスペア種を蓄積しなかった。

【0460】

実施例13：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しているCD3制約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付けられた）1価sdAb抗原結合ドメインを含有している構築物の活性を、N末端およびC末端の両方に位置付けられた抗原ターゲティングsdAbを含有している二重結合構築物の活性と比較した。試験された構築物の各々は、CD3結合ドメインに対してC末端側に位置付けられたCRBRを含有していた。

【0461】

A. 結合

B7H3に対する抗原結合ドメインを含有している例示的な多重特異性構築物の結合を、B

7H3陽性A375腫瘍細胞、B7H3陰性CCRF-CEM細胞、または初代T細胞との結合について評価した。図21Aに示されるように、2価のB7H3を標的とする制約CD3係合構築物cx5187およびcx5823は、1価バージョンcx5873およびcx5965と比較して、より高い結合親和性をB7H3陽性A375細胞に対して示した。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細胞との検出可能な結合を示さなかった（図21B）。

【0462】

B. T細胞レポーター活性

1価または2価で抗原に係合する抗原標的型制約CD3係合構築物のB7H3抗原依存的なCD3作動能力を、CD3-NFAT Jurkatレポーター細胞を使用して評価した。Jurkat細胞は、NFATによって駆動される緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する。CD3の作動は、NFATシグナリングおよび緑色蛍光の生成をもたらす。このアッセイにおいて、標的細胞には、A375細胞（B7H3陽性）またはCCRF-CEM細胞（B7H3陰性）のいずれかが含まれた。接着性抗原発現標的細胞を利用したレポーターアッセイのため、標的細胞を播種し、均一な分布のために室温で静置し、接着を可能にするため、37℃で数時間インキュベートした後、レポーター細胞および抗原を標的とする制約CD3係合構築物を添加した。アッセイプレートにIncuCyte ZOOM系を使用して連続的に画像化し、積分された全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決定した。

【0463】

図21Cに示されるように、例示的な1価構築物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2価B7H3標的型構築物cx5187の存在下で観察された。構築物が、B7H3陰性CCRF標的細胞と共培養されたJurkatレポーター細胞と共にインキュベートされた時には、レポーター活性が観察されなかった（図21D）。

【0464】

C. 細胞傷害活性

それぞれ、B7H3陽性細胞株および陰性細胞株として使用されたメラノーマ細胞株A375およびT細胞急性リンパ芽球性白血病細胞株CCRF-CEMに対する、B7H3標的型CD3制約結合構築物の細胞傷害性を評価した。細胞傷害性を評価するため、標的細胞を1ウェル当たり 1.0×10^4 細胞で播種し、均一な分布のために室温で静置し、37℃で数時間インキュベートした。初代T細胞を、健康ヒトドナーのleukopaksから単離されたPBMCからネガティブ濃縮し、10:1のT細胞-標的細胞比で添加した。アポトーシスを受けている細胞の核DNAを蛍光標識する緑色カスパーゼ3/7試薬を添加した。制約されたCD3係合活性を有する多重特異性構築物を共培養物において滴定し、アッセイプレートをIncuCyte ZOOM系を使用して連続的に画像化した。全赤色/緑色オーバーラップオブジェクト面積を測定することによって標的細胞死を決定した。

【0465】

図22Aに示されるように、例示的な2価B7H3標的型制約CD3係合構築物cx5187は、構築物の1価バージョンcx5873およびcx5965と比較して、増強された標的依存的なT細胞媒介細胞傷害を示した。これらのアッセイにおいて、CCRF-CEM細胞が標的細胞として使用された図22Bに示されるように、標的細胞のB7H3発現の非存在下で、細胞傷害は観察されなかった。

【0466】

D. T細胞モジュレーション

cx5187、cx5873、またはcx5965の存在下で、B7H3陽性細胞株（A375）またはB7H3陰性細胞株（CCRF-CEM）と共にT細胞を培養することを含む、前記T細胞細胞傷害アッセイからの懸濁細胞において、CD25の発現によってT細胞活性化をモニタリングすることによって、T細胞モジュレーションを評価した。例示的なB7H3標的型制約CD3係合構築物の存在下で、B7H3陽性細胞株（A375）またはB7H3陰性細胞株（CCRF-CEM）と共にT細胞を培養することを含む、前記T細胞細胞傷害アッセイからの懸濁細胞を、T細胞活性化を評価するため、収集した。細胞を、生死判別染料、ならびにフルオロフォアがコンジ

ュゲートされた抗CD4抗体、抗CD8抗体、および抗CD25抗体によって染色した。細胞を、SONY SA3800スペクトル型アナライザーを使用して分析し、CD25の発現レベルまたはCD25陽性細胞の割合を測定することによって、CD4+T細胞またはCD8+T細胞の活性化を決定した。

【0467】

図23Aおよび23Bに示されるように、例示的な2価B7H3標的型制約CD3係合構築物cx5187は、CD4 T細胞およびCD8 T細胞におけるCD25アップレギュレーションの増強された効力によって証拠付けられるように、構築物の1価バージョンcx5873およびcx5965と比較して、増強された標的依存的なT細胞媒介活性化を示した。これらのアッセイにおいて、CCRF-CEM細胞が標的細胞として使用された図23Cおよび23Dに示されるように、標的細胞のB7H3発現の非存在下では、T細胞活性化が観察されなかった。これらの結果は、B7H3を標的とする制約CD3係合構築物が、CD4 T細胞およびCD8 T細胞の両方の強力な抗原依存的な活性化を誘導することを証明した。

【0468】

D. 概要

総合すると、これらの結果は、1価または2価のいずれかのsdAb抗原結合ドメインおよびCRBRを含有している構築物が、抗原依存的にCD3に結合し、T細胞を活性化することができることを証明している。注目すべきことに、2価の抗原標的型制約CD3係合構築物は、1価の抗原標的型制約CD3係合構築物より優れた抗原依存的なCD3結合および活性を示した。これらの結果は、N末端およびC末端の両方に位置付けられた二重の抗原結合ドメインを含有している構築物が、単一の1価の抗原結合ドメインのみを含有している1価の構築物より優れた結合およびT細胞活性を有するという所見と一致している。さらに、理論によって拘束されることは望まないが、sdAbがFcに対してN末端側にのみ位置付けられている構築物は、免疫シナプス距離を増加させ得るため、それと比較して、CD3結合ドメインに対してC末端側におけるsdAbのうちの1つの位置付けは、より最適な免疫シナプスを形成し得る。

【0469】

実施例14：単一または複数の抗原結合DLL3ターゲティングドメインを含有しているCD3制約多重特異性構築物の評価

この実施例は、例示的な生成されたDLL3標的型制約CD3係合構築物の、インビトロアッセイにおけるヒト初代T細胞における評価および特徴決定を記載する。

【0470】

DLL3標的型sdAbを含有している構築物を、T細胞レポーターアッセイにおいて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の抗DLL3 sdAbによってフォーマットされたDLL3標的型制約CD3係合構築物（例えば、cx5352、cx5800、およびcx5801）の活性を評価した（図20を参照すること、表E4およびE7も参照すること）。全ての試験された構築物が、抗CD3のVL G100Cと対にされたVH G44Cの修飾によって作出された鎖間ジスルフィド結合を含有しているジスルフィド安定化抗CD3 Fv (dsFv) を含有していた。さらに、各DLL3標的型構築物は、CD3 dsFvに対してC末端側に共刺激受容体sdAbを含有するよう改変された。

【0471】

A. 結合

DLL3に対する抗原結合ドメインを含有している例示的な多重特異性構築物の結合を、DLL3陽性SHP-77腫瘍細胞または初代T細胞との結合について評価した。図24Aに示されるように、2価DLL3標的型制約CD3係合構築物cx5352は、1価バージョンcx5800およびcx5801と比較して、より高い結合親和性をDLL3陽性SHP-77細胞に対して示した。図24Bに図示されるように、試験された構築物は、いずれも、DLL3陰性初代T細胞との結合を示さなかった。これらの結合アッセイは、フルオロフォアがコンジュゲートされた抗ヒトIgG Fc二次抗体を使用して、結合した構築物を検出する、フローサイトメトリーによって実施された。

【0472】

B. T細胞レポーター活性

NFATによって駆動されるルシフェラーゼを発現するJurkat細胞を使用し、ルシフェラーゼ活性をモニタリングしたことを除き、実質的に実施例13に記載されたように、レポーターアッセイにおいてT細胞活性を評価した。NFATによって駆動されるルシフェラーゼCD3 Jurkatレポーター細胞を、DLL3抗原に対する抗原結合ドメインを含有している1価および2価の構築物の存在下で、SHP-77（DLL3陽性）標的細胞と共培養した（図20を参照すること）。具体的には、図24Cに示されるように、例示的な2価構築物cx5352は、例示的な1価構築物cx5800およびcx5801と比較して、実質的に大きいルシフェラーゼ活性を、このアッセイにおいて誘導した。これらの結果は、B7H3標的型構築物によって観察された結果と一致しており、従って、構築物の活性が特定の標的抗原に特異的ではないことを示している。

10

【0473】

C. 概要

総合すると、これらの結果は、抗DLL3 sdAb結合ドメインおよびCRBRによってフォーマットされた制約抗CD3構築物が、DLL3発現細胞株SHP-77に結合し、抗原依存的なT細胞活性化を誘発することができることを証明している。これは、本明細書中に記載された制約抗CD3構築物が、ある標的抗原に特異的ではなく、標的を発現する細胞に対してT細胞細胞傷害および活性化を誘発するため、様々な抗原に結合するために有効であることを示唆している。

20

【0474】

実施例15：共刺激結合領域を含むか、または含まない、抗原結合5T4ターゲティングドメインを含有しているCD3制約多重特異性構築物の生成および評価

CD3結合領域にリンカー（例えば、非切断可能リンカー）によってカップリングされた免疫グロブリンのヘテロ二量体Fc領域を含有しており、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側およびCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に、5T4腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインを含有している多重特異性構築物を生成した。CRBRとしての4-1BBターゲティングsdAbを含むか、または含まない構築物を生成し、T細胞活性を様々なアッセイにおいて比較した。

【0475】

30

A. 構築物の設計および生成

図3に図示されるフォーマットで、例示的な多重特異性構築物を生成した。ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を少なくともコードするポリヌクレオチドを生成し、発現のためのプラスミドにクローニングした。第1のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端へ順に、第1のFcポリペプチド（例えば、Fcホールポリペプチド）；非切断可能リンカー；および抗CD3抗体の可変軽鎖（VL）ドメインを含んでいた。第2のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端へ順に、第2のFcポリペプチド（例えば、Fcノブポリペプチド）；第1のポリペプチド鎖と同一の非切断可能リンカー；および抗CD3抗体の可変重鎖（VH）ドメインを含んでいた。抗CD3抗体は、表E5に示されるように、ジスルフィド安定化（dsFv）抗体（抗CD3の変異G44Cを含むVHおよび変異G100Cを含むVL）を含んでいた。ポリペプチド鎖のうちの一方は、2つの5T4抗原結合ドメイン（Fcドメインに対してアミノ末端側に1つ、CD3結合領域に対してカルボキシ末端側に1つ）をさらにコードした。例示的な構築物cx5951は、CRBRなしに生成され、構築物cx5185は、CD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられたCRBRとしての4-1BB抗原結合ドメイン（例えば、sdAb）、例えば、それぞれ、SEQ ID NO:308、309、および310に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有しており；例えば、SEQ ID NO:215に示されるsdAbを含有していた。

40

【0476】

5T4ターゲティングsdAbドメインを有する例示的な制約CD3結合構築物の成分は、以下の表E5に与えられる。実質的に実施例12に記載されるように、構築物を発現させ、精製

50

した。

【0477】

(表E5) 5T4ターゲティングドメインを含有している例示的な制約CD3係合構築物

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
cx5951	1	5T4 sdAb hz12E9v9 (SEQ ID NO:322)	xELL-ノブ (SEQ ID NO:84)	GGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO:44)	5T4 sdAb hz16G10v11 (SEQ ID NO:323)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:85)	GGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO:72)	なし	
cx5185	1	5T4 sdAb hz12E9v9 (SEQ ID NO:322)	xELL-ノブ (SEQ ID NO:84)	GGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO:44)	5T4 sdAb hz16G10v11 (SEQ ID NO:323)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:91)	GGGGSGGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO:72)	41BB sdAb (例えば、SEQ ID NO: 215)	

【0478】

B. T細胞活性

様々なアッセイにおいて、CD3に係合する前記の構築物の活性を比較した。

【0479】

1. 細胞傷害活性

41BBに結合する共刺激受容体結合領域を含むか (cx5185) またはCRBRを含まない (cx5951) 例示的な5T4標的型構築物の存在下で、標的細胞に対する細胞傷害活性を評価した。細胞傷害アッセイのため、5T4を発現するOvcar-5細胞または5T4を発現しない対照のCCRF-CEM細胞を標的細胞として使用し、播種し、均一な分布のために室温で静置し、接着を可能にするため、37°Cで数時間インキュベートした後、その他のアッセイ成分を添加した。初代T細胞を、健常ヒトドナーのleukopaksから単離されたPBMCからネガティブ濃縮し、10:1~40:1のT細胞-標的細胞比で添加した。ここでは、標的細胞をCytoidレッドによって赤色に標識し、アポトーシスを緑色蛍光カスパーゼ-3/7基質によってモニタリングした；従って、アポトーシス標的細胞は、赤色および緑色に二重標識されるものである。アッセイプレートをIncuCyte ZOOM系を使用して連続的に画像化した。全赤色/緑色オーバーラップオブジェクト面積を測定することによって標的細胞死を決定した。

【0480】

図25Aに示されるように、48時間後、41BBに結合する共刺激受容体結合領域を欠く同一の構築物cx5951と比較された、41BBに結合する共刺激受容体結合領域を含む5T4標的型制約CD3係合構築物cx5185によって、5T4発現標的細胞に対するT細胞媒介標的細胞細胞傷害の効力の著しい差が観察された。非標的細胞に対する細胞傷害活性は観察されなかった (図25B)。

【0481】

これらの観察は、本明細書中に提供された付加的な共刺激能力を有する抗原依存的な制約CD3フォーマットが、他のCD3係合フォーマットと比較して、媒介される細胞傷害の増強された効力を示すことを支持している。

【0482】

2. T細胞活性化

例示的な5T4標的型制約CD3係合構築物によって媒介されるT細胞活性化を評価するため、T細胞と、5T4発現標的細胞、A375細胞、Ovcar-5細胞、またはSHP-77細胞のいずれかとの共培養物においてcx5185およびcx5951をインキュベートした。T細胞活性化を評価するため、細胞を収集し、生死判定染料、ならびにフルオロフォアがコンジュゲートされた抗CD4抗体、抗CD8抗体、および/または抗CD25抗体によって染色した。細胞を、SONY SA3800スペクトル型アナライザーを使用して分析し、CD4+T細胞またはCD8+T

細胞の活性化を、CD25の発現レベルを測定することによって決定した。T細胞活性化は、CD4集団およびCD8集団におけるCD25発現によって評価された。CD25の発現によって測定されるT細胞活性化は、例示的な構築物の存在下で5T4発現標的細胞と共にインキュベートされたCD4 T細胞（図26AC）およびCD8 T細胞（図26DF）において明らかであった。図26A～Fに示されるように、41BB結合ドメインが組み入れられた5T4標的型制約CD3係合構築物（cx5185）は、41BB結合ドメインを欠く類似した構築物cx5951と比較して、増強された活性化能力をCD4 T細胞およびCD8 T細胞の両方に対して示した。

【0483】

3. T細胞サイトカイン産生

例示的な5T4標的型制約CD3係合構築物への41BB結合ドメインの組み入れの、T細胞媒介IFN γ 産生に対する影響を、様々な5T4発現細胞株、A375（図27A）、SHP-77（図27B）、またはOvcar5（図27C）を使用して評価した。T細胞と5T4発現標的細胞との共培養の後、上清をサンドイッチELISA（BioLegend、USA）によってIFN γ 含量について分析した。製造業者の説明書に従って、標準曲線を生成し、そこから、上清試料のサイトカイン濃度値を内挿した。検出下限未満の吸光度値を有する試料には、最低標準濃度のものの半分に等しいサイトカイン濃度を割り当てた。図27A～27Cに示されるように、41BB結合ドメインが組み入れられた5T4標的型制約CD3係合構築物cx5185は、41BB結合ドメインを欠く類似した構築物cx5951と比較して増強されたIFN γ 産生を示した。

【0484】

4. T細胞増殖

フローサイトメトリーによって、標識されたCD4+T細胞またはCD8+T細胞におけるCellTrace（商標）Violet色素（Thermo Fisher Scientific）の希釈を測定することによって、T細胞増殖を評価した。T細胞を、PBMCからネガティブ濃縮し、製造業者のプロトコルに従ってCellTrace（商標）Violetによって標識した。5T4標的型制約CD3係合構築物を、標識されたT細胞と5T4発現細胞、A375（図28Aおよび28D）、Ovcar-5（図28Bおよび28D）、またはSHP-77（図28Cおよび28F）との共培養物において滴定し、アッセイプレートで37℃で5日間インキュベートした。細胞を、生存度色素ヨウ化プロピジウム、ならびにフルオロフォアがコンジュゲートされた抗CD4抗体および抗CD8抗体によって染色し、SONY SA3800スペクトル型アナライザーを使用して分析した。適切な生存T細胞亜集団に対するゲーティング、および未処理の共培養物に由来するT細胞のものより低いCellTrace（商標）Violet強度を有する細胞の割合の測定によって、増殖したCD4+T細胞またはCD8+T細胞の割合を決定した。

【0485】

41BB結合ドメインが組み入れられた5T4標的型制約CD3係合構築物cx5185は、41BB結合ドメインを欠く類似した構築物cx5951と比較して、CD4 T細胞（図28A～C）およびCD8 T細胞（図28D～F）の両方の増殖を増強した。

【0486】

5. T細胞ミトコンドリアの評価

41BBシグナリングは、ミトコンドリア機能を増強することが示唆されている。ミトコンドリア機能は、活性ミトコンドリアに蓄積するミトコンドリア選択的な蛍光プローブMitoTracker Green（Thermo Fisher Scientific）を使用してモニタリングされ得る。T細胞のミトコンドリア機能を評価するため、T細胞を、例示的な5T4標的型制約CD3係合構築物の存在下で、5T4を発現する細胞株、A375（図29Aおよび29D）、Ovcar-5（図29Bおよび29E）、またはSHP-77（図29Cおよび29F）と5日間共培養した。MitoTracker Greenを100nMの最終細胞染色濃度で添加し、生存度色素ヨウ化プロピジウム、ならびにフルオロフォアがコンジュゲートされた抗CD4抗体および抗CD8抗体も添加し、細胞をSONY SA3800スペクトル型アナライザーを使用して分析した。CD4+T細胞またはCD8+T細胞のMitoTracker Green蛍光強度の中央値を、適切な生存T細胞亜集団に対するゲーティングによって決定した。41BB結合ドメインが組み入れられた5T4標的型制約CD3係合構築物cx5185は、41BB結合ドメインを欠く類似した構築物cx5951と比較して、CD4

10

20

30

40

50

T細胞（図29A～C）およびCD8 T細胞（図29D～F）の両方のミトコンドリア機能を増強した。

【0487】

6. T細胞レポーターアッセイ

5T4標的型sdAbを含有している制約CD3係合構築物の、41BB共刺激シグナリング経路の特異的な作動を媒介する能力も評価した。Jurkat 41BB NFκBルシフェラーゼレポーター細胞（例えば、実施例3を参照すること）を、共刺激受容体結合ドメインを含まないか（cx5951）または41BB結合ドメインを含む（cx5185）5T4を標的とする例示的な制約CD3係合構築物を試験するために使用した。プレートに結合した組換え5T4を、抗原の起源として使用した。図30に示されるように、41BB結合ドメインが組み入れられたcx5185は、標的とされた共刺激受容体の特異的な作動を誘導することが見出された。

10

【0488】

C. 概要

総合すると、これらの結果は、5T4ターゲティングsdAbドメインを含有しているCD3係合構築物、CRBRを含むもの、および含まないものが、T細胞を抗原依存的に活性化することができることを証明している。注目すべきことに、41BB結合ドメインが組み入れられた5T4標的型制約CD3係合構築物は、41BB結合ドメインを含まない5T4標的型制約CD3係合構築物より優れた抗原依存的な活性を示した。

【0489】

実施例16：B7H3ターゲティングドメインを含有しているCD3制約多重特異性構築物におけるCD3結合領域の方向の比較

20

構築物における抗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ホールのいずれかに対してC末端側に位置付けられた、CD3結合領域としてのFvを含有している、B7H3を標的とする付加的な多重特異性ポリペプチド構築物を生成した。生成されたCD3制約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係合を介してT細胞を活性化する能力について評価した。

【0490】

A. 構築物の設計および生成

図31Aに示されるように、CD3結合領域にリンカー（例えば、非切断可能リンカー）によってカップリングされた免疫グロブリンのヘテロ二量体Fc領域、CD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられたCRBRとしての4-1BB抗原結合ドメイン（例えば、sdAb）、ならびに多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端側およびCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられた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している多重特異性構築物を生成した。

30

【0491】

ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を少なくともコードするポリヌクレオチドを生成し、発現のためのプラスミドにクローニングした。第1のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端へ順に、第1のFcポリペプチド（例えば、Fcホールポリペプチド）；非切断可能リンカー；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、それぞれ、SEQ ID No:308、309、および310に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有しており；例えば、SEQ ID NO:215に示されるsdAb）を含んでいた。第2のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端へ順に、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一のリンカー；抗CD3抗体の可変重鎖（VH）ドメインまたは可変軽鎖（VL）ドメインのうちの他方；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（抗CD3の変異G44Cを含むVHおよび変異G100Cを含むVL）を含んでいた。

40

【0492】

50

注目すべきことに、図31Aに示されるように、ヘテロ二量体Fc領域のFcノブまたはFcホールに対するCD3 Fvの抗CD3 VHおよび抗CD3 VLの方向を異なって位置付けた。図31Aの上に示されるように、ヘテロ二量体構築物の第1のポリペプチドが、Fcノブに対してC末端側に位置付けられたCD3 FvのVL、ならびにN末端およびC末端のB7H3結合ドメインを有し、ヘテロ二量体構築物の第2のポリペプチドが、Fcホールに対してC末端側に位置付けられたCD3 FvのVHおよびC末端の41BBを有する、cx5841を生成した。対照的に、図31Aの下は、ヘテロ二量体構築物の第1のポリペプチドが、Fcノブに対してC末端側に位置付けられたCD3 FvのVH、ならびにN末端およびC末端のB7H3結合ドメインを有し、ヘテロ二量体構築物の第2のポリペプチドが、Fcホールに対してC末端側に位置付けられたCD3 FvのVLおよびC末端の41BB結合を有する、例示的な構築物cx5187を図示する。

10

【0493】

例示的な生成された制約CD3結合構築物の成分は、表E6に示される。構築物は、実質的に実施例12に記載されるように、発現させられ、精製された。

【0494】

(表E6) B7H3ターゲティングドメインを含有している例示的な制約CD3係合構築物

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 hz1A5v51 (SEQ ID NO:301)	xELL-ノブ (SEQ ID NO:84,88)	GGGGGSGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	B7H3 sdAb 3 hz58E05v48 (SEQ ID NO:304)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:91,93)	GGGGGSGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	41BB sdAb (例えば、SEQ ID NO: 215)	
cx5187	1	B7H3 sdAb 4 hz1A5v51 (SEQ ID NO:301)	xELL-ノブ (SEQ ID NO:84,88)	GGGGGSGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	B7H3 sdAb 3 hz58E05v48 (SEQ ID NO:304)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:91,93)	GGGGGSGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	41BB sdAb (SEQ ID NO: 例えば、215)	

20

【0495】

B. T細胞レポーター活性

CD3係合を比較するため、例示的な構築物を、抗原依存的CD3レポーターアッセイにおいて、標的抗原発現細胞と共培養されたCD3 NFATレポーターJurkat細胞株を活性化する能力を評価することによって試験した。Jurkatレポーター細胞における緑色蛍光シグナルまたはルシフェラーゼレポーターシグナルのいずれかをモニタリングすることによって、活性化を評価した。

30

【0496】

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によって駆動される緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する改変型Jurkat細胞との共培養物において、抗原を標的とする制約CD3係合構築物を滴定した。CD3の係合は、NFATシグナリングおよび緑色蛍光の生成をもたらす。接着性標的細胞を利用したレポーターアッセイのため、標的細胞を播種し、均一な分布のために室温で静置し、接着を可能にするために37°Cで数時間インキュベートした後、レポーター細胞および抗原を標的とする制約CD3係合構築物を添加した。アッセイプレートをIncuCyte ZOOM系を使用して連続的に画像化し、全緑色オブジェクト積分強度を測定することによってCD3レポーター細胞活性化を決定した。

40

【0497】

図31Bに示されるように、例示的なB7H3標的型制約CD3係合構築物は、B7H3を発現する標的細胞の存在下で、レポーターT細胞共培養物においてインキュベートされた時、標的抗原特異的なT細胞活性化を媒介する能力を示した。しかしながら、レポーター活性は

50

、B7H3を発現しない細胞との共培養物においては観察されなかった（図31C）。注目すべきことに、ノブVH；ホールVLフォーマットを有するcx5187は、ノブVL；ホールVHフォーマットを有するcx5841と比較して増強されたT細胞活性化を示した。

【0498】

類似したアッセイにおいて、同一の抗原を標的とする制約CD3係合構築物を、B7H3を発現するA375細胞またはB7H3を発現しない対照のCCRF-CEM細胞のいずれかと、NFATによって駆動されるルシフェラーゼを発現する改変型Jurkat細胞との共培養物において滴定した。図31Dに示されるように、例示的なB7H3標的型制約CD3係合構築物は、B7H3を発現する標的細胞の存在下で、レポーターT細胞共培養においてインキュベートされた時、標的抗原特異的なT細胞活性化を媒介する能力を示した。再び、B7H3を発現しない細胞との共培養物においてはレポーター活性が観察されなかった（図31E）。GFPレポーターアッセイと同様に、ノブVH；ホールVLフォーマットを有する構築物（cx5187）は、ノブVL；ホールVHフォーマットを有する構築物（cx5841）と比較して増強されたT細胞活性化を示した。

【0499】

これらの結果は、VHおよびVLが、それぞれ、Fcノブ領域およびFcホール領域に対してC末端側に位置付けられるよう、CD3 Fvの成分が方向付けられる時、増強されたCD3係合および活性が観察されるという観察と一致している。

【0500】

実施例17：DLL3ターゲティングドメインを含有しているCD3制約多重特異性構築物における共刺激受容体結合領域の効果

4-1BBを標的とする共刺激受容体結合領域を含むか、または含まない、DLL3を標的とする付加的な多重特異性ポリペプチド構築物を生成した。生成されたCD3制約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係合を介してT細胞を活性化する能力について評価した。

【0501】

A. 構築物の設計および生成

図32A～Bに示されるように、CD3結合領域にリンカー（例えば、非切断可能リンカー）によってカップリングされた免疫グロブリンのヘテロ二量体Fc領域、ならびに多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端側およびCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられた、DLL3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している多重特異性構築物を生成した。いくつかのケースにおいて、構築物は、CD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置付けられた、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:308、309、および310に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有しており；例えば、SEQ ID NO:215に示されるsdAb）も含有していた。

【0502】

ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を少なくともコードするポリヌクレオチドを生成し、発現のためのプラスミドにクローニングした。第1のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端へ順に、第1のFcポリペプチド（例えば、Fcホールポリペプチド）；非切断可能リンカー；および抗CD3抗体の可変軽鎖（VL）ドメインを含んでいた。1つの構築物において、第1のポリペプチドは、CD3 FvのVLドメインに対してカルボキシ末端側に、CRBRとしての4-1BB結合ドメイン（例えば、sdAb）をさらに含む。第2のポリペプチド鎖は、一般に、N末端からC末端へ順に、第2のFcポリペプチド（例えば、Fcノブポリペプチド）；第1のポリペプチド鎖と同一のリンカー；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、ジスルフィド安定化（dsFv）抗体（抗CD3の変異G44Cを含むVHおよび変異G100Cを含むVL）を含んでいた。第2のポリペプチド鎖は、2つのDLL3抗原結合ドメイン（Fcドメインに対してアミノ末端側に1つ、CD3結合領域に対してカルボキシ末端側に1つ）をさらにコードした。注目すべきことに、生成された例示的な構築物のうちの一つは、4-

1BB共刺激受容体ターゲティングsdAbをさらに含有していた（例えば、cx5352）。

【0503】

DLL3ターゲティングsdAbドメインを有する例示的な制約CD3結合構築物は、以下の表E7に与えられる。構築物は、実質的に実施例12に記載されるように、発現させられ、精製された。

【0504】

（表E7）B7H3ターゲティングドメインを含有している例示的な制約CD3係合構築物

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
cx5499	1	DLL3 sdAb 1 (SEQ ID NO:306)	xELL-ノブ (SEQ ID NO:84, 88または293)	GGGGGSGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	DLL3 sdAb2 (SEQ ID NO:307)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:91, 93 または 296)	GGGGGSGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	なし	
cx5352	1	DLL3 sdAb 1 (SEQ ID NO:306)	xELL-ノブ (SEQ ID NO:84, 88または293)	GGGGGSGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VH13 (SEQ ID NO: 44)	DLL3 sdAb2 (SEQ ID NO:307)	あり
	2	なし	xELL-ホール (SEQ ID NO:91, 93 または 296)	GGGGGSGGGGSG GGGGS (SEQ ID NO:119)	VL10 (SEQ ID NO: 72)	共刺激受容体sdAb (例えば、SEQ ID NO:215)	

【0505】

B. T細胞活性

CD3結合ドメインに対してC末端側に位置付けられたCRBRを含有しているDLL3標的型構築物の活性を、CRBRを含有していない構築物と比較するため、例示的な構築物を、T細胞活性に対する効果を評価するための様々なアッセイにおいて試験した。

【0506】

1. T細胞レポーターアッセイ

共刺激受容体結合ドメインを含有している制約CD3係合構築物の、共刺激シグナリング経路の特異的な作動を媒介する能力を評価した。共刺激受容体結合ドメインを含まないか（cx5499）または41BB結合ドメインを含む（cx5352）DLL3を標的とする例示的な制約CD3係合構築物を試験するため、Jurkat 41BB NFκBルシフェラーゼレポーター細胞を使用した。レポーター細胞を、DLL3陰性細胞株HEK-293、またはDLL3の短縮バージョン（例えば、SEQ ID NO:324の276-618）を一過性発現するようトランスフェクトされたHEK-293細胞のいずれかと共培養した。図33に示されるように、cx5352は、頑強なルシフェラーゼ活性がDLL3発現細胞の存在下でのみ観察される、DLL3依存的な41BB作動を示した。低レベルのDLL3依存的なNFκB活性化がcx5499によって観察され、このアッセイにおけるCD3シグナリングが、ある程度のNFκB活性化をもたらし得ることが示された。

【0507】

2. 細胞傷害活性

初代ヒトT細胞を、3人の異なる健常ヒトドナーのleukopaksから単離されたPBMCからネガティブ濃縮し、10:1~40:1のT細胞-標的細胞比で添加した。ここでは、標的細胞をCytolDレッドによって赤色に標識し、アポトーシスを緑色蛍光カスパーゼ3/7基質によってモニタリングしたため、アポトーシス標的細胞は、赤色および緑色に二重標識されたものである。アッセイプレートをIncucyte ZOOM系を使用して連続的に画像化した。（図34A~Bに示されるように）全赤色/緑色オーバーラップオブジェクト面積を測定することによって標的細胞死を決定した。

【0508】

例示的なアッセイにおいて、試験されたCD3係合構築物は、41BB結合CRBRと共にDLL

3標的型sdAbを含んでいた（cx5352）。標的細胞は、DLL3発現SHP-77細胞またはDLL3を発現しない293FS細胞であった。図34Aに示されるように、cx5352は、T細胞媒介抗原特異的細胞傷害を誘発することができた。DLL3陰性細胞を含有している共培養物において、赤色/緑色オーバーラップオブジェクト面積がなかったことから示されるように、抗原の非存在下では、細胞傷害が観察されなかった（図34B）。このデータは、41BB結合ドメインを含む例示的なDLL3標的型制約CD3係合構築物の、T細胞媒介抗原特異的細胞傷害を誘発する能力を証明している。

【0509】

類似したアッセイにおいて、健常ヒトドナーのleukopaksから単離された初代ヒトPBMCを、10:1、5:1、または1.25:1のエフェクター-標的（E:T）細胞比で添加した。PBMCを、DLL3を発現するSHP-77標的細胞と共培養し、DLL3標的型sdAbを含有している例示的な構築物、CRBRを含むもの（cx53532）およびCRBRを含まないもの（cx5499）の増加する濃度の存在下でインキュベートした。図35A～Cに示されるように、cx5352は、分析された三つのE:T比の全てにおいて、標的細胞に対する増強された細胞傷害を示した。

【0510】

3.T細胞サイトカイン発現

SHP-77細胞を標的細胞として、実質的に前記のように実施されたT細胞媒介細胞傷害アッセイからの上清を、サンドイッチELISA（BioLegend、USA）によって、IFN γ 含量について分析した。製造業者の説明書に従い、標準曲線を生成し、そこから、上清試料のサイトカイン濃度値を内挿した。検出下限未満の吸光度値を有する試料には、最低標準濃度のものの半分に等しいサイトカイン濃度を割り当てた。

【0511】

図36に示されるように、41BB結合ドメインが組み入れられたDLL3標的型制約CD3係合構築物cx5352は、41BB結合ドメインを欠く類似した構築物cx5499と比較して増強されたT細胞によるIFN γ 産生をもたらした。

【0512】

他の態様

本発明を詳細な説明と共に記載したが、上記の説明は、本開示を例示するためのものであって、その範囲を限定するためのものではなく、本開示の範囲は、添付の特許請求の範囲の範囲によって定義される。他の局面、利点、および修飾は、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

【0513】

配列の表

10

20

30

40

50

SEQ ID NO	配列	説明
1	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	IgG1 Fc
2	PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKT KPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL HNHYTQKSL SLSGK	xELL Fc
3	PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKT PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKT KGQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS SLSLSPGK	IgG2 Fc
4	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVVS LTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRTQK SLSLSPGK	IgG3 Fc
5	PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	IgG4 Fc
6	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	IgG4 Fc
7	EPKSSDKTHTCPPC	ヒンジ
8	DKTHTCPPC	ヒンジ
9	ESKYGPPCPPC	ヒンジ
10	GGSGGS	(GGG)2
11	GGSGGSGGS	(GGG)3
12	GGSGGSGGSGGS	(GGG)4
13	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGG)5
14	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFTNYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSA	抗 CD3 Hv
15	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	抗 CD3 Lv
16	TYAMN	抗 CD3 VH CDR1
17	RIRSKYNNYATYYADSVKD	抗 CD3 VH CDR2
18	HGNFGNSYVSWFAY	抗 CD3 VH CDR3
19	RSSTGAVTTSNYAN	抗 CD3 VL CDR1

10

20

30

40

50

20	GTNKRAP	抗 CD3 VL CDR2
21	ALWYSNLWV	抗 CD3 VL CDR3
22	LEAD	グランザイム B基質
23	RQAR	グランザイム B基質
24	PAGL	MMP 基質
25	TGLEADGSPAGLGRQARVG	リンカー
26	TGLEADGSRQARVGPAGLG	リンカー
27	TGSPAGLEADGSRQARVGS	リンカー
28	TGPAGLGLEADGSRQARVG	リンカー
29	TGRQARVGLEADGSPAGLG	リンカー
30	TGSRQARVGPAGLEADGS	リンカー
31	TGPAGLGSRQARVGLEADGS	リンカー
32	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGR IRSKYNNAATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	抗 CD3 VH1
33	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNAATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	抗 CD3 VH2
34	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNAATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	抗 CD3 VH3
35	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNAATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	抗 CD3 VH4
36	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNAATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	抗 CD3 VH5
37	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRI RSKYNNAATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	抗 CD3 VH6
38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVGR IRSKYNNAATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRH GNFGDSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	抗 CD3 VH7
39	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNAATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTVS	抗 CD3 VH8
40	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNAATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	抗 CD3 VH9
41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNAATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSYFAYWGQGTLLTVSS	抗 CD3 VH10
42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNAATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSS	抗 CD3 VH11
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNAATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVKP	抗 CD3 VH12
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVAR IRSKYNNAATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVKP	抗 CD3 VH13

10

20

30

40

50

45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTKP	抗 CD3 VH14
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH15
47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVSR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH16
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVSR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH17
49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH18
50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVSR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH19
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVSRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH20
52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH21
53	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH22
54	EVKLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH23
55	EVKLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH24
56	EVKLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH25
57	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVSRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH26
58	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMSWVRQAPGKCLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRH GNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH27
59	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKCLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVS	抗 CD3 VH28
60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSS	抗 CD3 VH29
61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVAR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSYFAYWGQGTTVTVSS	抗 CD3 VH30
62	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKCLEWVA RIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVR HGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH31
63	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	抗 CD3 VL1

10

20

30

40

50

64	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNLWVFG CGTKLEIK	抗 CD3 VL2
65	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIG GTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVL	抗 CD3 VL3
66	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	抗 CD3 VL4
67	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	抗 CD3 VL5
68	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVL	抗 CD3 VL6
69	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVL	抗 CD3 VL7
70	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG GGTKLTVL	抗 CD3 VL8
71	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNLWVFG GGTKLEIK	抗 CD3 VL9
72	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNLWVFG CGTKLEIK	抗 CD3 VL10
73	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGQCFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNLWVFG EGTKLEIK	抗 CD3 VL11
74	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGC GTKLTVL	抗 CD3 VL12
75	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGKSPRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNLWVFG GGTKLEIK	抗 CD3 VL13
76	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIG GTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFG CGTKLTVL	抗 CD3 VL14
77	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGG GTKLTVL	抗 CD3 VL15
78	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGC GTKLTVL	抗 CD3 VL16
79	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTTPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWVFG CGTKLTVL	抗 CD3 VL17
80	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIG GTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFG CGTKLTVL	抗 CD3 VL18
81	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFG CGTKLTVL	抗 CD3 VL19
82	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc

10

20

30

40

50

83	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ホール Fc
84	DKTHTCPPCPAPGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc
85	DKTHTCPPCPAPGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ホール Fc
86	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc
87	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ホール Fc
88	DKTHTCPPCPAPGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc
89	DKTHTCPPCPAPGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ホール Fc
90	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
91	DKTHTCPPCPAPGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
92	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
93	DKTHTCPPCPAPGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
94	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc

10

20

30

40

50

95	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV HEALHNHYTQKSLSLSPG	ノブFc
96	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSC SVVHEALHNHYTQKSLSLSPG	ノブFc
97	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV HEALHNHYTQKSLSLSPG	ノブFc
98	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VVHEALHNRYTQKSLSLSPG	ホールFc
99	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVH EALHNRYTQKSLSLSPG	ホールFc
100	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSC VVHEALHNRYTQKSLSLSPG	ホールFc
101	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVH EALHNRYTQKSLSLSPG	ホールFc
102	PGGGG	ペプチド リンカー
103	GGGG	ペプチド リンカー
104	GPAGLGLEPDGSRQARVG	リンカー
105	GGSGGGGIEPDIGSGGS	リンカー
106	GGSGGGGLEADTGGSGGS	リンカー
107	GSIEPDIGS	リンカー
108	GSLEADTGS	リンカー
109	GGSGGGGIEPDGGSGGS	リンカー
110	GGSGGGGIEPDVGGSGGS	リンカー
111	GGSGGGGIEPDSGSGGS	リンカー
112	GGSGGGGIEPDTGGSGGS	リンカー
113	GGGSLEPDGSGS	リンカー
114	GPAGLGLEADGSRQARVG	リンカー
115	GGEGGGSGSGSGGS	リンカー
116	GSSAGSEAGSGQAGVGS	リンカー

10

20

30

40

50

117	GGSGGGGLEAEGSGGGGS	リンカー
118	GGSGGGGIEPDPGSGGS	リンカー
119	GGGGSGGGGSGGGGS	リンカー
120	QLQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDNYAIGWFRQAPGKEREGVSCIS SSDGSTYYADSVKGRFTISRNNAKGTVYLLMNSLKPEDTAVYYCATELVPA CTYSNGRGLDGM DYWGKGTQVTVKP	FR α sdAb
121	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSIDATAWYRQAPGKQRELVAIITS SGSTNYPE SVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCNAITRYGGS TYDFWGQGT LVT VKP	FR α sdAb
122	EVQPGGSLRLSCAASETFGVVFTLGWYRQAPGKGREFVARVTGTDTVDYA ESVKGRFTISSDFARNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNTGAYWGQGT LVT VK P	FR α sdAb
123	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFILDY AIGWFRQAPGKEREGVLCID ASDDITYYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTG VYYCATPIGLSS SCLEEDYDYWGQGT LVT VKP	cMET sdAb
124	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHVVRQAPGKGLEWVAY ISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGREN IYYGSR LDYWGQGT TTVTVSSSGGGSGGGSGGGSDIQLTQSPSFLSASVG DRVTTTCKASQNVDTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGQGTKLEIK	B7H3 scFv
125	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMG RIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNV FDGYWL VYWGQGT LVT VSGSGGGSGGGGTGGGSDIVMTQTPLSLPVT GEPASISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNL ELPYTFGGG TKVEIK	CD20 scFv
126	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYVY YSGTTNYPNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASIATGIFY FDYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERVTLSC RASQRVNNNYLAWYQQRPQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLT ISRLEPEDFAVYYCQQYDRSPLTFGGG TKLEIK	DLL3 scFv
127	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHVVRQAPGKGLEWVAY ISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGREN IYYGSR LDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHPKSN TKVDKKVEPKSC	B7H3 Fd
128	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGKAPKALIYSAS YRYSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGQGTKLE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDS TYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	B7H3 LC
129	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVA RIRSKSN NYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMY LQMN NLKTEDTAMYYCV RQWDYDVRAMNYWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHPKSN TKVDKKVEPKSC	5T4 Fd
130	DIVMTQSHIFMSTSVGDRV SITCKASQD VDTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRLTGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGG TK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDS TYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	5T4 LC
131	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSFYWSWIRHHPGKGLEWIGY IYYSGSTYSPNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLTSSVTAADTAVYYCARGYNWN YFDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHP SNTKVDKKVEPKSC	gpNMB Fd
132	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV DNNLVWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPPWTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ	gpNMB LC

10

20

30

40

50

	SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	
133	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFITNYGMNVVKQAPGKGLKWMA WINTYTGPTYADDFKGRFAFSLETSASTASLQIINLKNEATATYFCARIGDS SPSDYWGQGTTLTVSSSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	DLL3 Fd
134	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVVWYQQKPGQSPKLLIYYAS NRYTGVPDFRAGSGYGTDFSTISTVQAEDLAVYFCQQDYTSPWTFGGGKTK LEIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	DLL3 LC
135	GGGGGS	ペプチド リンカー
136	IEPDI	リンカー
137	LEADT	リンカー
138	IEPDG	リンカー
139	IEPDV	リンカー
140	IEPDS	リンカー
141	IEPDT	リンカー
142	LEPD	リンカー
143	LEAE	リンカー
144	IEPDP	リンカー
145	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIG GTNKRAPWTPARFSGSLGGAALTTGAQAEDADYICALWYSLWVFG GGTKLTVLGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFGM HWVRQAPGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRDEDVAVYYCGRGRENYYGSRLDYWGQGTITVTVSSGGCGGGKVAALKE KVAALKEKVAALKEKVAALKE	B7-H3×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
146	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNRVTQKSLSLSPGK	B7-H3×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
147	GGSGGGSGGGSGGGGS	リンカー
148	TGGSGGGGIEPDIGSGGS	リンカー
149	GGGGS	リンカー
150	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ (P ₄ P ₃ P ₂ P ₁ ↓ P ₁ ') X ₁ = I, L, Y, M, F, V, または A; (P ₄ = I, L, Y, M, F, V, または A) X ₂ = A, G, S, V, E, D, Q, N, または Y; (P ₃ = A, G, S, V, E, D, Q, N, または Y) X ₃ = H, P, A, V, G, S, または T; (P ₂ = H, P, A, V, G, S, または T) X ₄ = D または E; (P ₁ = D または E) X ₅ = I, L, Y, M, F, V, T, S, G または A (P ₁ ' = I, L, Y, M, F, V, T, S, G または A)	リンカー コンセンサス
151	X ₁ E X ₃ D X ₅ (P ₄ P ₃ P ₂ P ₁ ↓ P ₁ ') X ₁ = I または L; (P ₄ = I または L) (P ₃ = E) X ₃ = P または A; (P ₂ = P または A) X ₅ = I, V, T, S, または G (P ₁ ' = I, V, T, S, または G)	リンカー コンセンサス

10

20

30

40

50

152	LEPDG	リンカー
153	LEADG	リンカー
154	X ₁ QARX ₅ (P1QAR↓(A/V)) X ₁ = 任意のアミノ酸; (P1は任意のアミノ酸である) X ₅ = A または V	リンカー コンセンサス
155	RQARX ₅ (RQAR(A/V)) X ₅ = A または V	リンカー コンセンサス
156	RQARV	リンカー
157	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ (P ₃ P ₂ P ₁ ↓ P ₁ ') X ₁ = P, V または A; (P ₃ = P, V または A) X ₂ = Q または D; (P ₂ = Q または D) X ₃ = A または N; (P ₁ = A または N) X ₄ = L, I または M (P ₁ ' = L, I または M)	リンカー コンセンサス
158	PX ₂ X ₃ X ₄ (P ₃ P ₂ P ₁ ↓ P ₁ ') (P ₃ = P) X ₂ = Q または D; (P ₂ = Q または D) X ₃ = A または N; (P ₁ = A または N) X ₄ = L または I (P ₁ ' = L または I)	リンカー コンセンサス
159	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
160	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
161	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
162	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
163	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
164	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
165	GGATCTGGAGCAACAACTTCTCACTACTCAAACAAGCAGGTGACGTGG AGGAGAATCCCGGACCC	P2A DNA
166	GSPAGLEADGSRQARVGS	リンカー
167	EVQLVESGGGL VQPKGSLKLS CAASGFTFNT YAMNWVRQAP YKGLVWVARI RSKSNYYATY YADSVKDRFT ISRDDSQSM YLQMNNLKTE DTAMYXCVRQ WDYDVRAMNY WGQGTSTVTS S	抗 5T4 VH
168	DIVMTQSHIF MSTSVGDRVS ITCKASQDVD TAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRLTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLADYFCQQ YSSYPYTFGG GTKLEIK	抗 5T4 VL
169	DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVN TNVAWYQQKP GKAPKALIYS ASYRYSQVPS RFGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQ YNNYPFTFGQ GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTILVTVSS GCGGGGEVAA LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSLKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK	B7-H3×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
170	GGGGSGGGSGGGGS	リンカー
171	GGG(GGS) _n nは0〜10である	リンカー
172	(GGGGGS) _n nは1〜4である	リンカー
173	(GGGGGS) _n nは1〜5である	リンカー

10

20

30

40

50

174	Gly _x Xaa-Gly _y -Xaa-Gly _z XaaはA、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D、またはEより独立に 選択される。 x、y、およびzは各々1～5の範囲の整数である。	リンカー
175	Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly XaaはA、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D、またはEより独立に 選択される。	リンカー
176	ATTTGSSPGPT	リンカー
177	GGGGG-C-GGGGG	リンカー
178	(EAAAK) _n n=2-20	リンカー
179	AS-(AP) _n -GT n=2-20	リンカー
180	AS-(EAAAK) _n -GT n=2-20	リンカー
181	(GGGGA) _n n=2-20	リンカー
182	(PGGGS) _n n=2-20	リンカー
183	(AGGGS) _n n=2-20	リンカー
184	GGs-(EGKSSGSGSESKST) _n -GGs n=2-20	リンカー
185	(SSSSG) _n n=1-9	リンカー
186	SSSASASSA	リンカー
187	GSPGSPG	リンカー
188	QVQLQESGPG LVKPSETLSL TCTVSGGSIS SYWWSWIRQP PGKGGLEWIGY VYYSGTTNYN PSLKSRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCASIAV TGFYFDYWQG GTLVTVSSGG GSGGGGSGSG GGSEIVLTQS PGTLSPGPE RVTLSCRASQ RVNNNYLAWY QQRPGQAPRL LIYGASSRAT GIPDRFSGSG SGTDFTLTIS RLEPEDFAVY YCQQYDRSPL TFGGGTKLEI K	DLL3 scFv
189	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR IFPGDGDYDY NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV FDGYWLVYWG QGTLVTVSS	CD20 VH
190	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSL HSNGITLYLW YLQKPGQSPQ LLIYQMSNLV SGVPDFRSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDGVG YYCAQNLELP YTFGGGTKVE IKRTV	CD20 VL
191	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQLPLRSAAGAAALATVDLPPASSEANSAGFGQGR LLHLSAQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	41BBL
192	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKI YPGDSYTNYSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIF DYWGQGTILVTVSS	41BB VH
193	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKN RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGGTK LTVL	41BB VL
194	QVQLQQWAGALLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGGLEWIGEI NHGGYVTYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGP NYDWYFDLWGRGTLVTVSS	41BB VH
195	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKV EIK	41BB VL
196	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFSGYYMHVVRQAPGQGLEWM GWVNPMSGGTNYAQKFQGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR EGMAMRLELDKWGQGTILVTVSS	41BB VH

10

20

30

40

50

197	SYELTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLYYYDS RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSVVFGGGTQLT VL	41BB VL
198	QDSTSDLIPAPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIKLREDKDPNK MMATIIYELKEDKSYDVTGVTFFDDKKCTYAISTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPG HTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELKELTSELKENFIR FSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリン
199	QDSTSDLIPAPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIRLREDKDPIKM MATIYELKEDKSYDVTMVKFDDKKCMYDIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPG HTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELKELTSELKENFIR FSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリン
200	QDSTSDLIPAPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIRLREDKDPNKM MATIYELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGH TSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELKELTSELKENFIRFS KSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリン
201	QDSTSDLIPAPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIKLREDKDPNK MMATIIYELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSF GHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELKELTSELKENFI RFSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリン
202	QDSTSDLIPA PPLSKVPLQQ NFQDNQFHGK WYVVGQAGNI KLREDSKMMMA TIYELKEDKS YDVTGVSFDD KKCTYAIMTF VPGSQPGEFT LGKIKSFPGH TSSLVRVST NYNQHAMVFF KFVFQNRREEF YITLYGRTE LTSELKENFI RFSKSLGLPE NHIVFPVPID QCIDG	41BB アンチカリン
203	QDSTSDLIPA PPLSKVPLQQ NFQDNQFHGK WYVVGQAGNI KLREDKDPVK MMATIIYELKE DKSVDVTGVT FDDKKCRYDI STFVPGSQPG EFTFGKIKSF PGHTSSLRV VSTNYNQHAM VFFKFVFQNR EEFYITLYGR TKELTSELKE NFIRFSKSLG LPENHIVFPV PIDQCIDG	41BB アンチカリン
204	QDSTSDLIPAPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIRLREDKDPHKM MATIYELKEDKSYDVTGVTFFDDKKCTYAISTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGH TSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELKELTSELKENFIRFS KSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリン
205	QDSTSDLIPAPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIKLREDKDPNK MMATIIYELKEDKSYDVTGVTFFDDKKCTYAISTLVPGSQPGEFTFGKIKSFPG HTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELKELTSELKENFIR FSKSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリン
206	QDSTSDLIPAPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWYVVGQAGNIRLREDKDPSKM MATIYELKEDKSYDVTAVTFDDKKCNYAISTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGH TSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVFQNRREEFYITLYGRTELKELTSELKENFIRFS KSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリン
207	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRS AAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 71～254
208	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 85～254
209	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDT KELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 80～254
210	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVV AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 52～254
211	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRS AAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 71～248

10

20

30

40

212	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 85~248
213	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDT KELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 80~248
214	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVV AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 52~248
215	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMGWYRQAPGKRREFVAAI ESGRNTVYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCGLLKGN RVVSPSVAYWGQGLVTVKP	41BB sdAb
216	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFLITSQKEDEIMKVQNNSVIINCDFYLI LKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVT DNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
217	QVSHRYPRFQSIKVQFTEYKKEKGFLITSQKEDEIMKVQNNSVIINCDF YLIQSLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKV YLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
218	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFLITSQKEDEIMKVQNNSVIINCDFYLI LKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVT DNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
219	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFLITSQKEDEIMKVQNNSVIINCDF YLIQSLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKV YLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
220	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFLITSQKEDEIMKVQNNSVIINCDFYLI LKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVT DNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
221	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDSYMSWVRQAPGQGLEWIGD MYPDNGDSSYNQKFRERVITRTDTSTAYLELSSLRSEDVAVYYCVLAPR WYFSVWGQGLVTVSS	OX40 VH
222	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYS RLRSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQGHTLPPTFGQGTKVE IKRT	OX40 VL
223	EVQLVESGGGLVQPGLSLKLSAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVGR IRSKANSYATAYAAVSKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGI YDSSGYDYWGQGLVTVSS	OX40 VH
224	DIVMTQSPSLPVPTEGEPASISCRSSQSLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQITLPTFG GGTKVEIK	OX40 VL
225	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAFMYWVRQAPGKGLEWVSSI SNRGLKTAAYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCSRVDVG DFRGQGLVTVKP	OX40 sdAb
226	QLETAKPCMAKFGPLPSKWMASEPPECVNKVSVDWKLEILQNGLYLIYQG VAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTITNKSQIQNVGGTYELHVGDTIDLI FNSEHQVLKNNTYWGILLANPQFIS	GITR リガンド
227	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVAS ISSGGTTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCARVGGY YDSMDYWGQGLVTVSS	GITR VH
228	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASEVDNYGVSMNWYQQKPGQAPRLLI YAASNQGSIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFVAVYYCQQTKEVTWTFGQ GTKVEIK	GITR VL
229	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQPPGKALEWLAH IWWDDDKYYQPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARTRR YFPFAYWGQGLVTVSS	GITR VH

10

20

30

40

50

230	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVGTNAVWYQQKPGQAPRLLIYSA SYRYSIGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNTDPLTFGGGTKV EIK	GITR VL
231	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSGGYFWSWIRQPPGKGLEWIGYI YYSGTYYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDLFYYD TSGPRGFDPPWQGTLTVSS	GITR VH
232	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVSSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYSS TRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYDSSPWTFGQGTKVE IK	GITR VL
233	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYPGSNKYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GELGRYYYYGMDVWVGQTTVTSS	GITR VH
234	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNNYPWTFGQGTKV DIK	GITR VL
235	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKQRELVAVL SGISSAKY AASAPGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYADVSTG WGRDAHGYWQGTLTV	GITR sdAb
236	<u>MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQAQQQLPLES</u> <u>LGWDVVAELQLNHTGPOODPRLYWOGGPALGRSFLHGPEDKGQLRIHRDG</u> <u>IYMHVHQVTLAICSSTTASRHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQR</u> <u>LTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP</u>	UniProt No. P32970, CD70-ECD 残基 39-193 (下線)
237	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG SGNWGFFDYWGQGTLLTVSS	CD70 VH
238	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTTCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAA SLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGTKVE IK	CD70 VL
239	QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINGMGWYRQAPGKERELVAGL TSGGSVTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCRAEIFT RTGENYYGMDYWGKGQTQVTVKP	ICOS sdAb
240	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRMFSNYAMGWFRQAPGKEREFVAA INYYRDAADYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCGFTY AGWASSRRDDYNYWGQGTLLTVTKP	CD28 sdAb
241	QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFRGLIG GTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWVFG CGTKLTVL	抗 CD3 VL (CON)
242	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEGDNA TFTCSFSNTSEFVLNWMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFVTLQPN GRDFHMSVVRARRNDSGTLYLCAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPT AHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARR TGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSG MGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL	PD-1
243	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGSMTGANTMGWYRQAPGKQRDLVA LIGNYHYADSVKGRFTISRDNKNTVILQMNSLNPEDTAVYYCYLYTDNLG TSWGQGTLLTVKPGG	18H10
244	GGSGGS	(GGG)2 リンカー
245	GGSGGS	(GGG)2 リンカー
246	GGSGSGGS	(GGG)3 リンカー
247	GGSGSGSGGS	(GGG)4 リンカー
248	GGSGSGSGSGSGGS	(GGG)5 リンカー

10

20

30

40

50

249	GGGG	グリシン リンカー
250	GGGGG	グリシン リンカー
251	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKGRDLVSL IGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v1
252	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKQRDVSL IGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v2
253	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKQRDVSL IGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v3
254	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKQRDVLA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v4
255	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKQRDVLA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v5
256	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDVLA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v6
257	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPGKQRDVLA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v7
258	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDVSL IGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v8
259	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDVSL IGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v9
260	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKQRDVSL IGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v1 0
261	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDVSL IGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v1 1
262	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDVLA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v1 2
263	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKQRELVA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDN LGTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v1 3
264	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDVLA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v1 4
265	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPGKQRDVLA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v1 5
266	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPGKQRDVLA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v1 6
267	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPGKQRDVLA LIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNL GTSWGQGTLVTVKPGG	hz18H10v1 7
268	GSMTGANTMG	CDR1
269	GGSGSGGS	(GGS)3 リンカー

10

20

30

40

50

270	GGSGGSGGSGGS	(GGs)4 リンカー
271	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGs)5 リンカー
272	GSVTGANTMG	CDR1
273	GSITGANTMG	CDR1
274	GGSGGS	(GGs)2 リンカー
275	GGSGGSGGS	(GGs)3 リンカー
276	GGSGGSGGSGGS	(GGs)4 リンカー
277	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGs)5 リンカー
278	LIGNYVTH	CDR2
279	GGSGGS	(GGs)2 リンカー
280	GGSGGSGGS	(GGs)3 リンカー
281	GGSGGSGGSGGS	(GGs)4 リンカー
282	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGs)5 リンカー
283	YTDNLGTS	CDR3
284	PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK	Fc xELL
285	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWEQGDVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc-Het-1
286	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVKHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Fc-Het-2
287	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYN NYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWF AYWGQGLTVTVSS	CD3-VH32
288	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTNKRA PGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWFVGGGTKLTVL	CD3-VL20
289	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTNKRA PGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYYCALWYSNHWFVGGGTKLTVL	CD3-VL21
290	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYN NYATYYADTVKGRFTISRDDAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSW FAYWGQGLTVTV	CD3-VH34
291	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc
292	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK KTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ホール Fc
293	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc

10

20

30

40

50

294	DKTHTCPPCAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ホール Fc
295	DKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
296	DKTHTCPPCAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
297	DKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc
298	DKTHTCPPCAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc
299	DKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
300	DKTHTCPPCAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
301	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSSNVMWVRQAPGKGLEWVST IYSSGTGTFYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRPEDTAVYYCATSGPV RGWGPRSQGTLVTVKP	B7H3 sdAb B7h3 hz1A5v51
302	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTSSYHMSWFRQAPGKQREPVATS HHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTLRAEDTAVYYCKADHG YQGRGYWGQGLVTVTKP	sdAb B7H3 hz58E05v2 7
303	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTSSYHMSWFRQAPGKQRELVATS HHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTLRAEDTAVYYCKADHG YQGRGYWGQGLVTVTKP	sdAb B7H3 hz58E05v5 5
304	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTSSYHMSWFRQAPGKQREPVATS HHGGTTNYAGSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNTLRAEDTAVYYCKADHG YQGRGYWGQGLVTVTKP	sdAb B7H3 hz58E05v4 8
305	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAPSERTFSTYTMGWFRQAPGKEREFAVAVV NWGGGSKYYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAGG AYSGPYDTRQYTYWGQGLVTVKPGG	sdAb B7H3 hz57B04v2 4
306	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAGF TGDNTIYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAADVQLF SRDYEFYWGQGLVTVTKP	sdAb DLL3 hz10D9v7
307	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCGPSEIITSDKSMGWVRQAPGKQRNLVAGIS NVGSTNYAQSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCYARDFEN EYWGQGLVTVTKP	sdAb DLL3 hz8E7v16
308	GFSFSINAMG	41BB CDR1
309	AIESGRNTV	41BB CDR2
310	LKGNRVVSPSVAY	41BB CDR3
311	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRH GNFGDSYVSWFAYWGQGLVTVSS	CD3-VH33
312	GFTFTNTYAMN	抗 CD3 VH CDR1

10

20

30

40

50

313	RIRSKYNNYATY	抗 CD3 VH CDR2
314	HGNFGDSYVSWFAY	CD3-VH7, VH33 CDR3
315	ALWYSNHWV	CD3-VL2, VL21 CDR3
316	VLWYSNRWV	CD3-VL8 CDR3
317	GFTFSTYAMN	CD3 VH33 CDR1
318	RIRSKYNNYATY	CD3 VH33 CDR1
319	GSSTGAVTTSNYAN	CD3 VL21 CDR1
320	GTNKRAP	CD3 VL21 CDR2
321	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMGWYRQAPGKRREFVAAI ESGRNTVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLMSSSLRAEDTAVYYCGLLKGN RVVSPSVAYWGQGTLVTVKP	sdAb 41BB
322	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSKTMWFRQAPGKEREFVAAV RWIGGATRYTESVKGRFTISRDNAKNTVYLMSSSLRAEDTAVYYCAAGQA WGTFKFTDYSWVGQGTLLVTVKP	sdAb 5T4 hz12E9v9
323	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSYAMGWFRQAPGKERETVAA VSRNAGSSYYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLMSSSLRAEDTAVYYCAARSA AYSRSSSETYTEKHDTYWGQGTLVTVKP	sdAb 5T4 hz16G10v1 1
324	MVSPRMSGLLSQTVILALIFLPQTRPAGVFELQIHSFGPGPGPGAPRSPCSARL PCRLFFRVCLKPGLSEEAESPALGAALSARGPVYTEQPGAPAPDLPLPDG LLQVPFRDAWPGTFSFIIETWREELGDQIGGPAWSLLARV AGRRRLAAGGPWARDIQRAGAWELRFSYRARCEPPAVGTACTRLCRPRSAP SRCGPGLRPCAPLEDECEAPLVCRAGCSPEHGFCEQPGECRCLEGWTGPLCT VPVSTSSCLSPRGPSATTGCLVPGPGPCDGNPCANGGS CSETPRSFECTCPRGFYGLRCEVSGVTCADGPCFNGGLCVGGADPDSAYICH CPPGFQGSNCEKRVDRCSLQPCRNGGLCLDLGHALRCRCRAGFAGPRCEHD LDDCAGRACANGGTCVEGGGAHRCSCALG FGGRDCRERADPCAARPCAHHGRCYAHFSGLVACAPGYMGARCEFPVHP DGASALPAAPPGLRPGDPQRYLLPPALGLLVAAGVAGAALLLVHVRRRGHS QDAGSRLLAGTPEPSVHALPDALNNLRTQEG SGDGPSSVDWNRPEDVDPQGIYVISAPSIYAREVATPLFPPLHTGRAGQRQ HLLFPYPSSILSVK	ヒト DLL3

10

20

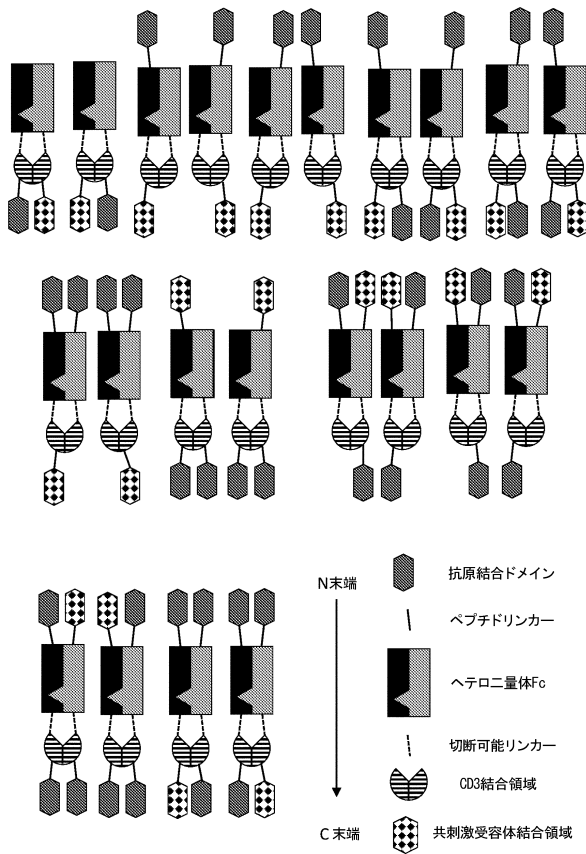
30

40

50

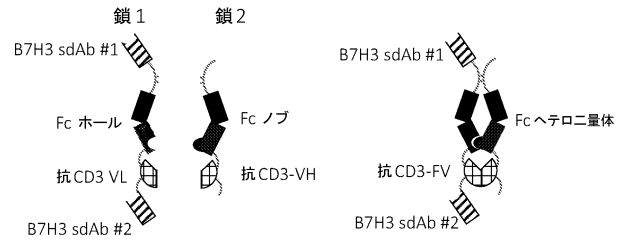
【図面】

【図 1】



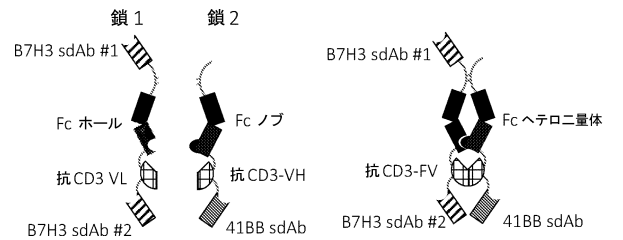
【図 2 - 1】

A



10

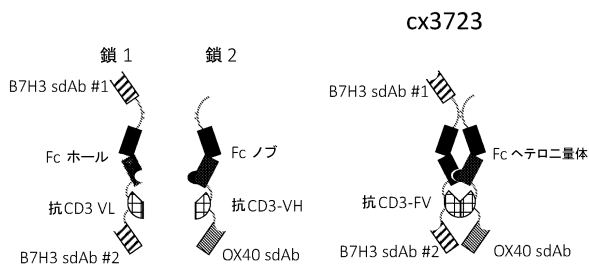
B



20

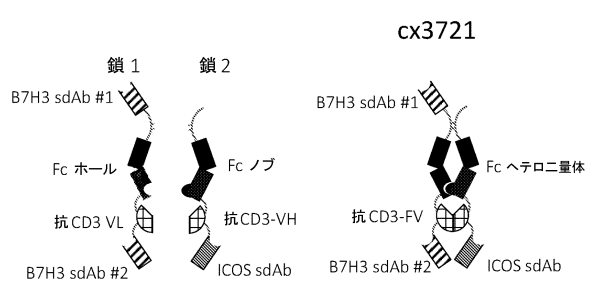
【図 2 - 2】

C



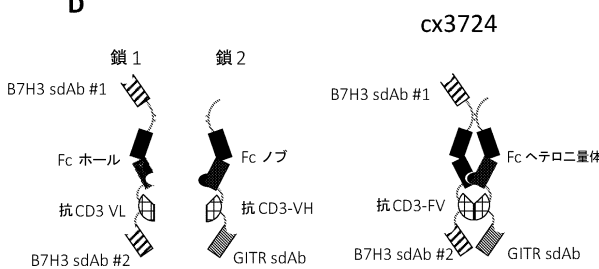
【図 2 - 3】

E

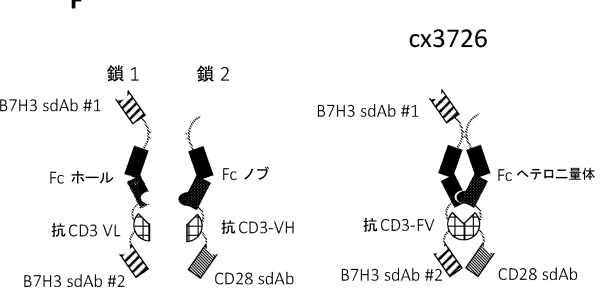


30

D



F

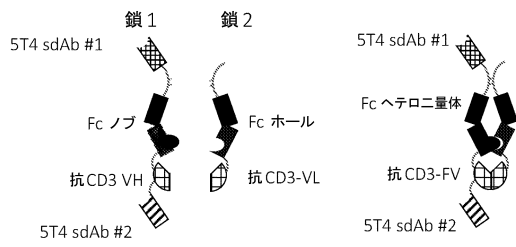


40

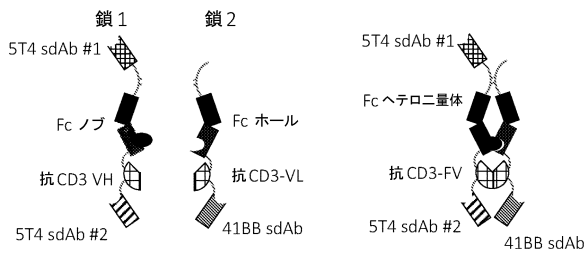
50

【図 3】

cx3546, cx3547, cx5951

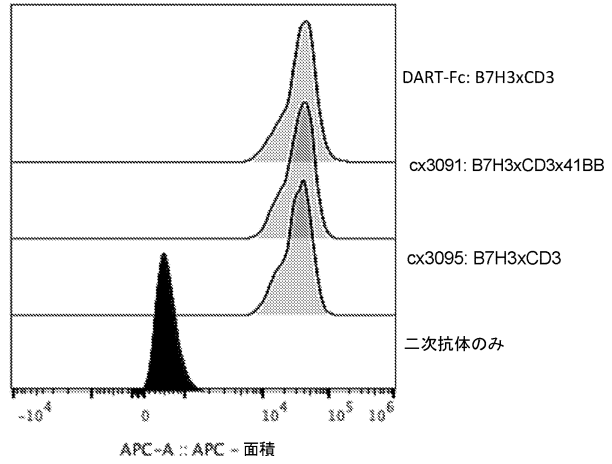


cx3499, cx3497, cx5185



【図 4 A】

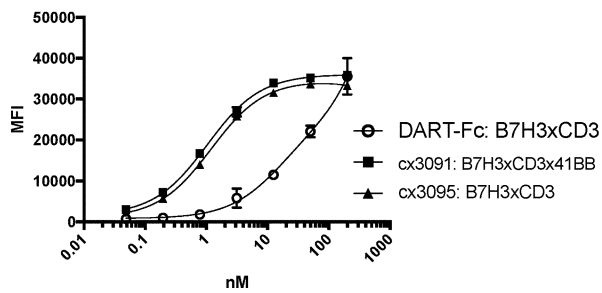
A375細胞との結合: B7H3+



10

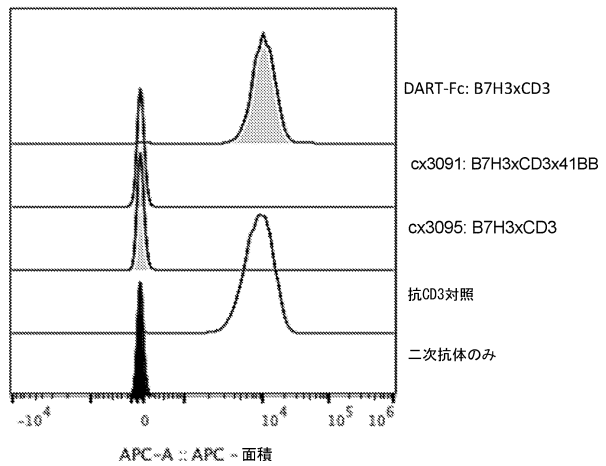
【図 4 B】

A375細胞との結合



【図 4 C】

T細胞との結合

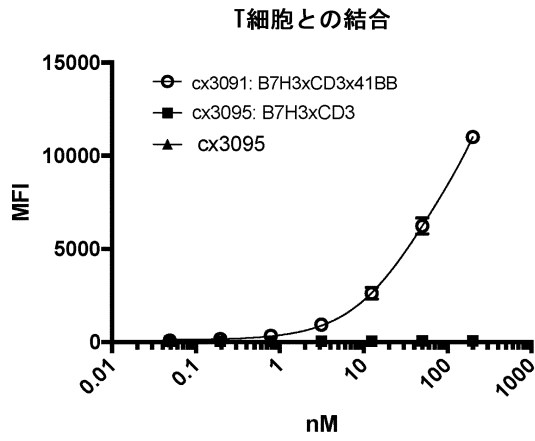


30

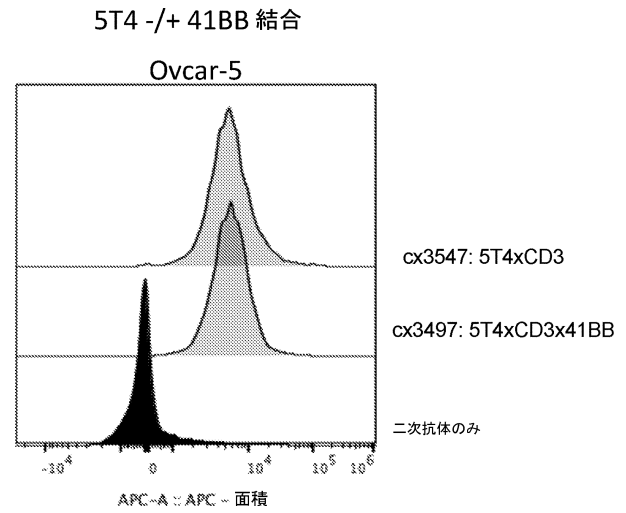
40

50

【図 4 D】

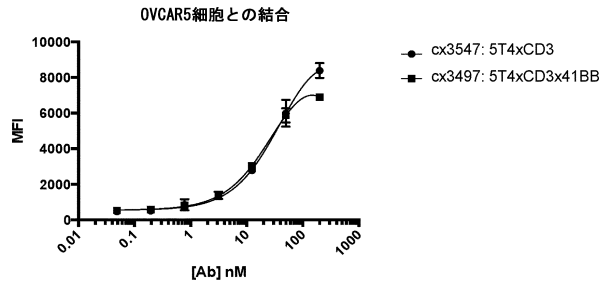


【図 5 A】

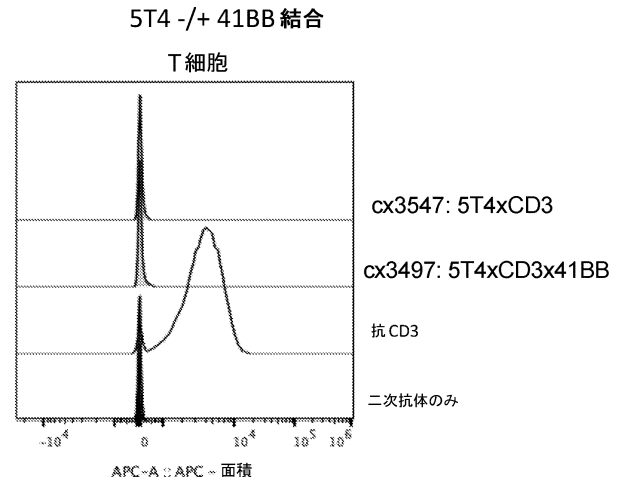


10

【図 5 B】



【図 5 C】



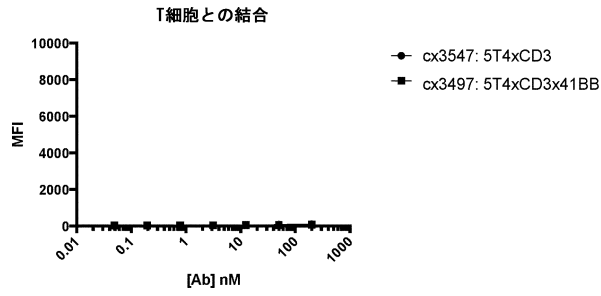
20

30

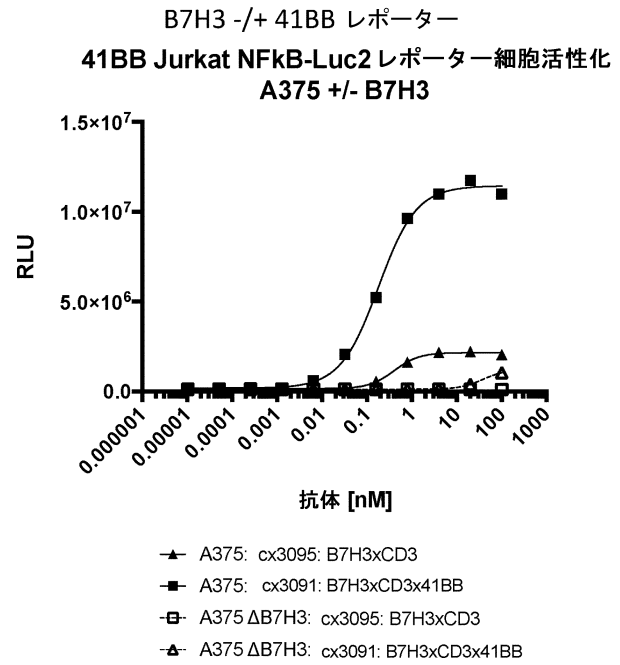
40

50

【図 5 D】



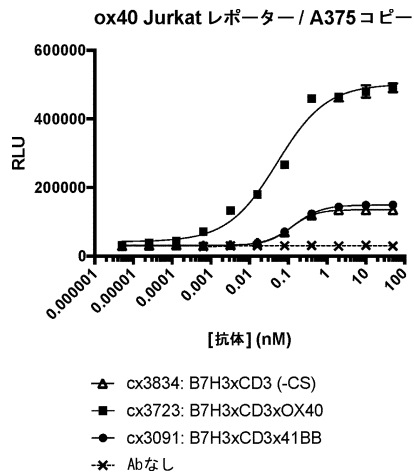
【図 6 A】



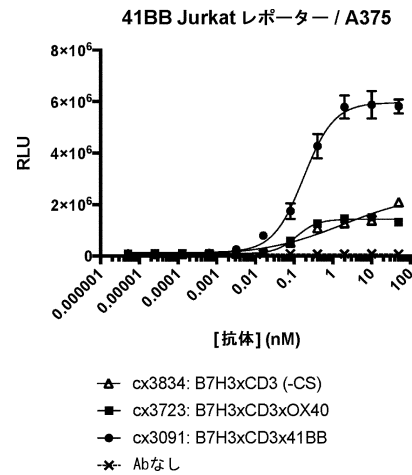
10

20

【図 6 B】



【図 6 C】

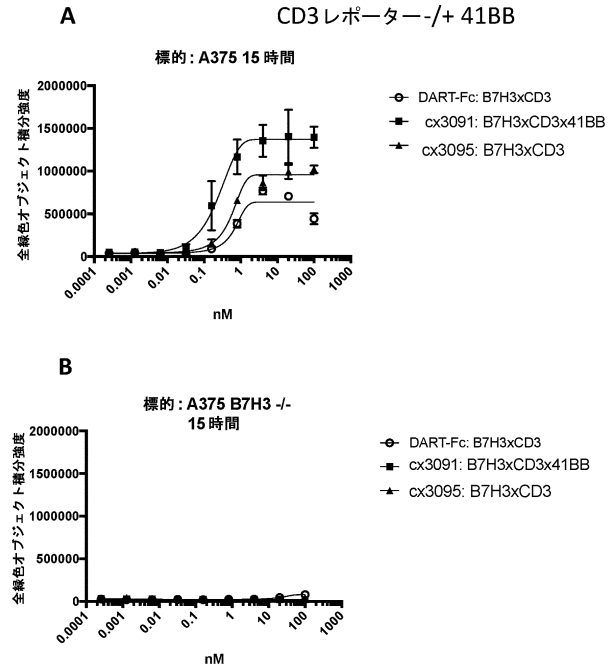


30

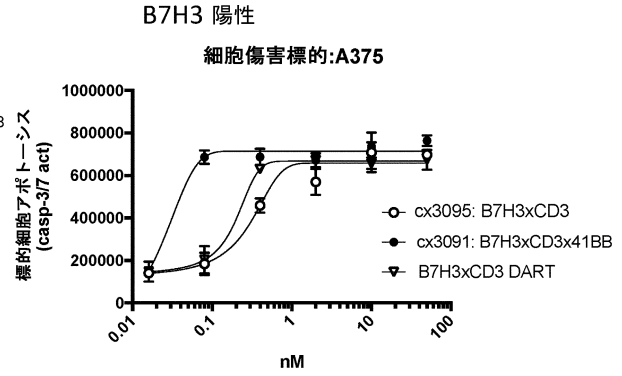
40

50

【図 7】

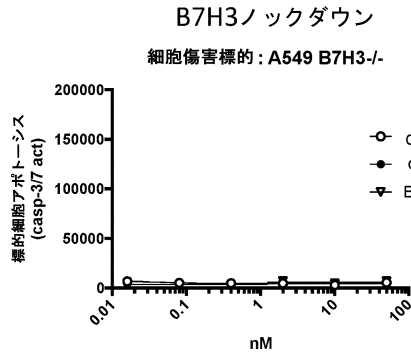


【図 8 A】

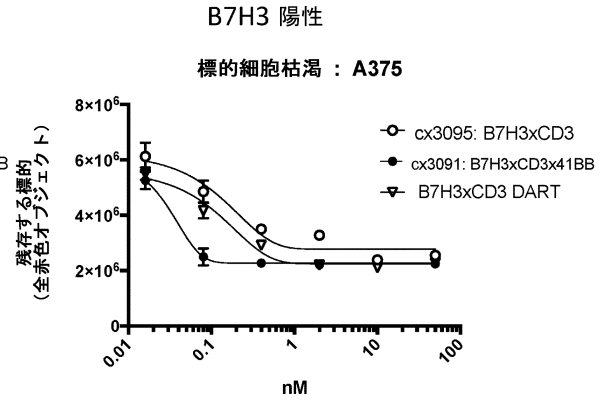


10

【図 8 B】



【図 8 C】

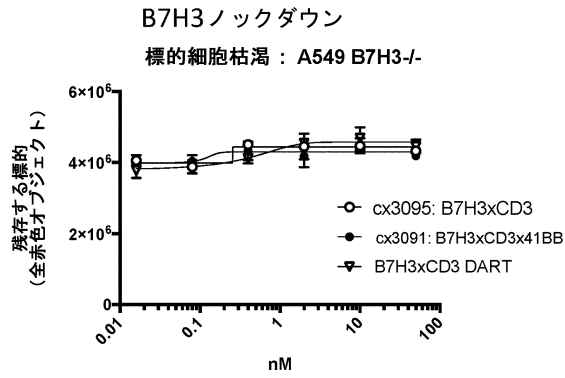


30

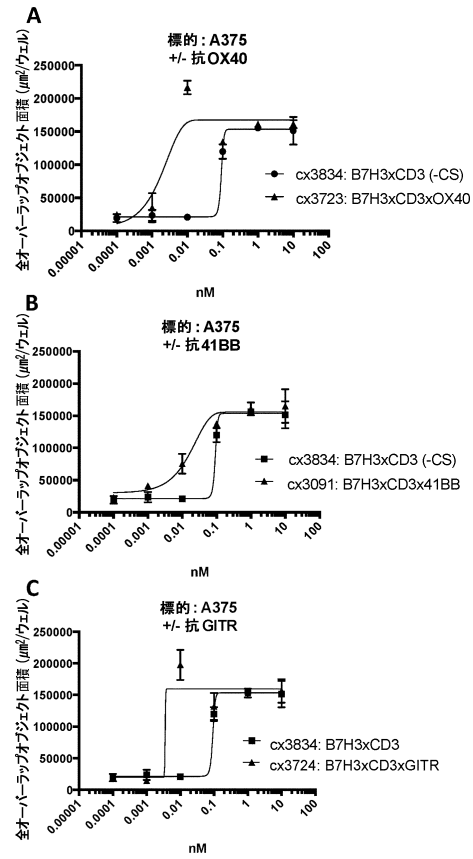
40

50

【図 8 D】



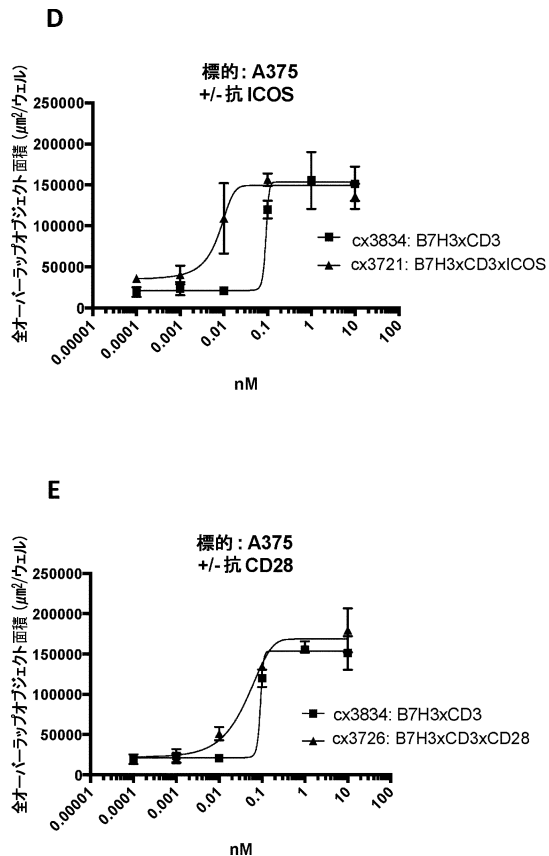
【図 9 - 1】



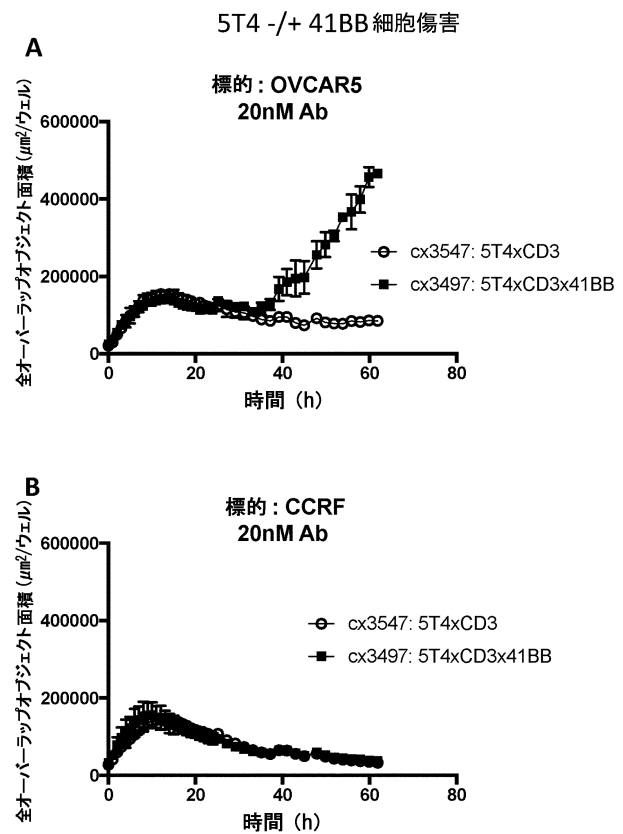
10

20

【図 9 - 2】



【図 10】



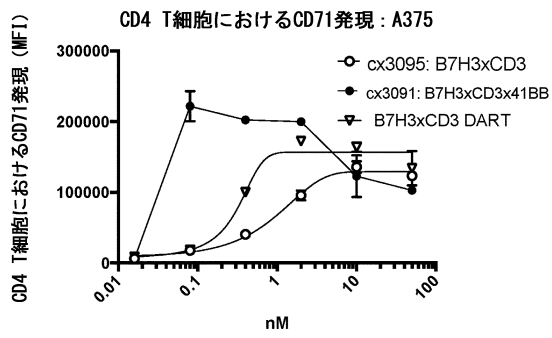
30

40

50

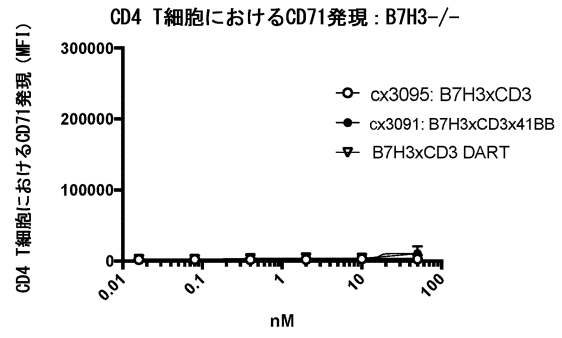
【図 1 1 A】

B7H3 陽性



【図 1 1 B】

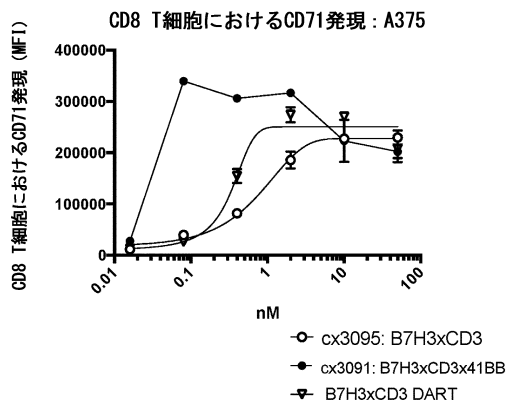
B7H3 ノックダウン



10

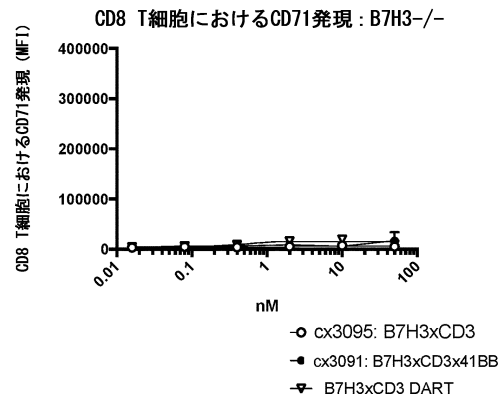
【図 1 1 C】

B7H3 陽性



【図 1 1 D】

B7H3 ノックダウン



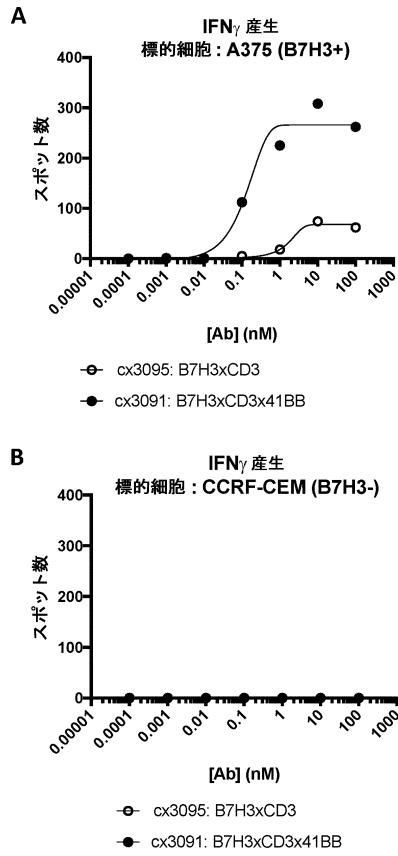
20

30

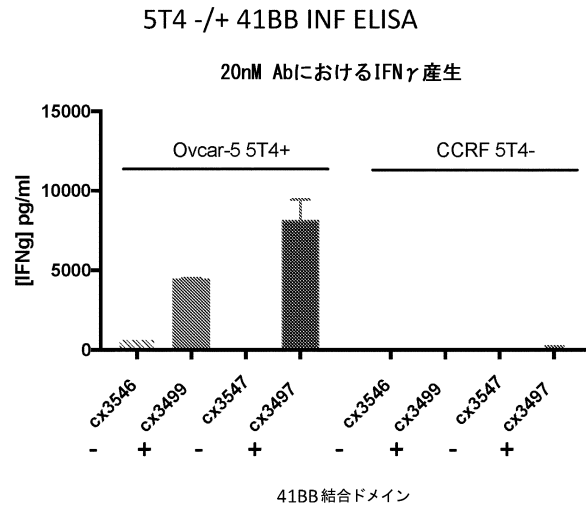
40

50

【図 1 2】



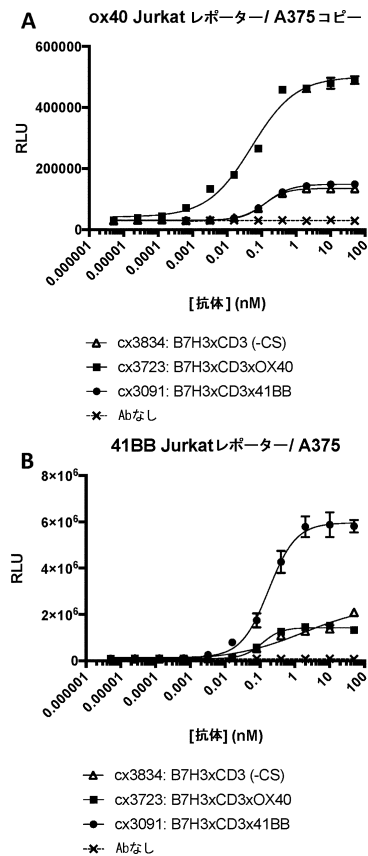
【図 1 3】



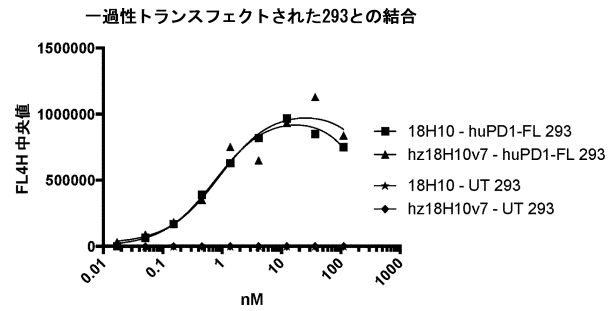
10

20

【図 1 4】



【図 1 5 A】



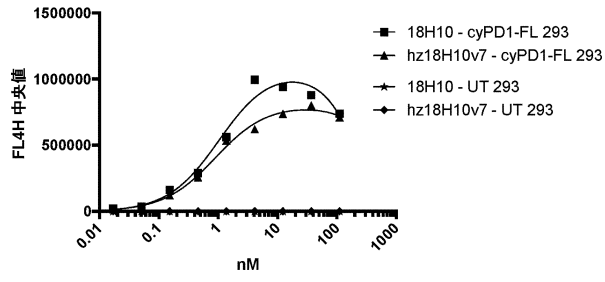
30

40

50

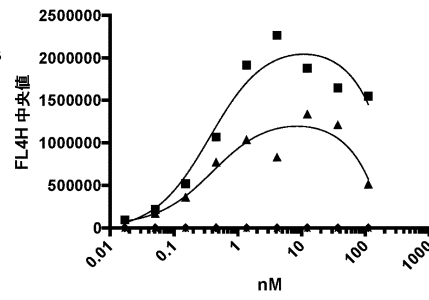
【図 15 B】

一過性トランスフェクトされた293との結合



【図 15 C】

一過性トランスフェクトされた293との結合

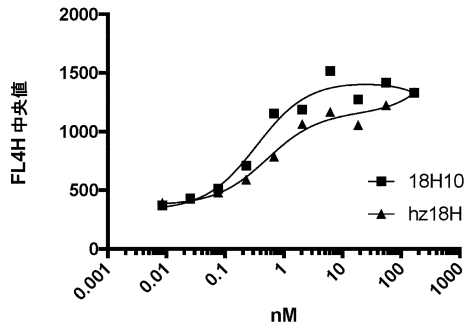


■ 18H10 - muPD1-FL 293
 ▲ hz18H10v7 - muPD1-FL 293
 ★ 18H10 - UT 293
 ◆ hz18H10v7 - UT 293

10

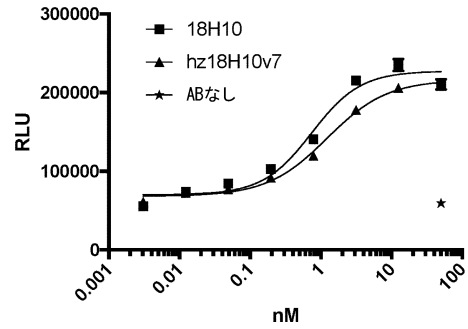
【図 16】

ヒト活性化T細胞との結合



【図 17】

PD1/PDL1 阻止レポーターアッセイ



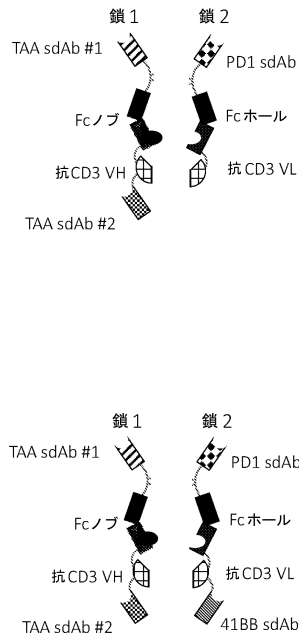
20

30

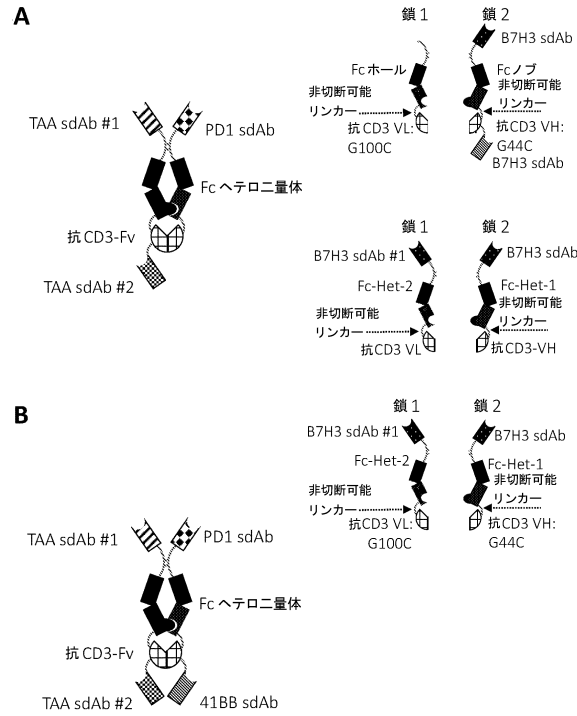
40

50

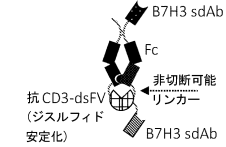
【図 18】



【図 19 A】



sdAb-Fc-dsFV-sdAb: cx3072, cx5952



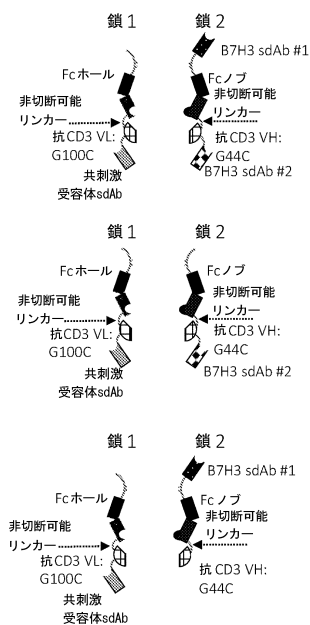
sdAb-Fc-Fv: cx6079



sdAb-Fc-dsFV: cx6080, cx6081

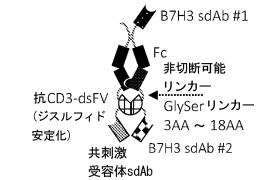


【図 19 B】



【図 19 C】

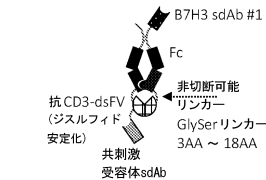
cx5823: B7H3 sdAb N末端およびC末端



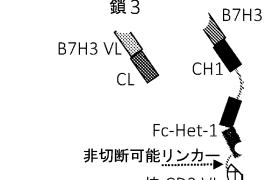
cx5873: B7H3 sdAb C末端のみ



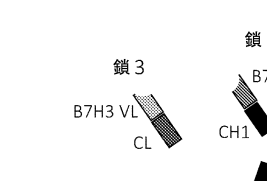
cx5965: B7H3 sdAb N末端のみ



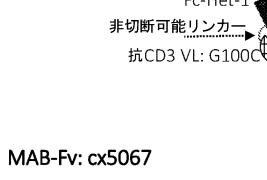
cx5823: B7H3 sdAb N末端およびC末端



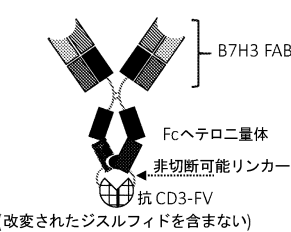
cx5873: B7H3 sdAb C末端のみ



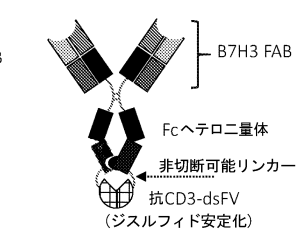
cx5965: B7H3 sdAb N末端のみ



MAB-Fv: cx5067



MAB-dsFV: cx6083, cx6084



10

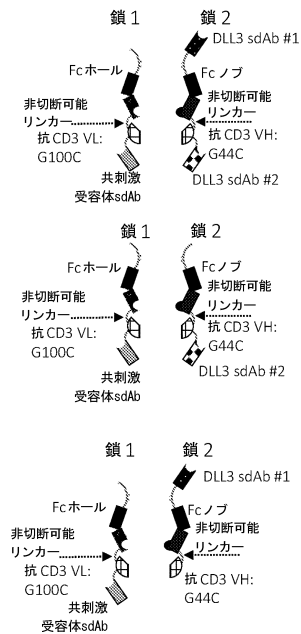
20

30

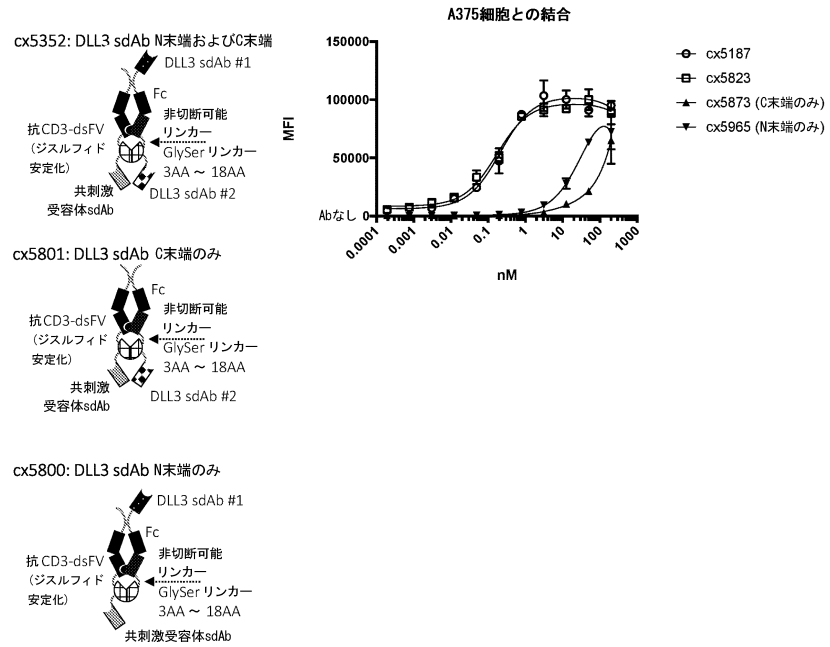
40

50

【図 20】

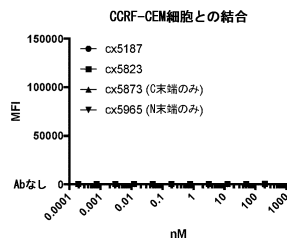


【図 21 A】

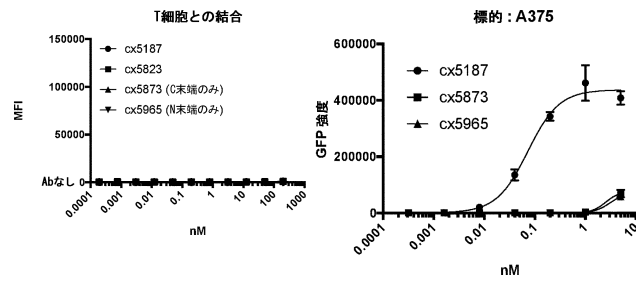


10

【図 21 B】



【図 21 C】



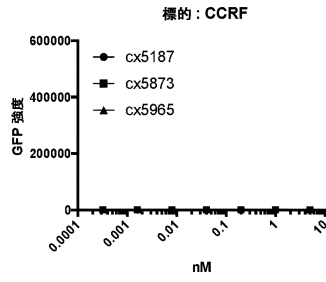
20

30

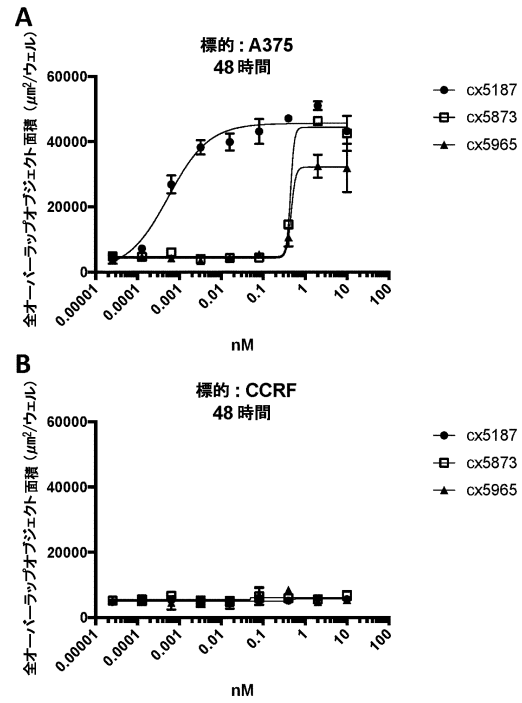
40

50

【図 2 1 D】



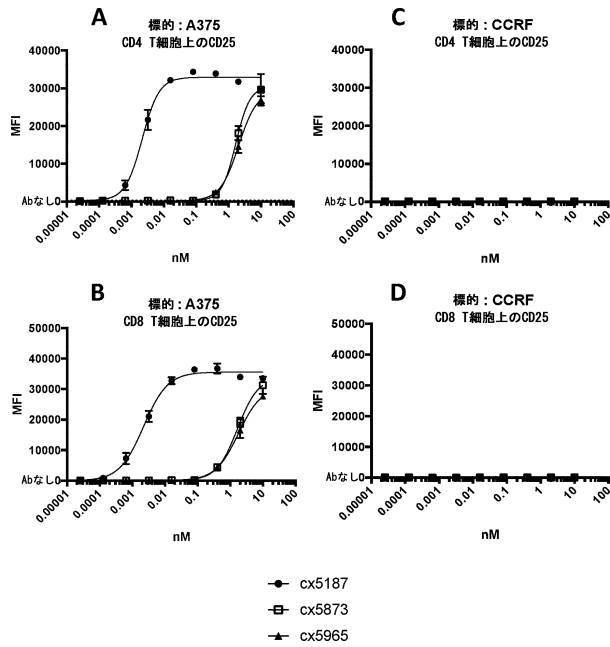
【図 2 2】



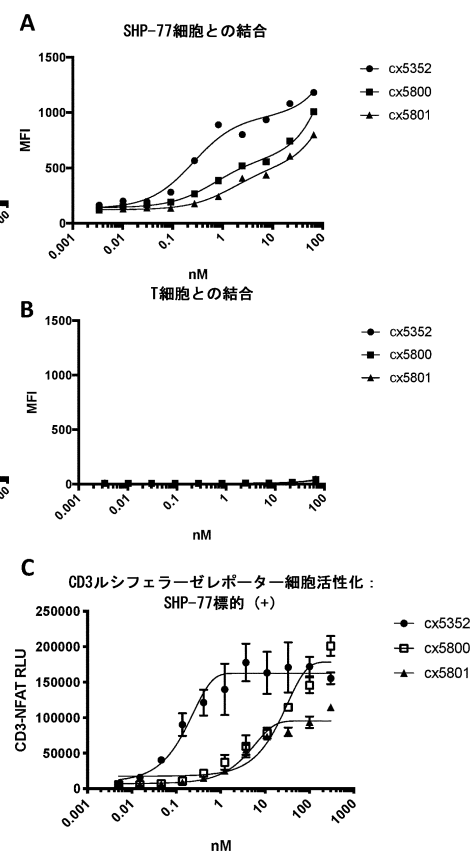
10

20

【図 2 3】



【図 2 4】

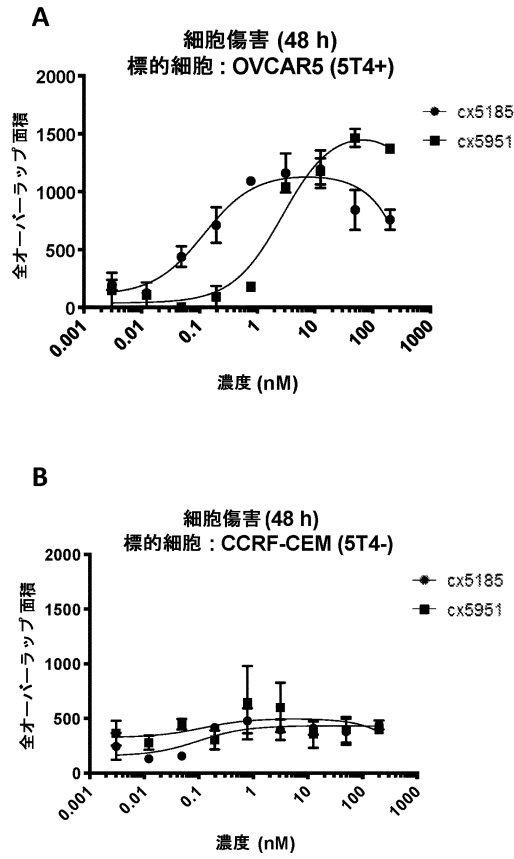


30

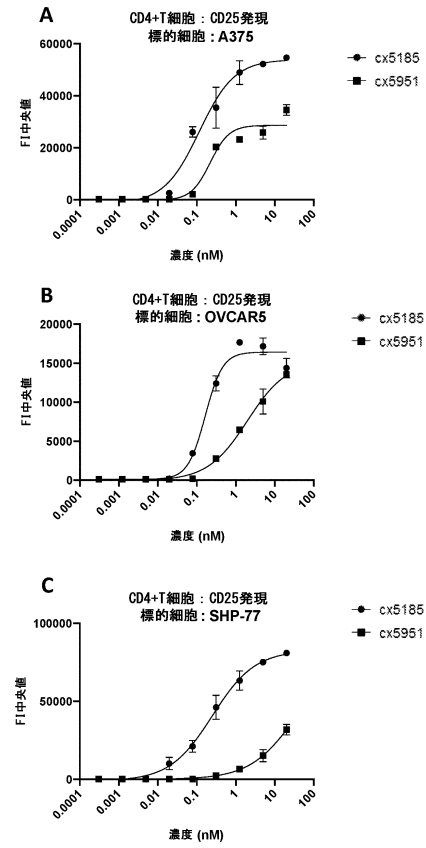
40

50

【図 2 5】



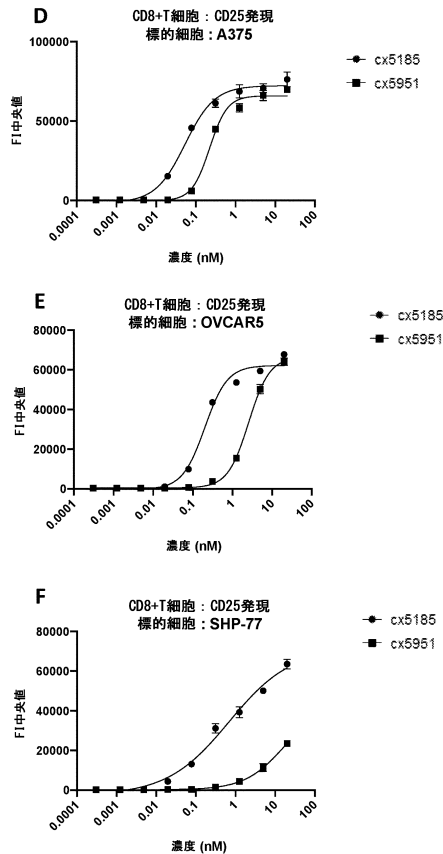
【図 2 6 - 1】



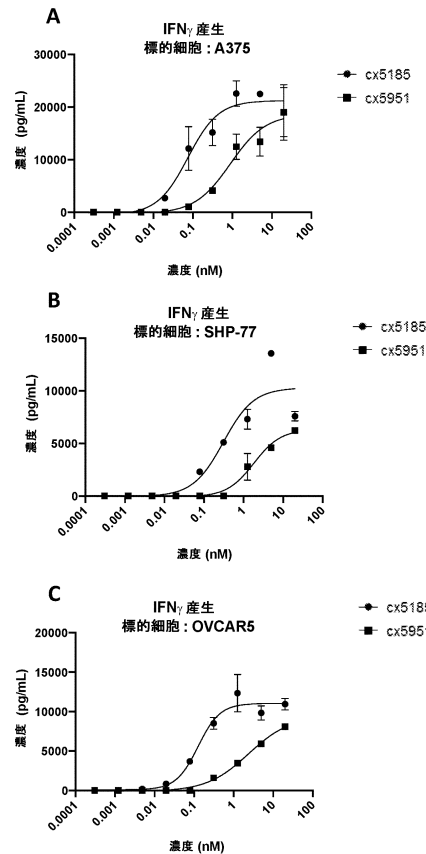
10

20

【図 2 6 - 2】



【図 2 7】

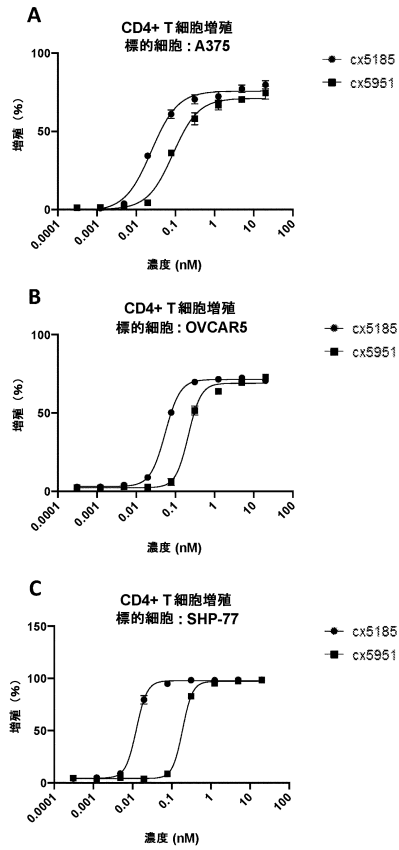


30

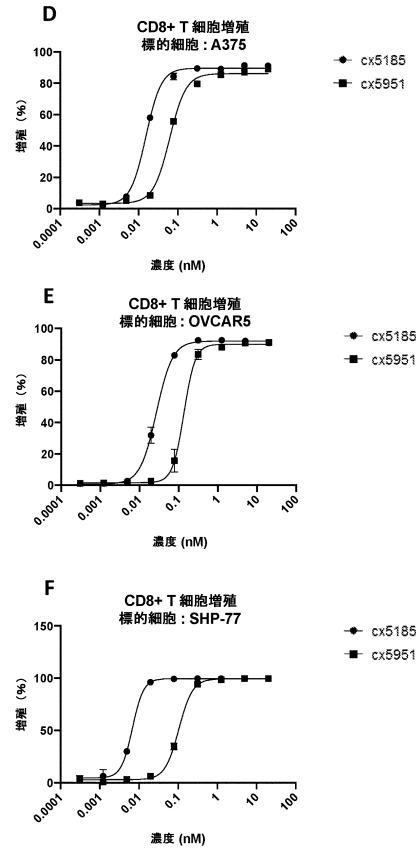
40

50

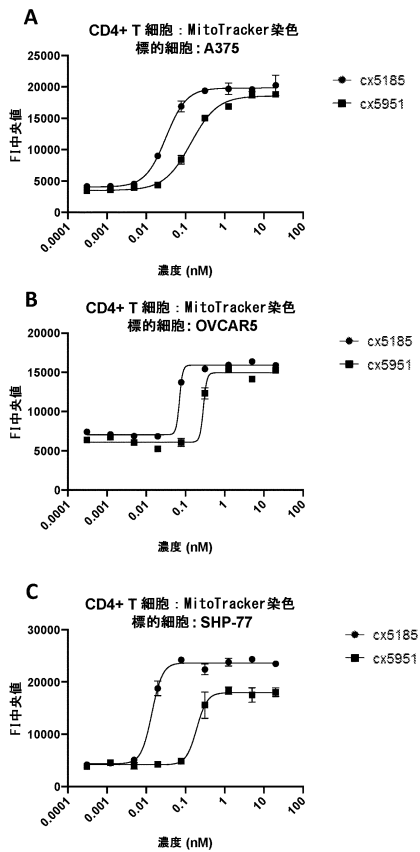
【図 28-1】



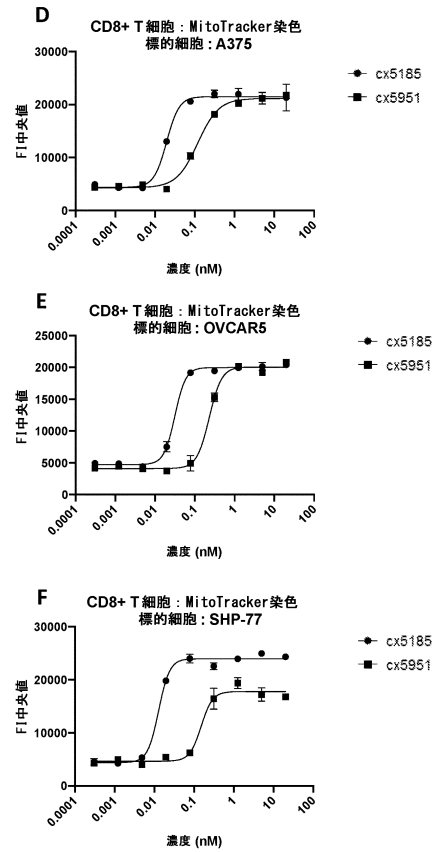
【図 28-2】



【図 29-1】



【図 29-2】



10

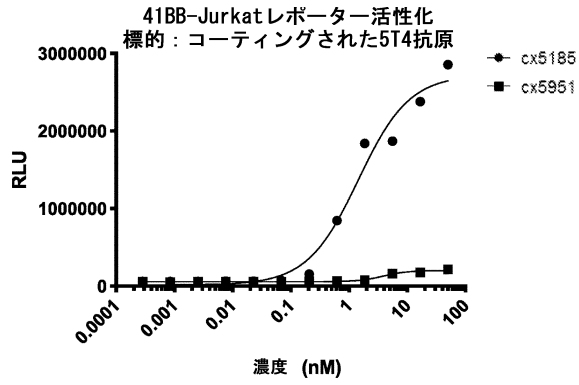
20

30

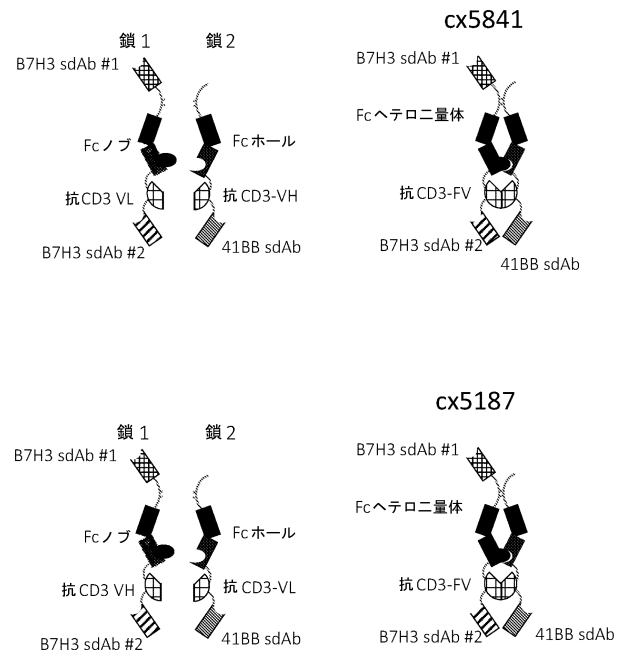
40

50

【図 3 0】

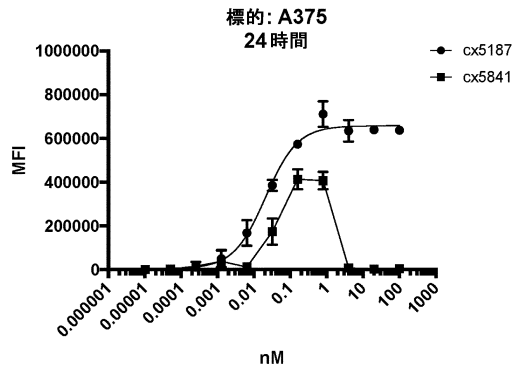


【図 3 1 A】

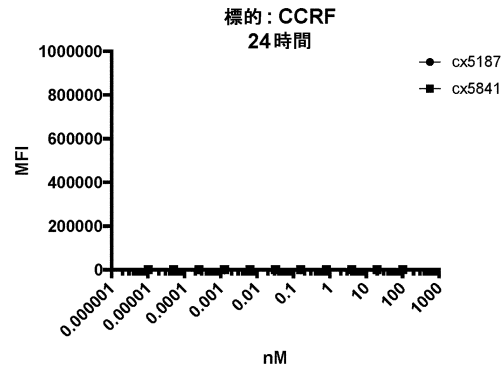


10

【図 3 1 B】



【図 3 1 C】

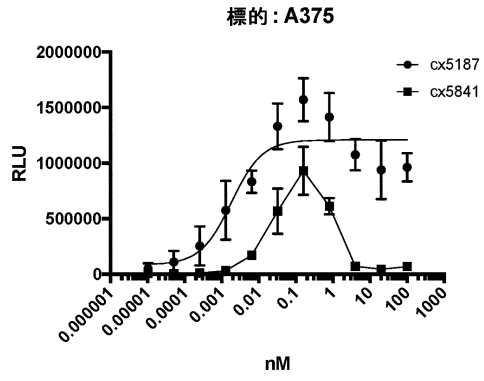


30

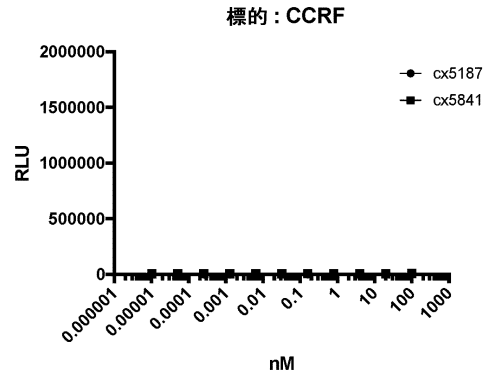
40

50

【図 3 1 D】

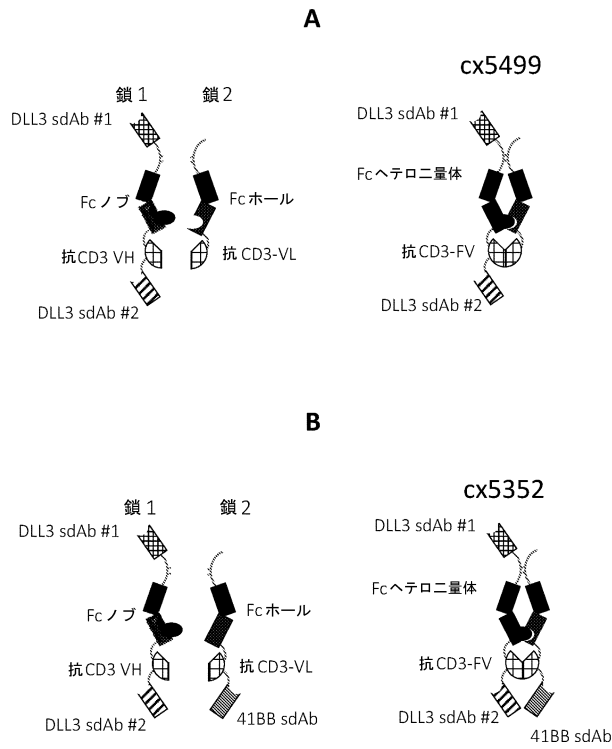


【図 3 1 E】

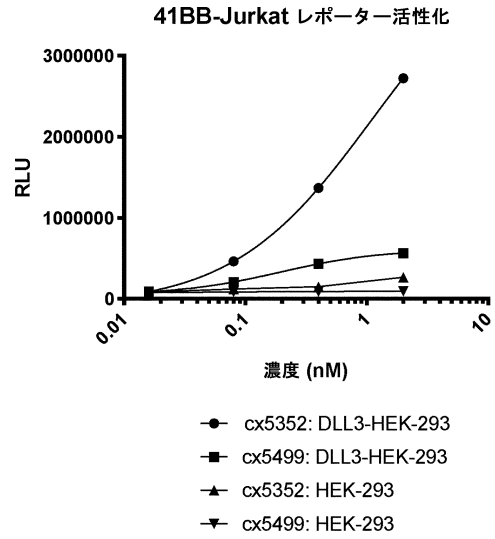


10

【図 3 2】



【図 3 3】



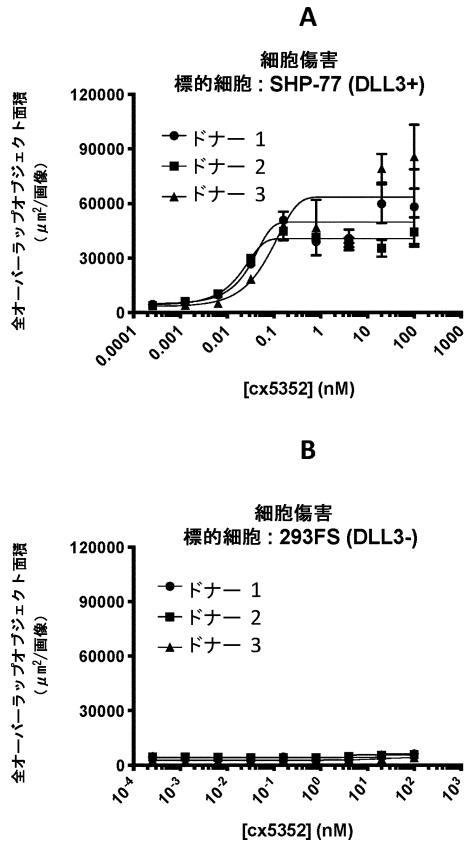
20

30

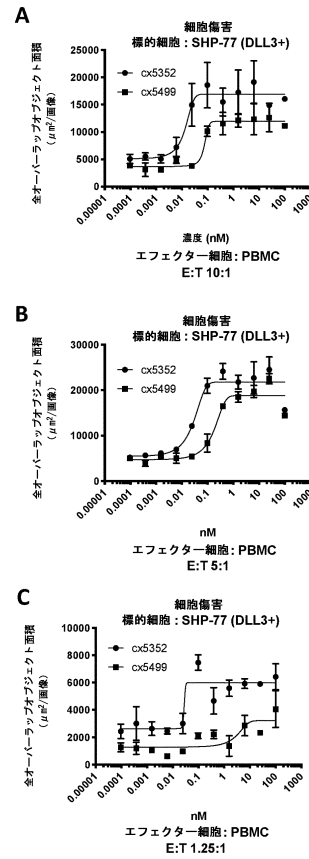
40

50

【図 3 4】



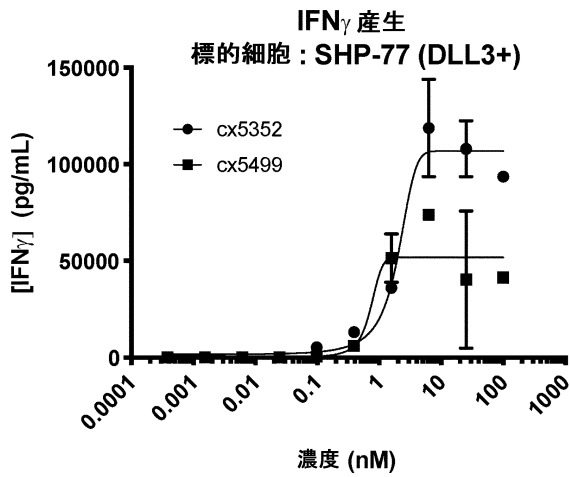
【図 3 5】



10

20

【図 3 6】



30

【配列表】

000765145000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 0 7 K	16/30	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
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	47/65	(2017.01)	A 6 1 K	47/65	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
			A 6 1 K	39/395	U

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/832,268

(32)優先日 平成31年4月10日(2019.4.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 エッケルマン ブレンダン ピー.

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1
0 2 5 スイート 2 0 0

(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

(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

(72)発明者 デヴロー クイン

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 ジョーンズ カイル エス.
アメリカ合衆国 92037 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 11
025 スイート 200
- (72)発明者 パンディット ラジャイ エイ.
アメリカ合衆国 92037 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 11
025 スイート 200
- (72)発明者 ティマー ジョーン シー.
アメリカ合衆国 92037 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 11
025 スイート 200
- 審査官 西村 亜希子
- (56)参考文献 特表2017-536829 (JP, A)
国際公開第2017/060144 (WO, A1)
特表2017-525690 (JP, A)
特表2010-535032 (JP, A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N
C07K
A61K
A61P
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
UniProt/GeneSeq