

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7369113号
(P7369113)

(45)発行日 令和5年10月25日(2023.10.25)

(24)登録日 令和5年10月17日(2023.10.17)

(51)国際特許分類		F I			
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A	
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	A 6 1 P	37/04		
				請求項の数	33 (全156頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2020-503056(P2020-503056)	(73)特許権者	511001758
(86)(22)出願日	平成30年7月20日(2018.7.20)		アプティボ リサーチ アンド デベロ
(65)公表番号	特表2020-530770(P2020-530770		ップメント エルエルシー
	A)		アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 2 1
(43)公表日	令和2年10月29日(2020.10.29)		, シアトル, フォース アベニュー 2
(86)国際出願番号	PCT/EP2018/069850		4 0 1, スイート 1 0 5 0
(87)国際公開番号	WO2019/016402	(73)特許権者	503211529
(87)国際公開日	平成31年1月24日(2019.1.24)		アリゲーター・バイオサイエンス・アー
審査請求日	令和3年7月16日(2021.7.16)		ベア
(31)優先権主張番号	62/535,107		スウェーデン国・2 2 3・8 1・ルンド
(32)優先日	平成29年7月20日(2017.7.20)		・シュレヴェーゲン・2・メディコン・
(33)優先権主張国・地域又は機関			ヴィレッジ
	米国(US)	(74)代理人	110001656
(31)優先権主張番号	62/575,820		弁理士法人谷川国際特許事務所
(32)優先日	平成29年10月23日(2017.10.23)	(72)発明者	ビアンヴニユ, デビッド
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 癌胎児性抗原結合タンパク質、関連する化合物および方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

ヒト5T4に特異的に結合する5T4結合ドメインと、ヒト4-1BBに特異的に結合する4-1BB結合ドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、

前記5T4結合ドメインは、(i)HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)と、(ii)LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)と、を含み、

- (a) 前記HCDR1は配列番号30のアミノ酸配列を含み；
- (b) 前記HCDR2は配列番号32のアミノ酸配列を含み；
- (c) 前記HCDR3は配列番号34のアミノ酸配列を含み；
- (d) 前記LCDR1は配列番号42のアミノ酸配列を含み；
- (e) 前記LCDR2は配列番号10のアミノ酸配列を含み；
- (f) 前記LCDR3は配列番号36のアミノ酸配列を含み；

前記4-1BB結合ドメインは、(i)HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、(ii)LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と、を含み、

- (a) 該HCDR1は配列番号2のアミノ酸配列を含み；
- (b) 該HCDR2は配列番号4のアミノ酸配列を含み；
- (c) 該HCDR3は配列番号6のアミノ酸配列を含み；
- (d) 該LCDR1は配列番号8のアミノ酸配列を含み；

(e) 該 L C D R 2 は配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含み；

(f) 該 L C D R 3 は配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む、

前記多特異性ポリペプチド。

【請求項 2】

前記 5 T 4 結合ドメインが配列番号 3 8 および 4 6 からなる群から選択される配列に対し少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、又は

前記 5 T 4 結合ドメインが配列番号 3 8 および 4 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、又は

前記 5 T 4 結合ドメインが配列番号 4 4、4 8、および 5 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、又は

10

前記 5 T 4 結合ドメインが配列番号 4 4、4 8、および 5 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、

請求項 1 に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 3】

前記 5 T 4 結合ドメインが、

配列番号 3 8 および 4 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む；及び／又は

配列番号 4 4、4 8、および 5 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、

20

請求項 1 に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 4】

前記 5 T 4 結合ドメインが、

配列番号 3 8 および 4 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも 9 7 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む；及び／又は

配列番号 4 4、4 8、および 5 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも 9 7 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、

請求項 1 に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 5】

前記 4 - 1 B B 結合ドメインが、

配列番号 1 4 に対し少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、又は

30

前記 4 - 1 B B 結合ドメインが配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、並びに／又は

配列番号 1 6 及び 2 2 に対し少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、又は

配列番号 1 6 及び 2 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、

請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 6】

前記 4 - 1 B B 結合ドメインが、

40

配列番号 1 4 に対し少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、並びに／又は

配列番号 1 6 及び 2 2 に対し少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 7】

前記 4 - 1 B B 結合ドメインが、

配列番号 1 4 に対し少なくとも 9 7 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、並びに／又は

配列番号 1 6 及び 2 2 に対し少なくとも 9 7 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む

50

軽鎖可変領域を含む、

請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 8】

前記 5 T 4 結合ドメインの前記 V H 及び／若しくは V L 領域は、フレームワーク領域中に 1 若しくは複数の突然変異を有し、該突然変異は、配列番号 1 3 0 又は 1 7 0 のフレームワーク領域と比較されるものである、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 9】

前記突然変異は、安定化のためのジスルフィド結合を導入するものである、請求項 8 に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 10】

配列番号 1 3 8、1 4 0、1 7 2 及び 1 7 4 から成る群より選ばれるアミノ酸配列に対し少なくとも 9 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、又は配列番号 1 3 8、1 4 0、1 7 2 及び 1 7 4 から成る群より選ばれるアミノ酸配列を含む、請求項 8 記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 11】

配列番号 1 3 8、1 4 0、1 7 2 及び 1 7 4 から成る群より選ばれるアミノ酸配列に対し少なくとも 9 5 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 8 記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 12】

前記 5 T 4 結合ドメインと前記 4-1 B B 結合ドメインは、結合ドメインリンカー又は結合ドメインリンカーと免疫グロブリン Fc 領域によって結合され、該免疫グロブリン Fc 領域はヒンジ領域及び免疫グロブリン定常領域を含む、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 13】

免疫グロブリン定常領域が、配列番号 1 5 8 又は 1 6 0 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 14】

前記多特異性ポリペプチドは、(i) 5 T 4 結合ドメイン、(ii) ヒンジ領域、(iii) 免疫グロブリン定常領域、(iv) 結合ドメインリンカー、及び (v) 4-1 B B 結合ドメインを、アミノ末端からカルボキシル末端に向かってこの順で含み；又は (i) 4-1 B B 結合ドメイン、(ii) 結合ドメインリンカー、(iii) 免疫グロブリン定常領域、(iv) ヒンジ領域、及び (v) 5 T 4 結合ドメインを、アミノ末端からカルボキシル末端に向かってこの順で含む、請求項 12 又は 13 に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 15】

前記 5 T 4 結合ドメインが単鎖可変領域フラグメント (s c F v) 及び／又は前記 4-1 B B 結合ドメインが s c F v である、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 16】

前記 s c F v がリンカーポリペプチドを含む、請求項 15 記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 17】

前記リンカーポリペプチドが前記 s c F v の軽鎖可変領域と重鎖可変領域との間に存在し、及び／又は前記リンカーポリペプチドが、

G l y₄ S e r リンカーを含むリンカーポリペプチド、

n = 1～5 である式 (G l y₄ S e r)_n を含むリンカーポリペプチド、

配列番号 8 5～1 0 8 から選択されるアミノ酸配列を含むリンカーポリペプチド、又は

配列番号 9 8 に記載のアミノ酸配列 (G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S)

を含む、請求項 16 に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 18】

前記 5 T 4 結合ドメイン s c F v が、

10

20

30

40

50

配列番号 120、122 及び 124 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも 90% の同一性を有する配列、若しくは配列番号 120、122 及び 124 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、並びに／又は

前記 4-1BB 結合ドメイン s c F v が、配列番号 110 で示されるアミノ酸配列又は配列番号 110 で示されるアミノ酸配列に対し少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 19】

前記 5T4 結合ドメイン s c F v が、

配列番号 120、122 及び 124 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも 95% の同一性を有する配列を含み、並びに／又は

前記 4-1BB 結合ドメイン s c F v が、配列番号 110 で示されるアミノ酸配列に対し少なくとも 95% の同一性を有する配列を含む、請求項 15～17 のいずれか 1 項に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 20】

多特異性ポリペプチドのエフェクター細胞への結合が、エフェクター細胞の活性化を増強する、又は

多特異性ポリペプチドのエフェクター細胞への結合が、エフェクター細胞の活性化および／若しくはエフェクター細胞の増殖を増大させる、又は

多特異性ポリペプチドのエフェクター細胞および 5T4 発現細胞への結合が、エフェクター細胞依存的な、5T4 発現細胞の溶解を増強する、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 21】

前記 5T4 結合ドメインの前記軽鎖可変領域および／若しくは前記重鎖可変領域がヒト型化されている、並びに／又は、前記 4-1BB 結合ドメインの前記軽鎖可変領域および／または前記重鎖可変領域がヒト型化されている、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の多特異性ポリペプチド。

【請求項 22】

2 個の同一のポリペプチドを含み、該 2 個のポリペプチドが請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドである、ダイマー。

【請求項 23】

請求項 1～21 のいずれか一項に記載のポリペプチドまたは請求項 22 に記載のダイマーと、薬剤的に許容できる担体、希釈剤、または賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 24】

経口投与用単位剤形、静脈内投与用単位剤形、鼻腔内投与用単位剤形、坐剤用単位剤形、皮内投与用単位剤形、筋肉内投与用単位剤形、腹腔内投与用単位剤形、皮下投与用単位剤形、硬膜外投与用単位剤形、舌下投与用単位剤形、および脳内投与用単位剤形からなる群から選択される剤形に製剤化され；又は錠剤、丸剤、ペレット剤、カプセル剤、散剤、菓子錠剤、粒剤、水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤、徐放性製剤、エアゾール剤、および噴霧剤からなる群から選択される経口投与用単位剤形として製剤化された、請求項 23 記載の医薬組成物。

【請求項 25】

請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又は請求項 22 記載のダイマー又は請求項 23 若しくは請求項 24 記載の医薬組成物を含む、対象における、5T4 の発現を特徴とする障害の治療剤。

【請求項 26】

前記障害ががんである、請求項 25 記載の治療剤。

【請求項 27】

前記がんが、乳がん、膵がん、卵巣がん、非小細胞肺癌、中皮腫、慢性リンパ球性白血病 (CLL)、マンツル細胞白血病 (mantle cell leukemia) (MCL)、急性リンパ芽球白血病 (ALL)、メラノーマ、扁平上皮癌、副腎がん、膀胱が

10

20

30

40

50

ん、子宮頸がん、腎がん、胃がん、前立腺がん、甲状腺がん、肝臓がん、子宮がん、神経線維腫、肉腫、癌腫、または頭頸部がんである、請求項 26 に記載の治療剤。

【請求項 28】

請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド又は請求項 22 記載のダイマーをコードする、単離された核酸分子。

【請求項 29】

前記核酸分子は、配列番号 109、119、121、123、137、171、および 173 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 28 記載の単離された核酸分子。

【請求項 30】

請求項 28 又は 29 記載の単離された核酸分子を含む、発現ベクター。

【請求項 31】

前記核酸分子が、宿主細胞における核酸セグメントの発現に好適な制御配列に作動可能のように連結されている、請求項 30 記載の発現ベクター。

【請求項 32】

請求項 30 又は 31 に記載の前記発現ベクターを含む、組換え宿主細胞。

【請求項 33】

5T4 結合ドメイン及び 4-1BB 結合ドメインを含むポリペプチドを製造するための方法であって、請求項 31 に記載の発現ベクターを含む組換え宿主細胞を、前記核酸セグメントが発現される条件下で培養することで、前記 5T4 結合ドメイン及び 4-1BB 結合ドメインを含むポリペプチドを産生させることを含む、前記方法。

【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、2017年7月20日に出願された米国仮特許出願第62/535,107号；2017年10月23日に出願された同第62/575,820号；および2018年3月26日に出願された同第62/648,072号に基づく優先権を主張し、各米国仮特許出願の全内容を参照により援用するものである。

【0002】

電子ファイルで提出されたテキストファイルの説明

本願で電子ファイルで提出されたテキストファイルの全内容は参照によって本明細書に援用される。コンピューターで読み取り可能な書式の配列表コピー（ファイル名：APVO_057_03WO_Seqlist_ST25.txt、保存日：2018年7月20日、ファイルサイズ：260キロバイト）。

【0003】

開示の分野

本開示は、トロホブラスト糖タンパク質（trophoblast glycoprotein）（5T4）に特異的に結合する分子に関する。これらの分子は、ヒト型化された5T4結合ドメインを少なくとも1つ有し得る。これらの分子は、5T4の発現を特徴とする障害（例えば、がん）の特性評価や治療に有用である。5T4に結合するタンパク質治療薬は、単一特異性のタンパク質治療薬である場合と、多特異性のタンパク質治療薬である場合がある。本開示はまた、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9（tumor necrosis factor receptor superfamily member 9）（4-1BBまたはCD137）に特異的に結合するタンパク質治療薬に関する。多特異性のタンパク質治療薬が、5T4発現細胞と、エフェクター細胞上に発現された4-1BBと、の両方に結合することで、エフェクター細胞の活性化、増殖、および／またはエフェクター細胞を介した細胞毒性が増強され得る。

【背景技術】

【0004】

5T4（別名：トロホブラスト糖タンパク質、TPBG、M6P1、およびWai f 1

10

20

30

40

50

）は、詳細な定義がなされている腫瘍関連抗原（TAA）であり、マンチェスター大学の Peter Stern 教授によって最初に同定された（Hole and Stern, 1988）。5T4 は、非小細胞肺癌、腎がん、膵がん、前立腺がん、乳がん、結腸直腸がん、胃がん、卵巣がん、および子宮頸がんをはじめとする種々の悪性腫瘍、並びに急性リンパ性白血病の患者において高い割合で発現されている癌胎児性抗原であり、腫瘍始原細胞で発現されていることも示されている（Castro et al., 2012; Damelin et al., 2011; Elkord et al., 2009; Southall et al., 1990）。

【0005】

胎盤や特殊な上皮など、いくつかの健常組織で低レベルの 5T4 発現が検出されているが、腫瘍における発現レベルはそれよりもかなり高い。

【0006】

5T4 が CXCR4 の機能活性を制御することを示唆するデータがある（Castro et al., 2012; Southgate et al., 2010）。5T4 に結合する抗体または 5T4 のノックダウンは、腫瘍の成長および転移に關与する経路である、CXCR4 を介した細胞遊走の阻害をもたらした。すなわち、5T4 の標的化は、様々ながんの治療において、治療上の利点を与える可能性がある。現在、5T4 を特異的に標的とする、またはそれと特異的に結合する、FDA に認可された治療薬は存在しない。5T4 が発現される悪性腫瘍を治療するための新規治療薬が必要とされている。

【0007】

4-1BB（別名：CD137 または TNFRSF9）は、腫瘍壊死因子（TNF）受容体（TNFR）スーパーファミリーのメンバーである。4-1BB は、活性化された CD4⁺T 細胞、活性化された CD8⁺T 細胞、調節性 T 細胞（Treg）、樹状細胞（DC）、単球、マスト細胞、好酸球、および腫瘍血管内皮細胞をはじめとする様々な細胞集団上に発現されている。4-1BB の活性化は受容体のオリゴマー化に依存しており（Rabue et al., 2005; Wyzgol et al., 2009）、このオリゴマー化は、抗原提示細胞（APC）および他の細胞型の細胞表面上に三量体として発現される 4-1BBL（別名：CD137L）への結合により誘導される。CD8⁺T 細胞上の 4-1BB の活性化は、CD8⁺T 細胞のエフェクター機能を持続および増強し、Th1 型サイトカイン産生を選択的に補助する（Shuford et al., 1997; Lee et al., 2002; Pulle et al., 2006）。CD4⁺T 細胞上の 4-1BB の活性化では、4-1BB 刺激がまず活性化を引き起こして、その後、この活性化により細胞死が誘導されるが、このことは、4-1BB 作動薬抗体が自己免疫だけでなく腫瘍免疫においても治療効果を示した理由を説明していると考えられる（Zhang, JCI, 2007; Sun, Trends Mol Med, 2003）。4-1BB の活性化は、Treg の機能を抑制したり、あるいは Treg を細胞傷害性 CD4⁺T 細胞に変換することも報告されている（Akhmetzyanova et al., 2016; So et al., 2008）。

【0008】

T 細胞上に発現し T 細胞のエフェクター機能を調節していることに加え、4-1BB は、CD16 やサイトカインで活性化されたナチュラルキラー（NK）細胞上でも発現上昇している。4-1BB の活性化は、マウス細胞およびヒト細胞の両方で、NK 細胞の抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を増加させることが示されている（Kohrt 2012 and 2014 J Clin Invest, Hout 2012, Oncoimm によるレビュー）。さらに、DC およびマクロファージなどの APC 上に発現された 4-1BB の活性化は、免疫活性化の誘導および／または調節も引き起こし得る。

【0009】

免疫細胞活性化の調節における 4-1BB の役割は、4-1BB が、複数種のがんの治療において好ましい免疫治療標的になり得ることを示唆している。実際に、2 種類の 4-1BB 抗体が臨床開発中である：ブリストル・マイヤーズスクイブ社によって開発されたウレルマブ（BMS-66513）、およびファイザー社によって開発された PF-05082566。それぞれの抗体について、様々な適応症で第 I 相試験および第 II 相試験が進行中である。しかし、4-1BB の活性化後、患者およびマウスモデルにおいて、肝

10

20

30

40

50

臓および皮膚における毒性が確認されている (Ascierto et al., 2010; Dubrot et al., 2010; Niu et al., 2007)。さらに、転移性黒色腫における第二選択療法としてウレルマブを用いる第ⅠⅠ相試験が、肝臓における毒性を原因に2009年に中止された (Garber et al., 2011; Li and Liu, 2013)。

【0010】

すなわち、当該技術分野では、適応となる腫瘍の治療で使用するための、安全且つ効果的に4-1BBを活性化する治療薬が必要とされている。

【発明の概要】

【0011】

いくつかの態様において、本開示は、5T4および／または4-1BBに特異的に結合する多特異性ポリペプチドに関する。いくつかの実施形態では、本開示の5T4結合ドメインが、ヒト5T4の細胞外ドメインに結合する。特定の実施形態では、本開示の4-1BB結合ドメインが、ヒト4-1BBの細胞外ドメインに結合する。いくつかの実施形態において、本開示は、ヒト5T4に特異的に結合する5T4結合ドメインと4-1BB結合ドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記5T4結合ドメインは、(i) HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、(ii) LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と、を含み、(a) 前記HCDR1は配列番号30のアミノ酸配列を含み；(b) 前記HCDR2は配列番号32のアミノ酸配列を含み；(c) 前記HCDR3は配列番号34のアミノ酸配列を含み；(d) 前記LCDR1は配列番号42のアミノ酸配列を含み；(e) 前記LCDR2は配列番号10のアミノ酸配列を含み；(f) 前記LCDR3は配列番号36のアミノ酸配列を含む、前記多特異性ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記5T4結合ドメインは、配列番号38および46からなる群から選択される配列に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、前記5T4結合ドメインは、配列番号38および46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。他の実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記5T4結合ドメインは、配列番号44、48、および50からなる群から選択される配列に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、前記5T4結合ドメインは、配列番号44、48、および50からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。他の実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記5T4結合ドメインは、i) 配列番号38に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号44に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むか；ii) 配列番号46に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号48に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むか；iii) 配列番号46に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号50に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態では、前記5T4結合ドメインは、i) 配列番号38のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号44のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むか；または、ii) 配列番号46のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号48のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むか；または、iii) 配列番号46のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号50のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

【0012】

特定の態様では、本開示は、ヒト5T4に特異的に結合する5T4結合ドメインとヒト

10

20

30

40

50

4-1BBに特異的に結合する4-1BB結合ドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記4-1BB結合ドメインおよび前記5T4結合ドメインはそれぞれ、(i)HC DR1、HC DR2、およびHC DR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)と；(ii)LC DR1、LC DR2、およびLC DR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)と、を含み、前記5T4結合ドメインの前記VH領域および／または前記VL領域は、フレームワーク領域に1または複数の変異を含んでおり；前記5T4結合ドメインは、(a)配列番号30のアミノ酸配列を含むHC DR1と；(b)配列番号32のアミノ酸配列を含むHC DR2と；(c)配列番号34のアミノ酸配列を含むHC DR3と；(d)配列番号8のアミノ酸配列を含むLC DR1と；(e)配列番号10のアミノ酸配列を含むLC DR2と；(f)配列番号36のアミノ酸配列を含むLC DR3と、を含む、前記多特異性ポリペプチドを包含する。いくつかの実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記5T4結合ドメインは、配列番号38に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。1つの実施形態では、前記5T4結合ドメインは、配列番号38のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記5T4結合ドメインは、配列番号40に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、前記5T4結合ドメインは、配列番号40のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記5T4結合ドメインは、配列番号38に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号40に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態では、5T4結合ドメインは、配列番号38のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号40のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

【0013】

本開示はさらに、ヒト5T4に特異的に結合する5T4結合ドメインとヒト4-1BBに特異的に結合する4-1BB結合ドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記4-1BB結合ドメインおよび前記5T4結合ドメインはそれぞれ、(i)HC DR1、HC DR2、およびHC DR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域(VH)と；(ii)LC DR1、LC DR2、およびLC DR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域(VL)と、を含み、前記4-1BB結合ドメインの前記VH領域および／または前記VL領域は、フレームワーク領域に1または複数の変異を含んでおり；前記5T4結合ドメインは、(a)配列番号30のアミノ酸配列を含むHC DR1と；(b)配列番号32のアミノ酸配列を含むHC DR2と；(c)配列番号34のアミノ酸配列を含むHC DR3と；(d)配列番号42のアミノ酸配列を含むLC DR1と；(e)配列番号10のアミノ酸配列を含むLC DR2と；(f)配列番号36のアミノ酸配列を含むLC DR3と、を含む、前記多特異性ポリペプチドを包含する。いくつかの実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記5T4結合ドメインは、配列番号38および46からなる群から選択される配列に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、前記5T4結合ドメインは、配列番号38および46からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記5T4結合ドメインは、配列番号44、48、および50からなる群から選択される配列に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、前記5T4結合ドメインは、配列番号44、48、および50からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記5T4結合ドメインは、i)配列番号38に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号44に対し少なくとも90%、少な

10

20

30

40

50

くとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むか；i i) 配列番号46に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号48に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むか；i i i) 配列番号46に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号50に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態では、前記5 T 4 結合ドメインは、i) 配列番号38のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号44のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むか；または、i i) 配列番号46のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号48のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むか；または、i i i) 配列番号46のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号50のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

【0014】

いくつかの態様において、本開示は、ヒト5 T 4 に特異的に結合する5 T 4 結合ドメインとヒト4-1 B B に特異的に結合する4-1 B B 結合ドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記4-1 B B 結合ドメインおよび前記5 T 4 結合ドメインはそれぞれ、(i) H C D R 1、H C D R 2、およびH C D R 3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域(V H)と；(i i) L C D R 1、L C D R 2、およびL C D R 3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域(V L)と、を含み、前記4-1 B B 結合ドメインの前記V H領域および／または前記V L領域は、フレームワーク領域に1または複数の変異を含んでおり；前記5 T 4 結合ドメインは、(a) 配列番号52のアミノ酸配列を含むH C D R 1と；(b) 配列番号32のアミノ酸配列を含むH C D R 2と；c) 配列番号34のアミノ酸配列を含むH C D R 3と；(d) 配列番号54のアミノ酸配列を含むL C D R 1と；(e) 配列番号10のアミノ酸配列を含むL C D R 2と；(f) 配列番号36のアミノ酸配列を含むL C D R 3と、を含む、前記多特異性ポリペプチドを包含する。特定の実施形態では、上記の各C D R配列を含む前記5 T 4 結合ドメインは、配列番号56に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの態様において、前記5 T 4 結合ドメインは、配列番号56のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、上記の各C D R配列を含む前記5 T 4 結合ドメインは、配列番号58に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、前記5 T 4 結合ドメインは、配列番号58のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、上記の各C D R配列を含む前記5 T 4 結合ドメインは、配列番号56に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号58に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態では、5 T 4 結合ドメインは、配列番号56のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号58のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

【0015】

本開示はまた、ヒト5 T 4 に特異的に結合する5 T 4 結合ドメインとヒト4-1 B B に特異的に結合する4-1 B B 結合ドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記4-1 B B 結合ドメインおよび前記5 T 4 結合ドメインはそれぞれ、(i) H C D R 1、H C D R 2、およびH C D R 3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域(V H)と；(i i) L C D R 1、L C D R 2、およびL C D R 3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域(V L)と、を含み、前記4-1 B B 結合ドメインの前記V H領域および／または前記V L領域は、フレームワーク領域に1または複数の変異を含んでおり；前記5 T 4 結合ドメインは、(a) 配列番号60のアミノ酸配列を含むH C D R 1と；(b) 配列番号62のアミノ酸配列を含むH C D R 2と；c) 配列番号34のアミノ酸配列を含むH C D R 3と；(d)

配列番号 54 のアミノ酸配列を含む L C D R 1 と； (e) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む L C D R 2 と； (f) 配列番号 36 のアミノ酸配列を含む L C D R 3 と、を含む、前記多特異性ポリペプチドを包含する。特定の実施形態では、上記の各 C D R 配列を含む前記 5 T 4 結合ドメインは、配列番号 64 に対し少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または少なくとも 97 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、前記 5 T 4 結合ドメインは、配列番号 64 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。特定の態様では、上記の各 C D R 配列を含む前記 5 T 4 結合ドメインは、配列番号 58 に対し少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または少なくとも 97 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、前記 5 T 4 結合ドメインは、配列番号 58 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の
10 実施形態では、上記の各 C D R 配列を含む前記 5 T 4 結合ドメインは、配列番号 64 に対し少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または少なくとも 97 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 58 に対し少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、または少なくとも 97 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態では、5 T 4 結合ドメインは、配列番号 64 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 58 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

【0016】

特定の態様では、本開示は、ヒト 4-1 B B に特異的に結合する 4-1 B B 結合ドメインを含む多特異性ポリペプチドを提供する。本開示はまた、4-1 B B 結合ドメインと 5 T 4 結合ドメインとを含み、前記 4-1 B B 結合ドメインが結合ドメインリンカーを介して前記 5 T 4 結合ドメインに結合している、多特異性ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、多特異性ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、(i) 5 T 4 結合ドメインと、(ii) 結合ドメインリンカーと、(iii) 4-1 B B 結合ドメインと、を含む。特定の態様では、前記 5 T 4 結合ドメインは、単鎖可変領域フラグメント (s c F v) である。いくつかの実施形態では、前記 s c F v の軽鎖可変領域は、前記 s c F v の重鎖可変領域のカルボキシル末端側である。他の実施形態では、前記 s c F v の軽鎖可変領域は、前記 s c F v の重鎖可変領域のアミノ末端側である。特定の態様では、前記 s c F v は、リンカーポリペプチドを含む。いくつかの例で、前記リンカーポリペプチドは、前記 s c F v の軽鎖可変領域と重鎖可変領域との間に存在する。特定の
20 実施形態では、前記リンカーポリペプチドは、G l y₄ S e r リンカーを含む。いくつかの実施形態では、前記リンカーポリペプチドは、n = 1 ~ 5 である式 (G l y₄ S e r)_n を含む。いくつかの態様において、前記リンカーポリペプチドは、配列番号 85 ~ 108 から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、前記リンカーポリペプチドは、配列番号 98 に記載のアミノ酸配列 (G G G S G G G S G G G S G G G S)
30) を含む。

【0017】

特定の態様では、上記の各 C D R 配列を含む s c F v は、配列番号 118、120、122、124、126、128、130、132、134、および 170 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 95 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、
40 s c F v は、配列番号 118、120、122、124、126、128、130、132、134、および 170 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0018】

いくつかの態様において、本開示は、ヒト 4-1 B B に特異的に結合する 4-1 B B 結合ドメインと 5 T 4 結合ドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記 4-1 B B 結合ドメインは、(i) H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域 (V H) と、(ii) L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V L) と、を含み、(a) 前記 H C D R 1 は配列番号 2 のアミノ酸配列を含み；(b) 前記 H C D R 2 は配列番号 4 のアミノ酸配列を含み；(c) 前記 H C D R 3 は配列番号 6 のアミノ酸配列を含み；(d) 前記 L C D R 1 は配列番号
50

8のアミノ酸配列を含み；（e）前記LCDR2は配列番号10のアミノ酸配列を含み；（f）前記LCDR3は配列番号12のアミノ酸配列を含む、前記多特異性ポリペプチドを提供する。特定の実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記4-1BB結合ドメインは、配列番号14に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、前記4-1BB結合ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記4-1BB結合ドメインは、配列番号16に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、前記4-1BB結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記4-1BB結合ドメインは、配列番号14に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号16に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの態様において、4-1BB結合ドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

【0019】

本開示はさらに、ヒト5T4に特異的に結合する5T4結合ドメインと4-1BB結合ドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記4-1BB結合ドメインは、（i）HC DR1、HC DR2、およびHC DR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域（V_H）と；（ii）LC DR1、LC DR2、およびLC DR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域（V_L）と、を含み、前記4-1BB結合ドメインの前記V_H領域および／または前記V_L領域は、フレームワーク領域に1または複数の変異を含んでおり、前記4-1BB結合ドメインは、（a）配列番号18のアミノ酸配列を含むHC DR1と；（b）配列番号4のアミノ酸配列を含むHC DR2と；（c）配列番号6のアミノ酸配列を含むHC DR3と；（d）配列番号8のアミノ酸配列を含むLC DR1と；（e）配列番号10のアミノ酸配列を含むLC DR2と；（f）配列番号12のアミノ酸配列を含むLC DR3と、を含む、前記多特異性ポリペプチドを包含する。特定の実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記4-1BB結合ドメインは、配列番号20に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、前記4-1BB結合ドメインは、配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記4-1BB結合ドメインは、配列番号22に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、前記4-1BB結合ドメインは、配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記4-1BB結合ドメインは、配列番号20に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号22に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB結合ドメインは、配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

【0020】

本開示はまた、ヒト5T4に特異的に結合する5T4結合ドメインと4-1BB結合ドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記4-1BB結合ドメインが、（i）HC DR1、HC DR2、およびHC DR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域（V_H）と；（ii）LC DR1、LC DR2、およびLC DR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域（V_L）と、を含み、前記4-1BB結合ドメインの前記V_H領域および／または前記V_L領域は、フレームワーク領域に1または複数の変異を含んでおり、前記4-1BB結合ドメインは、（a）配列番号24のアミノ酸配列を含むHC DR1と；（b）配列番

号4のアミノ酸配列を含むHCDR2と；(c)配列番号6のアミノ酸配列を含むHCDR3と；(d)配列番号8のアミノ酸配列を含むLCDR1と；(e)配列番号10のアミノ酸配列を含むLCDR2と；(f)配列番号12のアミノ酸配列を含むLCDR3と、を含む、前記多特異性ポリペプチドを包含する。特定の実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記4-1BB結合ドメインは、配列番号26に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、前記4-1BB結合ドメインは、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記4-1BB結合ドメインは、配列番号16に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、前記4-1BB結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記4-1BB結合ドメインは、配列番号26に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号16に対し少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB結合ドメインは、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

【0021】

特定の実施形態では、本開示は、4-1BB結合ドメインを含み、前記4-1BB結合ドメインが単鎖可変領域フラグメント(scFv)である、多特異性ポリペプチドを提供する。いくつかの態様では、前記scFvの軽鎖可変領域は、前記scFvの重鎖可変領域のカルボキシ末端側である。他の態様では、前記scFvの軽鎖可変領域は、前記scFvの重鎖可変領域のアミノ末端側である。特定の態様では、前記scFvは、リンカーポリペプチドを含む。いくつかの例で、前記リンカーポリペプチドは、前記scFvの軽鎖可変領域と重鎖可変領域との間に存在する。特定の実施形態では、前記リンカーポリペプチドは、Gly₄Serリンカーを含む。いくつかの実施形態では、前記リンカーポリペプチドは、n=1~5である式(Gly₄Ser)_nを含む。いくつかの態様において、前記リンカーポリペプチドは、配列番号85~108から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、前記リンカーポリペプチドは、配列番号98に記載のアミノ酸配列(GGGGSGGGSGGGSGGGGS)を含む。特定の態様では、本開示の多特異性ポリペプチドは、結合ドメインリンカーを介して5T4結合ドメインに連結されている4-1BB結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、多特異性ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、(i)前記5T4結合ドメインと、(ii)結合ドメインリンカーと、(iii)前記4-1BB結合ドメインと、を含む。

【0022】

いくつかの実施形態では、上記の各CDR配列を含む前記4-1BB結合ドメインは、配列番号110、112、114、および116からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。特定の実施形態では、前記4-1BB結合ドメインは、配列番号110、112、114、および116からなる群から選択される配列を含む。

【0023】

特定の態様では、本開示の多特異性ポリペプチドは、薬剤または毒素と複合化した4-1BB結合ドメインを含む。

【0024】

本開示はさらに、免疫グロブリン定常領域に融合または複合化した5T4結合ドメインを含む多特異性ポリペプチドを提供する。免疫グロブリン定常領域はヒトFcドメインであってもよい。いくつかの実施形態では、前記ヒトFcドメインは、配列番号158または配列番号160に記載の配列を含む。特定の実施形態では、本開示は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、(i)5T4結合ドメインと、(ii)ヒンジ領域と、(

i i i) 免疫グロブリン定常領域と、(i v) 結合ドメインリンカーと、(v) 4-1 B B 結合ドメインと、を含む、多特異性ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、前記結合ドメインリンカーは、G l y₄ S e r 配列を含む。いくつかの例で、前記結合ドメインリンカーは、n = 1 ~ 5 である式 (G l y₄ S e r)_n を含む。いくつかの態様において、前記結合ドメインリンカーは、配列番号 85 ~ 108 から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、前記結合ドメインリンカーは、配列番号 107 に記載のアミノ酸配列 (S G G G G S G G G G S G G G G S P S) を含む。

【0025】

いくつかの態様において、本開示はまた、第一 s c F v ドメインと第二 s c F v ドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記第一 s c F v ドメインおよび第二 s c F v ドメインは結合ドメインリンカー、または結合ドメインリンカーおよび免疫グロブリン F c ドメインによって連結されており、前記免疫グロブリン F c ドメインはヒンジ領域と免疫グロブリン定常領域とを含み；前記第二 s c F v ドメインは、ヒト 4-1 B B に特異的に結合し、(i) 配列番号 2、18、24 からなる群から選択される H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 4 の H C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 6 の H C D R 3 アミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；(i i) 配列番号 8 の L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 10 の L C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 12 の L C D R 3 アミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と、を含み、前記第一 s c F v ドメインおよび第二 s c F v ドメインは結合ドメインリンカーによってまたは結合ドメインリンカーおよび免疫グロブリン F c ドメインによって結合しており、前記免疫グロブリン F c ドメインはヒンジ領域と免疫グロブリン定常領域とを含む、前記多特異性ポリペプチドを提供する。特定の実施形態では、このポリペプチドは、配列番号 136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、および 156 からなる群から選択される配列に対し少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、前記ポリペプチドは、配列番号 136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、および 156 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドは、配列番号 136、138、および 146 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0026】

いくつかの実施形態では、前記多特異性ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、(i) 前記第一 s c F v ドメインと、(i i) 結合ドメインリンカーと、(i i i) 前記第二結合ドメインと、を含む。他の実施形態では、前記多特異性ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、(i) 前記第二 s c F v ドメインと、(i i) 結合ドメインリンカーと、(i i i) 前記第一 s c F v ドメインと、を含む。特定の態様では、前記多特異性ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、(i) 前記第一 s c F v ドメインと、(i i) ヒンジ領域と、(i i i) 免疫グロブリン定常領域と、(i v) 結合ドメインリンカーと、(v) 前記第二 s c F v ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、前記結合ドメインリンカーは、G l y₄ S e r 配列を含む。いくつかの実施形態では、前記結合ドメインリンカーは、n = 1 ~ 5 である式 (G l y₄ S e r)_n を含む。特定の態様では、前記結合ドメインリンカーは、配列番号 85 ~ 108 から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、前記結合ドメインリンカーは、配列番号 107 に記載のアミノ酸配列 (S G G G G S G G G G S G G G G S P S) を含む。いくつかの実施形態では、多特異性ポリペプチドの第二 s c F v ドメインは、(a) 配列番号 2 に記載の H C D R 1 アミノ酸配列と；(b) 配列番号 4 に記載の H C D R 2 アミノ酸配列と；(c) 配列番号 6 に記載の H C D R 3 アミノ酸配列と；(d) 配列番号 8 に記載の L C D R 1 アミノ酸配列と；(e) 配列番号 10 に記載の L C D R 2 アミノ酸配列と；(f) 配列番号 12 に記載の L C D R 3 アミノ酸配列と、を含む。他の実施形態では、多特異性ポリペプチドの第二 s c F v ドメインは、(a) 配列番号 24 に記載の H C D R 1 アミノ酸配列と；(b) 配列番号 4 に記載の H C D R 2 アミノ酸

10

20

30

40

50

配列と；（c）配列番号6に記載のHCDR3アミノ酸配列と；（d）配列番号8に記載のLCDR1アミノ酸配列と；（e）配列番号10に記載のLCDR2アミノ酸配列と；（f）配列番号12に記載のLCDR3アミノ酸配列と、を含む。いくつかの実施形態では、多特異性ポリペプチドの第二scFvドメインは、配列番号14のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号16の軽鎖可変領域と、を含む。他の実施形態では、多特異性ポリペプチドの第二scFvドメインは、配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号22の軽鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態では、多特異性ポリペプチドの第二scFvドメインは、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号16の軽鎖可変領域と、を含む。他の実施形態では、多特異性ポリペプチドの第二scFvドメインは、配列番号28のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号16の軽鎖可変領域と、を含む。

10

【0027】

本開示はさらに、第一scFvドメインと第二scFvドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記第一scFvドメインおよび第二scFvドメインは結合ドメインリンカー、または結合ドメインリンカーおよび免疫グロブリンFcドメインによって連結されており、前記免疫グロブリンFcドメインはヒンジ領域と免疫グロブリン定常領域とを含み；前記第二scFvドメインはヒト4-1BBに特異的に結合し；前記第一scFvドメインは、（i）配列番号30、52、および60からなる群から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号32および62からなる群から選択されるHCDR2アミノ酸配列、および配列番号34のHCDR3アミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；（ii）配列番号8、42、および54からなる群から選択されるLCDR1アミノ酸配列、配列番号10のLCDR2アミノ酸配列、および配列番号36のLCDR3アミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と、を含み；前記第二scFvドメインは、（i）配列番号2、18、24からなる群から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号4のHCDR2アミノ酸配列、および配列番号6のHCDR3アミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；（ii）配列番号8のLCDR1アミノ酸配列、配列番号10のLCDR2アミノ酸配列、および配列番号12のLCDR3アミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と、を含み、前記第一scFvドメインおよび第二scFvドメインは結合ドメインリンカーによってまたは結合ドメインリンカーおよび免疫グロブリンFcドメインによって結合しており、前記免疫グロブリンFcドメインはヒンジ領域と免疫グロブリン定常領域とを含む、前記多特異性ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、第二scFvドメインは、（a）配列番号2に記載のHCDR1アミノ酸配列と；（b）配列番号4に記載のHCDR2アミノ酸配列と；（c）配列番号6に記載のHCDR3アミノ酸配列と；（d）配列番号8に記載のLCDR1アミノ酸配列と；（e）配列番号10に記載のLCDR2アミノ酸配列と；（f）配列番号12に記載のLCDR3アミノ酸配列と、を含む。特定の実施形態では、第一scFvドメインは、（a）配列番号30に記載のHCDR1アミノ酸配列と；（b）配列番号32に記載のHCDR2アミノ酸配列と；（c）配列番号34に記載のHCDR3アミノ酸配列と；（d）配列番号8に記載のLCDR1アミノ酸配列と；（e）配列番号10に記載のLCDR2アミノ酸配列と；（f）配列番号36に記載のLCDR3アミノ酸配列と、を含む。いくつかの実施形態では、第一scFvドメインは、（a）配列番号30に記載のHCDR1アミノ酸配列と；（b）配列番号32に記載のHCDR2アミノ酸配列と；（c）配列番号34に記載のHCDR3アミノ酸配列と；（d）配列番号42に記載のLCDR1アミノ酸配列と；（e）配列番号10に記載のLCDR2アミノ酸配列と；（f）配列番号36に記載のLCDR3アミノ酸配列と、を含む。特定の態様では、第一scFvドメインは、（a）配列番号30に記載のHCDR1アミノ酸配列と；（b）配列番号32に記載のHCDR2アミノ酸配列と；（c）配列番号34に記載のHCDR3アミノ酸配列と；（d）配列番号42に記載のLCDR1アミノ酸配列と；（e）配列番号10に記載のLCDR2アミノ酸配列と；（f）配列番号36に記載のLCDR3アミノ酸配列と、を含む。いくつかの実施形態では、第一scFvドメインは、（a）配列番号52に記載のHCDR1アミノ酸配列と；（b）配列番号54に記載のHCDR2アミノ酸配列と；（c）配列番号56に記載のHCDR3アミノ酸配列と；（d）配列番号8に記載のLCDR1アミノ酸配列と；（e）配列番号10に記載のLCDR2アミノ酸配列と；（f）配列番号36に記載のLCDR3アミノ酸配列と、を含む。

20

30

40

50

D R 1 アミノ酸配列と； (b) 配列番号 32 に記載の H C D R 2 アミノ酸配列と； (c) 配列番号 34 に記載の H C D R 3 アミノ酸配列と； (d) 配列番号 54 に記載の L C D R 1 アミノ酸配列と； (e) 配列番号 10 に記載の L C D R 2 アミノ酸配列と； (f) 配列番号 36 に記載の L C D R 3 アミノ酸配列と、を含む。いくつかの実施形態では、第一 s c F v ドメインは、(a) 配列番号 60 に記載の H C D R 1 アミノ酸配列と； (b) 配列番号 62 に記載の H C D R 2 アミノ酸配列と； (c) 配列番号 34 に記載の H C D R 3 アミノ酸配列と； (d) 配列番号 54 に記載の L C D R 1 アミノ酸配列と； (e) 配列番号 10 に記載の L C D R 2 アミノ酸配列と； (f) 配列番号 36 に記載の L C D R 3 アミノ酸配列と、を含む。特定の実施形態では、いくつかの実施形態では、第二 s c F v ドメインは、(a) 配列番号 18 に記載の H C D R 1 アミノ酸配列と； (b) 配列番号 4 に記載の H C D R 2 アミノ酸配列と； (c) 配列番号 6 に記載の H C D R 3 アミノ酸配列と； (d) 配列番号 8 に記載の L C D R 1 アミノ酸配列と； (e) 配列番号 10 に記載の L C D R 2 アミノ酸配列と； (f) 配列番号 12 に記載の L C D R 3 アミノ酸配列と、を含む。いくつかの実施形態では、第一 s c F v ドメインは、(a) 配列番号 30 に記載の H C D R 1 アミノ酸配列と； (b) 配列番号 32 に記載の H C D R 2 アミノ酸配列と； (c) 配列番号 34 に記載の H C D R 3 アミノ酸配列と； (d) 配列番号 42 に記載の L C D R 1 アミノ酸配列と； (e) 配列番号 10 に記載の L C D R 2 アミノ酸配列と； (f) 配列番号 36 に記載の L C D R 3 アミノ酸配列と、を含む。いくつかの実施形態では、第二 s c F v ドメインは、(a) 配列番号 24 に記載の H C D R 1 アミノ酸配列と； (b) 配列番号 4 に記載の H C D R 2 アミノ酸配列と； (c) 配列番号 6 に記載の H C D R 3 アミノ酸配列と； (d) 配列番号 8 に記載の L C D R 1 アミノ酸配列と； (e) 配列番号 10 に記載の L C D R 2 アミノ酸配列と； (f) 配列番号 12 に記載の L C D R 3 アミノ酸配列と、を含む。いくつかの実施形態では、第一 s c F v ドメインは、(a) 配列番号 52 に記載の H C D R 1 アミノ酸配列と； (b) 配列番号 32 に記載の H C D R 2 アミノ酸配列と； (c) 配列番号 34 に記載の H C D R 3 アミノ酸配列と； (d) 配列番号 54 に記載の L C D R 1 アミノ酸配列と； (e) 配列番号 10 に記載の L C D R 2 アミノ酸配列と； (f) 配列番号 36 に記載の L C D R 3 アミノ酸配列と、を含む。いくつかの実施形態では、第二 s c F v ドメインは、(a) 配列番号 24 に記載の H C D R 1 アミノ酸配列と； (b) 配列番号 4 に記載の H C D R 2 アミノ酸配列と； (c) 配列番号 6 に記載の H C D R 3 アミノ酸配列と； (d) 配列番号 8 に記載の L C D R 1 アミノ酸配列と； (e) 配列番号 10 に記載の L C D R 2 アミノ酸配列と； (f) 配列番号 12 に記載の L C D R 3 アミノ酸配列と、を含み、所望により、前記第一 s c F v ドメインは、(a) 配列番号 30 に記載の H C D R 1 アミノ酸配列と； (b) 配列番号 32 に記載の H C D R 2 アミノ酸配列と； (c) 配列番号 34 に記載の H C D R 3 アミノ酸配列と； (d) 配列番号 8 に記載の L C D R 1 アミノ酸配列と； (e) 配列番号 10 に記載の L C D R 2 アミノ酸配列と； (f) 配列番号 36 に記載の L C D R 3 アミノ酸配列と、を含む。

【0028】

本開示はまた、第一 s c F v ドメインが、i) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 40 のアミノ酸を含む軽鎖可変領域と、を含み、第二 s c F v ドメインが、i i) 配列番号 14 のアミノ酸を含む重鎖可変領域と、配列番号 16 の軽鎖可変領域と、を含む、多特異性ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、前記第一 s c F v ドメインは、i) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 44 のアミノ酸を含む軽鎖可変領域と、を含み、前記第二 s c F v ドメインは、i i) 配列番号 14 のアミノ酸を含む重鎖可変領域と、配列番号 16 の軽鎖可変領域と、を含む、多特異性ポリペプチドを提供する。特定の実施形態では、前記第一 s c F v ドメインは、i) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 48 のアミノ酸を含む軽鎖可変領域と、を含み、前記第二 s c F v ドメインは、i i) 配列番号 14 のアミノ酸を含む重鎖可変領域と、配列番号 16 の軽鎖可変領域と、を含む、多特異性ポリペプチドを提供する。他の実施形態では、前記第一 s c F v ドメインは、i) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 58 のアミノ酸を含む軽鎖可変領域と、を含み

10

20

30

40

50

、前記第二 s c F v ドメインは、i i) 配列番号 14 のアミノ酸を含む重鎖可変領域と、配列番号 16 の軽鎖可変領域と、を含む、多特異性ポリペプチドを提供する。特定の実施形態では、前記第一 s c F v ドメインは、i) 配列番号 64 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 58 のアミノ酸を含む軽鎖可変領域と、を含み、前記第二 s c F v ドメインは、i i) 配列番号 14 のアミノ酸を含む重鎖可変領域と、配列番号 16 の軽鎖可変領域と、を含む、多特異性ポリペプチドを提供する。他の実施形態では、前記第一 s c F v ドメインは、i) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 50 のアミノ酸を含む軽鎖可変領域と、を含み、前記第二 s c F v ドメインは、i i) 配列番号 20 のアミノ酸を含む重鎖可変領域と、配列番号 22 の軽鎖可変領域と、を含む、多特異性ポリペプチドを提供する。さらに他の実施形態では、前記第一 s c F v ドメインは、i) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 58 のアミノ酸を含む軽鎖可変領域と、を含み、前記第二 s c F v ドメインは、i i) 配列番号 26 のアミノ酸を含む重鎖可変領域と、配列番号 16 の軽鎖可変領域と、を含む、多特異性ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、前記第一 s c F v ドメインは、i) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 68 のアミノ酸を含む軽鎖可変領域と、を含み、前記第二 s c F v ドメインは、i i) 配列番号 28 のアミノ酸を含む重鎖可変領域と、配列番号 16 の軽鎖可変領域と、を含む、多特異性ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、前記第一 s c F v ドメインは、i) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 70 のアミノ酸を含む軽鎖可変領域と、を含み、前記第二 s c F v ドメインは、i i) 配列番号 28 のアミノ酸を含む重鎖可変領域と、配列番号 16 の軽鎖可変領域と、を含む、多特異性ポリペプチドを提供する。

【0029】

いくつかの実施形態において、本開示はまた、第一 s c F v ドメインと第二 s c F v ドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記第一 s c F v ドメインおよび第二 s c F v ドメインは結合ドメインリンカー、または結合ドメインリンカーおよび免疫グロブリン F c ドメインによって連結されており、前記免疫グロブリン F c ドメインはヒンジ領域と免疫グロブリン定常領域とを含み；前記第一 s c F v ドメインは、ヒト 5 T 4 に特異的に結合し、(i) 配列番号 30 の H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 32 の H C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 34 の H C D R 3 アミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；(i i) 配列番号 42 の L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 10 の L C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 36 の L C D R 3 アミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と、を含む、前記多特異性ポリペプチドを提供する。

【0030】

いくつかの実施形態では、前記第一 s c F v ドメインは、i) 配列番号 38 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 44 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むか；または、i i) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 48 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むか；または、i i i) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 50 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

【0031】

いくつかの実施形態では、本開示は、第一 s c F v ドメインと第二 s c F v ドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記第一 s c F v ドメインおよび第二 s c F v ドメインは結合ドメインリンカー、または結合ドメインリンカーおよび免疫グロブリン F c ドメインによって連結されており、前記免疫グロブリン F c ドメインはヒンジ領域と免疫グロブリン定常領域とを含み；前記第一 s c F v ドメインはヒト 5 T 4 に特異的に結合し、前記第二 s c F v ドメインの前記 V H 領域および／または前記 V L 領域は、フレームワーク領域に 1 または複数の変異を含んでおり；前記第一 s c F v ドメインは、(a) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む H C D R 1 と；(b) 配列番号 32 のアミノ酸配列を含む H C D R 2 と；(c) 配列番号 34 のアミノ酸配列を含む H C D R 3 と；(d) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む L C D R 1 と；(e) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む L C

DR2と；(f) 配列番号36のアミノ酸配列を含むLCDR3と、を含む、前記多特異性ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、前記第一scFvドメインは、(i) 配列番号38のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号44のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むか；または、(ii) 配列番号46のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号48のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含むか；または、(iii) 配列番号46のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号50のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

【0032】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の前記多特異性ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、(i) 前記第一scFvドメインと、(ii) 結合ドメインリンカーと、(iii) 前記第二結合ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、前記多特異性ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、(i) 前記第二scFvドメインと、(ii) 結合ドメインリンカーと、(iii) 前記第一scFvドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、前記多特異性ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、(i) 前記第一scFvドメインと、(ii) ヒンジ領域と、(iii) 免疫グロブリン定常領域と、(iv) 結合ドメインリンカーと、(v) 前記第二scFvドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、前記結合ドメインリンカーは、Gly₄Ser配列を含む。いくつかの実施形態では、前記結合ドメインリンカーは、n=1~5である式(Gly₄Ser)_nを含む。いくつかの実施形態において、前記結合ドメインリンカーは、配列番号85~108から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記結合ドメインリンカーは、配列番号107に記載のアミノ酸配列(SGGGSGGGGSGGGGSPS)を含む。

【0033】

特定の態様では、本開示の多特異性ポリペプチドの前記第一scFvドメインは、ヒト5T4に特異的に結合し、配列番号118、120、122、124、126、128、130、132、134、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；前記第二scFvドメインは、ヒト4-1BBに特異的に結合し、配列番号110、112、114、および116からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記第一scFvドメインは配列番号118に記載のアミノ酸配列を含み、前記第二scFvドメインは配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記第一scFvドメインは配列番号120に記載のアミノ酸配列を含み、前記第二scFvドメインは配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、前記第一scFvドメインは配列番号122に記載のアミノ酸配列を含み、前記第二scFvドメインは配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記第一scFvドメインは配列番号124に記載のアミノ酸配列を含み、前記第二scFvドメインは配列番号112に記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記第一scFvドメインは配列番号126に記載のアミノ酸配列を含み、前記第二scFvドメインは配列番号114に記載のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記第一scFvドメインは配列番号126に記載のアミノ酸配列を含み、前記第二scFvドメインは配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、前記第一scFvドメインは配列番号128に記載のアミノ酸配列を含み、前記第二scFvドメインは配列番号110に記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記第一scFvドメインは配列番号170に記載のアミノ酸配列を含み、前記第二scFvドメインは配列番号116に記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記第一scFvドメインは配列番号130に記載のアミノ酸配列を含み、前記第二scFvドメインは配列番号116に記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記第一scFvドメインは配列番号132に記載のアミノ酸配列を含み、前記第二scFvドメインは配列番号116に記載のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、前記第一scFvドメインは配列番号134に記載のアミノ酸配列を含み、前記第二scFvドメインは配列番号116に記載のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示は、配列

10

20

30

40

50

番号136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、172、174、および176からなる群から選択される配列に対し少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、多特異性ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドは、配列番号136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、172、174、および176からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0034】

いくつかの実施形態では、本開示は、5T4および4-1BBに特異的に結合し、配列番号136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、172、174、および176からなる群から選択される配列に対し少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、多特異性ポリペプチドを提供する。特定の実施形態では、5T4および4-1BBに特異的に結合する前記ポリペプチドは、配列番号136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、172、174、および176からなる群から選択される配列に対し少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、前記ポリペプチドは、上記のそれぞれの配列番号と同じCDRアミノ酸配列を含むか、または、前記ポリペプチドは、上記のそれぞれの配列番号との比較でただ1つのアミノ酸だけ異なるCDRアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドは、配列番号136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、172、174、および176からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0035】

本開示はさらに、第一s c F vドメインが5T4の細胞外ドメインに結合し、第二s c F vドメインが4-1BBの細胞外ドメインに結合する、多特異性ポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、前記ポリペプチドは、エフェクター細胞の活性化をもたらす。いくつかの態様において、本開示の多特異性ポリペプチドは、エフェクター細胞の活性化および／またはエフェクター細胞の増殖を増大させる。他の態様において、多特異性ポリペプチドは、エフェクター細胞依存性の、5T4発現細胞の溶解を増強する。いくつかの実施形態において、本開示の5T4結合ドメインは、50nM未満のkD値で5T4と結合できる。いくつかの態様において、5T4結合ドメインおよび／または4-1BB結合ドメインの軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域はヒト型化されている。

【0036】

いくつかの実施形態では、本開示は、結合ドメインリンカーおよび免疫グロブリンFcドメインによって連結された第一単鎖可変領域フラグメント(s c F v)ドメインと第二s c F vドメインとを含む多特異性ポリペプチドであって、前記免疫グロブリンFcドメインはヒンジ領域と免疫グロブリン定常領域とを含み；前記多特異性ポリペプチドは第二の同一の多特異性ポリペプチドとの結合によるホモ二量体の形成が可能であり；前記第一s c F vドメインは、ヒト5T4に特異的に結合し、(i)配列番号30の重鎖相補性決定領域(HCDR) - 1アミノ酸配列、配列番号32のHCDR2アミノ酸配列、および配列番号34のHCDR3アミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；(ii)配列番号42の軽鎖相補性決定領域(LCDR) - 1アミノ酸配列、配列番号10のLCDR2アミノ酸配列、および配列番号36のLCDR3アミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と、を含み；前記第二s c F vドメインは、ヒト4-1BBに特異的に結合し、(i)配列番号2のHCDR1アミノ酸配列、配列番号4のHCDR2アミノ酸配列、および配列番号6のHCDR3アミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と；(ii)配列番号8のLCDR1アミノ酸配列、配列番号10のLCDR2アミノ酸配列、および配列番号12.2のLCDR3アミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と、を含む、前記多特異性ポリペプチドを提供する。アミノ末端からカルボキシル末端に

向かって、(i) 前記第一 s c F v ドメインと、(i i) 前記ヒンジ領域と、(i i i) 前記免疫グロブリン定常領域と、(i v) 前記結合ドメインリンカーと、(v) 前記第二 s c F v ドメインと、を含む、請求項 1 に記載の多特異性ポリペプチド。いくつかの実施形態では、前記第一 s c F v ドメインは、配列番号 130 または 170 のフレームワーク領域との比較で、フレームワーク領域に変異を含む。いくつかの実施形態では、前記変異はジスルフィド結合の安定化をもたらす。

【0037】

いくつかの実施形態では、多特異性ポリペプチドの前記第一 s c F v ドメインは、配列番号 38 の前記免疫グロブリン重鎖可変領域と配列番号 44 の前記免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施形態では、多特異性ポリペプチドの前記第一 s c F v ドメインは、配列番号 46 の前記免疫グロブリン重鎖可変領域と配列番号 48 の前記免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施形態では、多特異性ポリペプチドの前記第二 s c F v ドメインは、配列番号 14 の免疫グロブリン重鎖可変領域と配列番号 16 の前記免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施形態では、前記多特異性ポリペプチドの前記第一 s c F v ドメインは、配列番号 46 の前記免疫グロブリン重鎖可変領域と配列番号 48 の前記免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含み、前記第二 s c F v ドメインは、配列番号 14 の前記免疫グロブリン重鎖可変領域と配列番号 16 の前記免疫グロブリン軽鎖可変領域とを含む。いくつかの実施形態では、前記第一 s c F v ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 120 と少なくとも 97% 同一であり、前記第二 s c F v ドメインのアミノ酸配列は配列番号 110 と少なくとも 97% 同一である。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドは、配列番号 172 と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含むか、または、配列番号 172 と同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、前記第一 s c F v ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 122 と少なくとも 97% 同一であり、前記第二 s c F v ドメインのアミノ酸配列は配列番号 110 と少なくとも 97% 同一である。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドは、配列番号 174 と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含むか、または、配列番号 174 のアミノ酸配列を含む。

【0038】

いくつかの実施形態では、前記多特異性ポリペプチドがエフェクター細胞に結合することで、エフェクター細胞の活性化の増大、エフェクター細胞の増殖の増大、がもたらされ、または、前記多特異性ポリペプチドがエフェクター細胞、5 T 4 発現細胞に結合することで、エフェクター細胞依存性の 5 T 4 発現細胞の溶解の増強がもたらされる。

【0039】

本開示はまた、それぞれが本開示に記載の多特異性ポリペプチドである、2つの同一のポリペプチドを含む二量体を包含する。

【0040】

特定の態様では、本開示は、本開示に記載のポリペプチドまたはタンパク質と、薬剤的に許容できる担体、希釈剤、または賦形剤と、を含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、経口投与用単位剤形、静脈内投与用単位剤形、鼻腔内投与用単位剤形、坐剤用単位剤形、皮内投与用単位剤形、筋肉内投与用単位剤形、腹腔内投与用単位剤形、皮下投与用単位剤形、硬膜外投与用単位剤形、舌下投与用単位剤形、および脳内投与用単位剤形からなる群から選択される剤形の医薬組成物が製剤化され得る。経口投与用単位剤形の例としては、錠剤、丸剤、ペレット剤、カプセル剤、散剤、菓子錠剤、粒剤、水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤、徐放性製剤、エアゾール剤、および噴霧剤が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0041】

本開示はさらに、5 T 4 を発現する細胞に対するエフェクター細胞の活性化を増強するための方法であって、前記 5 T 4 発現細胞を本開示のポリペプチドまたはタンパク質と接触させることを含み、前記接触が前記 5 T 4 発現細胞に対するエフェクター細胞の活性化の増強が誘導される条件下で行われる、前記方法を包含する。いくつかの態様において、本開示は、対象の 5 T 4 の発現を特徴とする障害を治療するための方法であって、前記対

10

20

30

40

50

象に治療有効量の本開示のポリペプチドまたはタンパク質または医薬組成物を投与することを含む、前記方法を提供する。本開示はまた、対象の5 T 4の発現を特徴とする障害を治療するための医薬の製造における本開示のポリペプチドまたはタンパク質の使用を包含する。いくつかの実施形態では、本開示は、対象の5 T 4の発現を特徴とする障害の治療に使用される、本開示のポリペプチドまたはタンパク質に関する。いくつかの実施形態では、前記障害はがんである。特定の態様では、前記がんは、乳がん、膵がん、卵巣がん、非小細胞肺癌、中皮腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、マンツル細胞白血病（mantle cell leukemia）（MCL）、急性リンパ芽球白血病（ALL）、扁平上皮癌、メラノーマ、副腎がん、膀胱がん、子宮頸がん、腎がん、胃がん、前立腺がん、甲状腺がん、肝臓がん、子宮がん、神経線維腫、肉腫、または頭頸部がんである。

10

【0042】

いくつかの実施形態では、上記の方法で使用される多特異性ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、（i）第一s c F vドメインと、（i i）ヒンジ領域と、（i i i）免疫グロブリン定常領域と、（i v）結合ドメインリンカーと、（v）第二s c F vドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、上記の方法で使用される多特異性ポリペプチドは、配列番号14の免疫グロブリン重鎖可変領域および配列番号16の免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む第二s c F vドメインと、（i）配列番号38の免疫グロブリン重鎖可変領域および配列番号44の免疫グロブリン軽鎖可変領域；または（i i）配列番号46の免疫グロブリン重鎖可変領域および配列番号48の免疫グロブリン軽鎖可変領域、を含む第一s c F vドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、前記多特異性ポリペプチドの前記第二s c F vドメインのアミノ酸配列は、配列番号110と少なくとも97%同一であり、前記多特異性ポリペプチドの前記第一s c F vドメインのアミノ酸配列は、配列番号120（209の場合、抗5 T 4 s c F v）または配列番号122と少なくとも97%同一である。いくつかの実施形態では、配列番号28を含む重鎖可変領域（variable heavy chain）および配列番号16を含む軽鎖可変領域（variable light chain）を含む抗4-1BB抗体と、配列番号46を含む重鎖可変領域および配列番号66を含む軽鎖可変領域を含む抗5 T 4 s c F vと、を含むI g G-s c F v構造体である第二の多特異性ポリペプチドと比較した場合に、前記ポリペプチドは、エフェクター細胞の活性化の統計的に有意な増強を示す。いくつかの実施形態では、配列番号28を含む重鎖可変領域および配列番号16を含む軽鎖可変領域を含む抗4-1BB抗体と、配列番号46を含む重鎖可変領域および配列番号66を含む軽鎖可変領域を含む抗5 T 4 s c F vと、を含むI g G-s c F v構造体である第二の多特異性ポリペプチドと比較した場合に、前記ポリペプチドは、エフェクター細胞増殖の統計的に有意な増加を誘導する。

20

30

【0043】

本開示のいくつかの態様は、本開示のポリペプチドをコードする単離された核酸分子を包含する。いくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、171、173、および175からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。本開示は、本明細書に記載の単離された核酸分子を含む発現ベクターを包含する。いくつかの実施形態では、前記発現ベクター内核酸分子は、宿主細胞における前記核酸セグメントの発現に好適な制御配列に作動可能のように連結されている。本開示は、本明細書に記載の発現ベクターを含む組換え宿主細胞を提供する。いくつかの態様において、本開示は、5 T 4結合ドメインを含むポリペプチドを製造するための方法であって、本明細書に記載の発現ベクターを含む組換え宿主細胞を、核酸セグメントが発現される条件下で培養することで、前記5 T 4結合ドメインを含むポリペプチドを産生させることを含む、前記方法を提供する。

40

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】5 T 4（+）細胞の存在下における、7種類のコンストラクト（ALG．APV

50

－004、ALG. APV-006、ALG. APV-099、ALG. APV-127、ALG. APV-148、およびALG. APV-150)の、作動薬としての機能を示している。

【0045】

【図2】7種類のscFv-Fc-scFv分子(ALG. APV-006、ALG. APV-178、ALG. APV-179、ALG. APV-187、ALG. APV-191、ALG. APV-196、およびALG. APV-198)の、ヒト4-1BBを発現するCHO-K1細胞株に対する結合曲線を示している。

【0046】

【図3】7種類のscFv-Fc-scFv分子(ALG. APV-006、ALG. APV-178、ALG. APV-179、ALG. APV-187、ALG. APV-191、ALG. APV-196、およびALG. APV-198)の、カニクイザル4-1BBを発現するCHO-K1細胞株に対する結合曲線を示している。

【0047】

【図4】7種類のscFv-Fc-scFv分子(ALG. APV-006、ALG. APV-178、ALG. APV-179、ALG. APV-187、ALG. APV-191、ALG. APV-196、およびALG. APV-198)の、ヒト5T4を発現するCHO-K1細胞株に対する結合曲線を示している。

【0048】

【図5】CHO-K1細胞株およびSKOV-3細胞株におけるヒト5T4の発現レベルを示している。

【0049】

【図6】コンストラクトALG. APV-006、ALG. APV-178、ALG. APV-179、ALG. APV-187、ALG. APV-196、およびALG. APV-198の、SKOV-3細胞に対する結合曲線を示している。

【0050】

【図7】ALG. APV-006、ALG. APV-178、ALG. APV-179、ALG. APV-187、ALG. APV-191、ALG. APV-196、およびALG. APV-198の、カニクイザル5T4を発現するCHO-K1細胞株に対する結合曲線を示している。

【0051】

【図8】抗5T4×抗4-1BBコンストラクトの、4-1BBレポーターアッセイにおける活性を示している。

【0052】

【図9】抗5T4×抗4-1BBコンストラクトの、PBMCおよびCHO-K1の共培養物からのIFN γ 放出に対する影響を示している。

【0053】

【図10】scFv-Fc-scFvフォーマット(ADAPTIR(商標)フォーマット)のタンパク質の例示的な実施形態を図示している。

【0054】

【図11】図11A～図11Bは、二重特異性scFv-Fc-scFvコンストラクトと共に培養されたヒトCD8+T細胞における、インターフェロン γ (IFN γ)応答を示している。図11Aは、5T4-Fc抗原で被覆されたプレート内で培養した場合のT細胞の応答を示している。図11Bは、5T4-Fc抗原なしで培養された場合のT細胞応答を示している。図11は2人のドナーからの平均値を示している。

【0055】

【図12】ALG. APV-004、ALG. APV-178、ALG. APV-179、ALG. APV-187、ALG. APV-208、ALG. APV-209、およびALG. APV-210の、ヒトCD137発現CHO-K1細胞株に対する結合曲線を示している。

10

20

30

40

50

【0056】

【図13】ALG. APV-004、ALG. APV-178、ALG. APV-179、ALG. APV-187、ALG. APV-208、ALG. APV-209、およびALG. APV-210の、ヒト5T4発現マウスCT26細胞(ATCC)に対する結合曲線を示している。

【0057】

【図14】ALG. APV-004、ALG. APV-178、ALG. APV-179、ALG. APV-187、ALG. APV-208、ALG. APV-209、およびALG. APV-210の、カニクイザル5T4トランスフェクトCHO-K1に対する結合曲線を示している。

10

【0058】

【図15】ALG. APV-004、ALG. APV-178、ALG. APV-179、ALG. APV-187、ALG. APV-208、ALG. APV-209、およびALG. APV-210の、CD137も5T4もどちらも発現しないヒト細胞株(MOLM13細胞、ATCC)に対する結合曲線を示している。

【0059】

【図16】5T4(+)細胞(HCC1143)または5T4(-)細胞(MOLM13)の存在下で5時間インキュベートした後の、NF- κ Bレポーター発現Jurkat細胞における、二重特異性コンストラクトの活性を示している。曲線上の全ての点は2連ウェルの平均を表す。Y軸は相対蛍光単位(RLU)の値を示す。

20

【0060】

【図17】ALG. APV-178、ALG. APV-179、ALG. APV-187、ALG. APV-208、ALG. APV-209、ALG. APV-210、およびMorrison型対照コンストラクトのALG. APV-004により、72の時点で初代PBMC培養物において誘導された、IFN- γ のレベルを示している。曲線上の全ての点は2連ウェルの平均を表す。

【0061】

【図18】図18A～図18Bは、二重特異性コンストラクトであるALG. APV-209、ALG. APV-210、およびALG. APV-004の、抗原発現腫瘍への5T4依存的な局在の、FACS解析を示している。局在は、抗ヒトFc抗体(図18A)またはビオチン化4-1BB(図18B)を用いた染色により検出した。

30

【0062】

【図19】図19A～図19Bは、二重特異性コンストラクトであるALG. APV-209、ALG. APV-210、およびALG. APV-004の、5T4+腫瘍(図19A)および5T4-腫瘍(図19B)に対する5T4依存的な局在の、免疫組織学的解析を示している。

【0063】

【図20】異なるレベルの5T4を発現するCT26細胞の存在下で、二重特異性抗体ALG. APV-210と共に培養されたヒトCD8⁺T細胞の、IFN γ 応答を示している。

40

【0064】

【図21】図21A～図21Bは、異なるレベルの5T4を発現するCT26細胞の存在下で、二重特異性抗体ALG. APV-210と共に培養されたヒトCD8⁺T細胞の、最大IFN γ 放出を示している。

【0065】

【図22】図22A～図22Cは、CD3で刺激された、または未刺激の、ヒトPBMCおよびカニクイザルPBMCからゲーティングされた一次CD8⁺T細胞に対する、ALG. APV-210またはANC107(アイソタイプ対照)の結合を示している。図22Aおよび図22Bは、2つの独立した実験からの平均蛍光強度(MFI)(および平均値の標準誤差(SEM))を示している。図22Cは、2つの独立した実験から得られた

50

、ALG・APV-210についての、正規化されたプールデータを示している。n = 3 ドナー／群／実験。

【0066】

【図23】図23A～図23Cは、CD3で刺激された、または未刺激の、ヒトPBMC およびカニクイザルPBMCからゲーティングされた初代CD8 T細胞に対する、ALG・APV-210またはANC107（アイソタイプ対照）の結合を示している。図23Aおよび図23Bは、2つの独立した実験から得られた、CD8 T細胞に結合しているALG・APV-210の割合およびSEMを示している。図23Cは、実験1および実験2から得られた正規化されたプールデータを示している。n = 3 ドナー／群／実験。

【0067】

【図24】ヒトCD8 T細胞に対するALG・APV-210の作動薬的な働きを示している。

【0068】

【図25】図25A～図25Bは、個々の代表的なドナーから得られた、ヒトCD8 T細胞に対するALG・APV-210の作動薬的な働きを示している。

【0069】

【図26】カニクイザルCD8 T細胞に対するALG・APV-210の作動薬的な働きを示している。

【0070】

【図27】図27A～図27Cは、個々の代表的なドナーから得られた、カニクイザルCD8 T細胞に対するALG・APV-210の作動薬的な働きを示している。これらの図は、5T4-Fcの存在下でALG・APV-210で活性化されたカニクイザルCD8 T細胞による、用量反応に基づくIFN γ 産生を示している。

【0071】

【図28】5T4陽性ヒト結腸癌であるHCT-116の異種移植片腫瘍のSCIDベージュマウスモデルにおける、二重特異性抗体ALG・APV-210の抗腫瘍活性を示している。

【0072】

【図29】ALG・APV-210またはALG・APV-209のPK解析を示している。

【0073】

【図30】図30A～図30Bは、ALG・APV-210のFc部分の、Fc γ Rへの結合性を示している。漸増量の(titrated)ALG・APV-210をFc γ R-発現細胞と共にインキュベートし、蛍光標識抗ヒトIgG二次抗体でプローブした(図30A)。ヒトIgG1分子を陽性対照として用いた(図30B)。

【0074】

【図31】図31A～図31Bは、ヒト5T4を発現しているCHO-K1細胞および抗CD3抗体の存在下、二重特異性分子のALG・APV-209およびALG・APV-210によって誘導されたCD8+T細胞およびCD4+T細胞の増殖を示している。

【0075】

【図32】図32A～図32Bは、2人の異なるヒトPBMCドナー(AおよびB)由来のPBMC全培養物における、二重特異性分子ALG・APV-210によるIFN- γ 分泌の誘導を示している。

【0076】

【図33】図33A～図33Bは、2人の異なるヒトPBMCドナー由来のPBMC全培養物における、二重特異性分子ALG・APV-210によって誘導されたCD8+T細胞の増殖を示している。

【0077】

【図34】ALG・APV-210の5T4発現細胞株への結合性を示している。

【0078】

10

20

30

40

50

【図35】ある密度範囲で5T4表面タンパク質を発現している細胞の存在下でインキュベートした後の、NF-κBレポーター発現Jurkat細胞における二重特異性コンストラクトALG-APV-210の作動薬的な働きを示している。

【0079】

【図36】5T4発現ヒトHCT116細胞の存在下、二重特異性抗体ALG-APV-210と共に培養されたヒトCD8+T細胞のIFNγ応答を示している。

【0080】

【図37】5T4発現ヒトHCT116細胞の存在下、二重特異性抗体ALG-APV-210と共に培養されたヒトCD8+T細胞のIFNγ応答を示している。

【0081】

【図38】ヒト5T4発現HCT116細胞の存在下、二重特異性抗体ALG-APV-210と共に培養されたヒトCD8+T細胞の最大IFNγ放出を示している。

【0082】

【図39】図39A～図39Dは、5T4を発現しているヒト腫瘍細胞またはトランスフェクト細胞株に対するALG-APV-210の結合を示している。

【0083】

【図40】図40A～図40Dは、5T4を発現しているヒト腫瘍細胞またはトランスフェクト細胞株に対するALG-APV-210の結合を示す実験の、正規化されたMFIを示している。

【発明を実施するための形態】

【0084】

本開示は、トロホブラスト糖タンパク質 (trophoblast glycoprotein) (5T4) に特異的に結合する結合ドメインを含むポリペプチド、および5T4に特異的に結合するポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドは、5T4および別の標的に特異的に結合し得る多特異性ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、5T4に特異的に結合し、エフェクター細胞上の標的にも特異的に結合する、多特異性ポリペプチドである。本開示はまた、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9 (tumor necrosis factor receptor superfamily member 9) (41BBまたはCD137) に特異的に結合する結合ドメインを含むポリペプチド、および4-1BBに特異的に結合するポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドは、4-1BBおよび別の標的 (例えば、腫瘍関連抗原) に特異的に結合し得る多特異性ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、4-1BBに特異的に結合し、標的細胞上の標的にも特異的に結合する、多特異性ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、前記多特異性ポリペプチドは、5T4に特異的に結合し、且つ4-1BBに特異的に結合する、二重特異性ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、前記二重特異性ポリペプチドは、標的細胞上に発現された5T4とエフェクター細胞上に発現された4-1BBとに結合することで、エフェクター細胞の活性化を増幅し、標的細胞のエフェクター細胞媒介性細胞毒性を増強する。

【0085】

いくつかの実施形態では、本開示は、従来公知の5T4結合ドメインおよび／または4-1BB結合ドメインとの比較で、非特異的な結合がより少ない、5T4結合ドメインおよび／または4-1BB結合ドメイン (並びにこのような結合ドメインを含むポリペプチドまたはタンパク質) を提供する。特定の態様では、本明細書に記載の結合ドメインおよび／または前記結合ドメインを含むポリペプチドは、ある特定の構成および／またはある特定の配向において (例えば、V_L-V_Hと比較してV_H-V_Lにおいて)、5T4および／または4-1BBにより効率的に結合することで、5T4の発現と関連した障害の治療における効力の上昇および／または有用性の向上を示す。

【0086】

いくつかの実施形態では、治療有効量の本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク

10

20

30

40

50

質のそれを必要とする患者への投与は、特定のがんをはじめとする、5 T 4 の発現と関連した特定の障害の治療に有用である。1 つの実施形態では、前記ポリペプチドまたはタンパク質は、5 T 4 を発現する標的細胞およびエフェクター細胞の両方と結合することにより、前記 5 T 4 を発現する標的細胞と前記エフェクター細胞とを「架橋結合」する。両方のドメインが各々の標的に結合することで、エフェクター細胞の活性化が増強されて、エフェクター細胞応答（例えば、エフェクター細胞媒介性細胞毒性）がより長期的且つ／またはよりロバストなものとなる。本開示のポリペプチドおよびタンパク質は患者の治療において様々な利点を提供し、例えば、5 T 4 への効果的な結合、エフェクター細胞活性の効率的な増強、サイトカイン放出レベルの減少、および／または有害事象（例えば、毒性）のリスク低減といった利点がある。いくつかの実施形態では、標的細胞は、5 T 4 を発現する非標的細胞（例えば、同じ対象、臓器、または組織の正常細胞または非がん性細胞）よりも高いレベルで 5 T 4 を発現する。他の実施形態では、標的細胞は 5 T 4 を発現するが、その一方、非標的細胞（例えば、同じ対象、臓器、または組織の正常細胞または非がん性細胞）は 5 T 4 を発現しない。

【0087】

本明細書で使用される節の見出しは構成のみを目的としており、記載された主題を限定するものと解釈されるべきではない。特許、特許出願、記事、書物、および論文を含むがこれらに限定はされない、本願で引用された全ての文献または文献の一部は、あらゆる目的でその全体が参照によって明示的に援用される。援用された文献または文献の一部のうちの 1 または複数における用語の定義が本願における当該用語の定義と食い違う場合、本願に記載された定義が優先される。しかしながら、本明細書に引用されたいずれの参考文献、記事、刊行物、特許、特許公報、および特許出願の言及も、それらが有効な先行技術を構成すること、または、それらが世界中のあらゆる国の共通一般知識の一部を形成していること、の承認でもいかなる形の示唆でもなく、またそれと解釈されるべきでもない。

【0088】

本明細書では、特に記載がない限り、あらゆる濃度範囲、パーセンテージ範囲、比の範囲、または整数範囲は、記載された範囲に含まれるあらゆる整数の値と、適切な場合には、その分数（整数の 10 分の 1 および 100 分の 1 など）と、を包含すると理解されたい。特に記載がない限り、本明細書で使用される用語「a」および「an」は、列挙された構成要素が「1 または複数」であることを指すと理解されたい。択一（例えば、「または（or）」）の使用は、択一物の一方、両方、またはそのあらゆる組み合わせを意味すると理解されたい。本明細書で使用される場合、用語「包含する（include）」および「含む（comprise）」は同義的に使用される。加えて、本明細書に記載の成分（例えば、ドメインまたは領域）および代替成分の様々な組み合わせを含むポリペプチドが、それぞれのポリペプチドが個別に記載された場合と同程度に、本願により開示されることを理解されたい。すなわち、個々のポリペプチドの特定成分の選択も、本開示の範囲内である。

【0089】

定義

本明細書で使用される場合、用語「結合ドメイン」または「結合領域」とは、抗原、リガンド、受容体、基質、または阻害物質（例えば、5 T 4 または 4-1BB）など、標的分子を特異的に認識しそれに結合することが可能な、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、ペプチド、抗体、または抗体由来の結合ドメインのドメイン、領域、部分、または部位を指す。結合ドメインの例としては、抗体、抗体様タンパク質、抗体様ドメイン、抗体重鎖可変領域、抗体軽鎖可変領域、および一本鎖抗体可変領域（例えば、ドメイン抗体、sFv、scFv、scFab）が挙げられる。特定の実施形態では、前記結合ドメインは、抗原結合部位を含むか、それからなる（抗原結合部位は、例えば、重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列、すなわち、別のフレームワーク領域（FR）（例えば、所望により 1 または複数のアミノ酸置換を含むヒト FR）内に配置された抗体由来の 3 つの軽鎖相補性決定領域（CDR）および 3 つの重鎖 CDR、から構成される）。特定の標的に特異的に結合する本開示の結合ドメインを同定するための種々の試験法が知られてお

り、例えば、ウェスタンブロット、ELISA、ファージディスプレイライブラリースクリーニング、およびBIA CORE（登録商標）による相互作用分析が挙げられる。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、標的細胞によって発現される標的抗原（例えば、5T4などの腫瘍関連抗原）に特異的に結合する結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、エフェクター細胞によって発現される標的抗原（例えば、4-1BB）に特異的に結合する結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドは、多特異性ポリペプチドであり、結合ドメインを2つ以上含む。

【0090】

結合ドメインまたは結合ドメインを含むタンパク質は、 10^5 M^{-1} 以上の親和性または K_a （すなわち、 $1/\text{M}$ を単位とする特定の結合相互作用の平衡結合定数）で標的と結合する場合、標的と「特異的に結合」するが、試験試料中に存在する他の成分とは顕著な結合を生じない。結合ドメインは「高親和性」結合ドメインおよび「低親和性」結合ドメインに分類できる。「高親和性」結合ドメインとは、少なくとも 10^7 M^{-1} 、少なくとも 10^8 M^{-1} 、少なくとも 10^9 M^{-1} 、少なくとも 10^{10} M^{-1} 、少なくとも 10^{11} M^{-1} 、少なくとも 10^{12} M^{-1} 、または少なくとも 10^{13} M^{-1} の K_a を有する結合ドメインを指す。「低親和性」結合ドメインとは、 10^7 M^{-1} 以下、 10^6 M^{-1} 以下、 10^5 M^{-1} 以下の K_a を有する結合ドメインを指す。あるいは、親和性は、 M を単位とする特定の結合相互作用の平衡解離定数（ K_d ）と定義することもできる（例えば、 $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-13}$ 、または約500 nM、約300 nM、約250 nM、約200 nM、約150 nM、約100 nM、約50 nM、約25 nM、約10 nM、もしくは約5 nM）。本開示に係る結合ドメインポリペプチドおよび一本鎖ポリペプチドの親和性は、従来技術を用いて容易に測定できる（例えば、Scatchard et al. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; および米国特許第5, 283, 173号、同第5, 468, 614号、または対応特許を参照）。

【0091】

本明細書で使用される「保存的置換」とは、当該技術分野では、1つのアミノ酸を同様の特性を有する別のアミノ酸に置換することと認識されている。保存的置換の例としては当該技術分野において周知のものである（例えば、1997年3月13日に公開されたPCT出願公報WO 97/09433号の10頁; Lehninger, Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), pp.71-77; Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY and Cell Press, Cambridge, MA (1990), p. 8）。

【0092】

本明細書で使用される場合、用語「誘導体」とは、化学的手段または生物学的手段によって、酵素を用いて、または酵素を用いずに、例えば、グリコシル化、アルキル化、アシル化、エステル形成、またはアミド形成によって、1または複数のアミノ酸残基が修飾されたペプチドを指す。

【0093】

本明細書で使用される場合、指定のポリペプチドまたはタンパク質「に由来する」ポリペプチド配列またはアミノ酸配列とは、当該ポリペプチドの起源を言及している。特定の実施形態では、前記ポリペプチドまたはアミノ酸配列は、特定の配列（「親（parent）」配列または「親（parental）」配列と称される場合もある）に由来し、且つ、前記親配列と本質的に同一のアミノ酸配列を有するか、または少なくとも10～20個のアミノ酸、少なくとも20～30個のアミノ酸、少なくとも30～50個のアミノ酸、もしくは少なくとも50～150個のアミノ酸からなるその一部を有し、あるいは、その起源が前記親配列にあると当業者が確認できる。例えば、抗体から結合ドメイン（例えば、Fab、Fab'、scFv、シングルドメイン抗体（sdAb）など）を派生させることができる。いくつかの実施形態では、コンピューターアルゴリズムまたはコンピューターシミュレーションによって、抗体またはタンパク質から結合ドメイン配列（例えば、5T4結合ドメインまたは4-1BB結合ドメイン）が派生される。

【0094】

別のポリペプチドから派生したポリペプチドは、その親ポリペプチドとの比較で、1または複数の変異または変化を有し、例えば、1または複数のアミノ酸残基が、別のアミノ酸残基で置換されていたり、あるいは、1または複数のアミノ酸の挿入または欠失を有し得る。そのような実施形態では、親ポリペプチドから派生した、1または複数の変異または変化を含むポリペプチドは、「バリエーション」と称される。本明細書で使用される場合、用語「バリエーション (variant)」または「バリエーション (variants)」とは、参照ポリヌクレオチドまたは参照ポリペプチドの配列と異なる配列を有するが、その重要な特性は保持している、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。通常、バリエーションポリヌクレオチド配列またはバリエーションポリペプチド配列は、参照ポリヌクレオチドまたは参照ポリペプチドと、全体的に極めて類似しており、多くの領域で同一である。例えば、バリエーションポリヌクレオチドまたはバリエーションポリペプチドは、活性のある部分または完全長の参照ポリヌクレオチドまたは参照ポリペプチドと比較して、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を示し得る。前記ポリペプチドは自然発生的ではないアミノ酸配列を含むことができる。このような変形物は、親ポリペプチドとの配列同一性または配列類似性が必然的に100%未満となる。1つの実施形態では、前記バリエーションは、親ポリペプチドのアミノ酸配列と、約60%から100%未満のアミノ酸配列同一性またはアミノ酸配列類似性を有する、アミノ酸配列を有する。別の実施形態では、前記バリエーションは、親ポリペプチドのアミノ酸配列と、約75%から100%未満、約80%から100%未満、約85%から100%未満、約90%から100%未満、約95%から100%未満のアミノ酸配列同一性またはアミノ酸配列類似性を有するアミノ酸配列を有する。

【0095】

本明細書で使用される場合、用語「配列同一性」とは、2以上のポリヌクレオチド配列間または2以上のポリペプチド配列間の関係を指す。ある配列のある位置が比較配列の対応する位置における同じ核酸塩基またはアミノ酸残基によって占められている場合、その配列はその位置において「同一」とであると言われる。配列同一性パーセントは、両方の配列で同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が出現している位置の数を求め、同一の位置の数を求めることによって、算出される。次に、前記同一の位置の数を比較枠 (comparison window) 内の位置の総数で割り、100を掛けることで、配列同一性パーセントが得られる。配列同一性パーセントは、2本の最適にアラインメントされた配列を比較枠全体と比較することで求められる。ポリヌクレオチド配列の場合の比較枠は、例えば、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも110、少なくとも120、少なくとも130、少なくとも140、少なくとも150、少なくとも160、少なくとも170、少なくとも180、少なくとも190、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも400、少なくとも500、少なくとも600、少なくとも700、少なくとも800、少なくとも900、少なくとも1000、またはそれ以上の核酸長であり得る。ポリペプチド配列の場合の比較枠は、例えば、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも110、少なくとも120、少なくとも130、少なくとも140、少なくとも150、少なくとも160、少なくとも170、少なくとも180、少なくとも190、少なくとも200、少なくとも300、またはそれ以上のアミノ酸長であり得る。比較用に配列を最適にアラインメントするために、参照配列を一定に保ちつつ、比較枠内のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の部分にギャップと呼ばれる付加または欠失が含ませることができる。最適なアラインメントとは、ギャップを用いたとしても、参照配列と比較配列との間で可能な最大数の「同一」位置を生じるアラインメントである。2本の配列間の「配列同一性」パーセント

10

20

30

40

50

は、2004年9月1日の時点で国立バイオテクノロジー情報センターから入手できた、「BLAST 2 Sequences」プログラムのバージョンを用いて求めることができる。このプログラムには、BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列比較用）およびBLASTPプログラム（ポリペプチド配列比較用）が組み込まれており、これらのプログラムはKarlin and Altschul(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(12):5873-5877, 1993)のアルゴリズムに基づいている。「BLAST 2 Sequences」を利用する場合、2004年9月1日の時点でデフォルトパラメータであった、以下のパラメータを用いることができる：ワードサイズ（word size）（3）、ギャップ開始ペナルティ（open gap penalty）（11）、ギャップ伸長ペナルティ（extension gap penalty）（1）、ギャップドロップオフ値（gap dropoff）（50）、期待値（10）、および、マトリックスオプション（matrix option）を含むがこれに限定はされないあらゆる他の必要なパラメータ。2本のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、互いに少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する場合に、「実質的に類似した配列同一性」または「実質的な配列同一性」を有していると思なされる。

【0096】

本明細書で使用される場合、特に断りがない限り、免疫グロブリン分子の可変領域内のアミノ酸残基の位置は、IMGT基準（Brochet et al, Nucl. Acids Res. (2008) 36, W503-508）またはEU命名規約（Ward et al., 1995 Therap. Immunol. 2:77-94）に従って付番され、免疫グロブリン分子の定常領域内のアミノ酸残基の位置は、EU命名規約（Ward et al., 1995 Therap. Immunol. 2:77-94）に従って付番される。本明細書では、カバット付番規約（Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、ベテスダ、メリーランド州：公衆衛生局、アメリカ国立衛生研究所（1991））を、もう1つのシステムとして、免疫グロブリン分子の可変領域内のアミノ酸残基の位置について言及する際に用い、さらに、免疫グロブリン分子の可変領域内のアミノ酸残基の位置について言及する際に用いる場合もある。

【0097】

本明細書で使用される場合、用語「二量体」とは、共有結合（例えば、ジスルフィド結合）および他の相互作用（例えば、静電的相互作用、塩橋、水素結合、および疎水性相互作用）を含む1または複数の形態の分子内力を介して互いに結合した2つのサブユニットからなり、適切な条件下（例えば、生理条件下で、組換えタンパク質の発現、精製、および／もしくは保存に適した水溶液中で、または非変性的且つ／もしくは非還元的な電気泳動用の条件下）で安定である、生物学的実体を指す。用語「ヘテロ二量体」または「ヘテロ二量体タンパク質」とは、本明細書で使用される場合、2つの異なるポリペプチドから形成された二量体を指す。ヘテロ二量体には、本明細書に記載の抗5T4×抗4-1BB分子が含まれ得る。ヘテロ二量体に、4つのポリペプチド（すなわち、2つの軽鎖および2つの重鎖）から形成された抗体は含まれない。用語「ホモ二量体」または「ホモ二量体タンパク質」とは、本明細書で使用される場合、2つの同一のポリペプチドから形成された二量体を指す。

【0098】

「Fc領域」または「Fcドメイン」とは、細胞上のFc受容体および／または補体のC1q成分に結合することで、抗体のエフェクター機能を媒介できる、ソース抗体の一部に対応する、またはそれに由来する、ポリペプチド配列を指す。Fcとは、「結晶性フラグメント（fragment crystalline）」（タンパク質結晶を容易に形成する抗体のフラグメント）を表す。元来タンパク質消化によって表されていた独特なタンパク質フラグメントによって、免疫グロブリンタンパク質の全体的な一般構造を明らかにすることができる。本文書で最初に定義した通り、Fc領域は、各々がヒンジ領域と、CH2ドメインと、CH3ドメインとを含む、ジスルフィド結合で結合した2つのポリペプチドを含むホモ二量体タンパク質である。しかし、より最近では、この用語は、CH3と、CH2と、第二の鎖とジスルフィド結合型の二量体を形成するのに十分なヒンジの少なくとも一部と、から

なる一本鎖単量体成分にも適用されている。従って、文脈によって、用語「Fc領域」または「Fcドメイン」の使用は、本明細書では、二量体形態、または結合して二量体タンパク質を形成する個々の単量体のいずれかを指す。免疫グロブリンの構造および機能の概説については、Putnam, The Plasma Proteins, Vol. V (Academic Press, Inc., 1987), pp. 49-140; および Padlan, Mol. Immunol. 31:169-217, 1994を参照されたい。本明細書で使用される場合、Fcという用語は、天然配列のバリエーションを包含する。

【0099】

「免疫グロブリン定常領域」または「定常領域」は、本明細書における定義では、免疫グロブリンの1または複数の定常ドメインの一部または全てに一致する、またはそれに由来する、ペプチドまたはポリペプチド配列を指す用語である。特定の実施形態では、前記定常領域は、IgGのCH2ドメインおよびCH3ドメイン、例えばIgG1のCH2ドメインおよびCH3ドメイン、を含む。特定の実施形態では、前記定常領域はCH1ドメインを含まない。特定の実施形態では、前記定常領域を構成する定常ドメインは、ヒト定常ドメインである。いくつかの実施形態では（例えば、41BB結合ポリペプチド、5T4結合ポリペプチド、またはその多特異性ポリペプチドの特定の変形形態では）、本開示の融合タンパク質の定常領域は、胎児性Fc受容体（FcRn）などのいくつかのFc受容体との結合能を保持しながら、且つ、比較的長い生体内半減期を保持しながら、エフェクター機能を持たないか、最低限しか持たない。例えば、本開示の融合タンパク質の定常領域は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞媒介性ファゴサイトーシス（ADCP）、補体活性化、および／または補体依存性細胞傷害（CDC）の誘導をもたらさないか、またはそれを実質的に低減する。他の変形形態では、本開示の融合タンパク質は、ADCCおよびCDCの片方または両方など、1または複数のエフェクター機能を保持する定常ドメインを含む。特定の実施形態では、本開示の結合ドメインはヒトIgG1定常領域に融合されており、前記IgG1定常領域は以下のアミノ酸のうちの1または複数が変異している：234位のロイシン（L234）、235位のロイシン（L235）、237位のグリシン（G237）、318位のグルタミン酸（E318）、320位のリジン（K320）、322位のリジン（K322）、またはこれらのあらゆる組み合わせ（付番はEU準拠）。例えば、これらのアミノ酸のうちのいずれか1つまたは複数が、アラニンに変化され得る。別の実施形態では、IgG1 Fcドメインは、L234、L235、G237、E318、K320、およびK322（EU付番に準拠）のそれぞれが、アラニンに変異しており（すなわち、それぞれ、L234A、L235A、G237A、E318A、K320A、およびK322A）、所望により、N297A変異も有する（すなわち、CH2ドメインのグリコシル化は基本的には除外）。

【0100】

用語「軽鎖可変領域」（別名「軽鎖可変ドメイン」または「VL」）および「重鎖可変領域」（別名「重鎖可変ドメイン」または「VH」）とは、それぞれ、抗体の軽鎖および重鎖に由来する可変性の結合領域を指す。可変性の結合領域は、「相補性決定領域」（CDR）および「フレームワーク領域」（FR）として知られている、個別の明確に定義された小領域から構成される。1つの実施形態では、前記FRはヒト型化されている。用語「CL」とは、「免疫グロブリン軽鎖定常領域」または「軽鎖定常領域」、すなわち、抗体軽鎖由来の定常領域を指す。用語「CH」とは、「免疫グロブリン重鎖定常領域」または「重鎖定常領域」を指す。CHは、抗体のアイソタイプに基づいて、CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン（IgA、IgD、IgG）、またはCH1ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、およびCH4ドメイン（IgE、IgM）にさらに分割できる。「Fab」（Fragment antigen binding）は、抗体の一部であって、抗原に結合し、鎖間ジスルフィド結合を介して軽鎖に連結された重鎖の可変領域およびCH1ドメインを含む部分である。

【0101】

本明細書で使用される場合、用語「リンカー」とは、通常、ポリペプチドの2つのサブドメインを連結する短いポリペプチド配列を指す。リンカーの非限定的な例としては、グ

10

20

30

40

50

ジアミノ酸配列を指す。特定の実施形態では、野生型免疫グロブリンヒンジ領域配列は、ヒト由来であり、ヒトIgGヒンジ領域（例えば、IgG1ヒンジ領域、IgG2ヒンジ領域、IgG3ヒンジ領域、またはIgG4ヒンジ領域）を含み得る。

【0104】

「改変型免疫グロブリンヒンジ領域」または「バリエーション免疫グロブリンヒンジ領域」とは、対応する親野生型免疫グロブリンヒンジ領域と比較した場合に1または複数の変異、置換、挿入、または欠失を有するヒンジ領域ポリペプチドを指す。特定の実施形態では、改変型免疫グロブリンヒンジ領域は、野生型免疫グロブリンヒンジ領域に対し少なくとも70%の相同性（例えば、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の相同性）を有する。特定の実施形態では、改変型免疫グロブリンヒンジ領域は、約5個のアミノ酸長（例えば、約5個、約6個、約7個、約8個、約9個、約10個、約11個、約12個、約13個、約14個、約15個、約16個、約17個、約18個、約19個、約20個、またはそれ以上のアミノ酸長）から約120個までのアミノ酸長（例えば、約10個～約40個のアミノ酸長、または約15個～約30個のアミノ酸長、または約15個～約20個のアミノ酸長、または約20個～約25個のアミノ酸長）を有する、野生型免疫グロブリンヒンジ領域のフラグメントである。通常、野生型免疫グロブリンヒンジ領域のフラグメントとしての改変型免疫グロブリンヒンジ領域は、米国特許出願公開第2013/0129723号および同第2013/0095097号で開示されたような、IgGコアヒンジ領域（例えば、Xが任意のアミノ酸であるC-X-X-C配列を含むポリペプチド）を含む。ヒンジの非限定例を表1に記載する。

【0105】

本明細書で使用される場合、用語「ヒト型化」とは、元の抗体の抗原結合特性を保持しながらも、ヒトに対する免疫原性が低い、ヒト以外の種（例えば、マウスまたはラット）に由来する、抗体、免疫グロブリン結合タンパク質、または免疫グロブリン結合ポリペプチドを、遺伝子工学技術を用いて作製する方法を指す。いくつかの実施形態では、抗体、免疫グロブリン結合タンパク質、または免疫グロブリン結合ポリペプチドの結合ドメイン（例えば、軽鎖可変領域、重鎖可変領域、Fab、scFv）は、ヒト型化されたものである。非ヒト結合ドメインは、CDRグラフトイング（Jones et al., Nature 321:522 (1986)）として知られている技術およびその変法、例えば、「リシェイピング（reshaping）」（Verhoeyen, et al., 1988 Science 239:1534-1536; Riechmann, et al., 1988 Nature 332:323-337; Tempest, et al., Bio/Technol 1991 9:266-271）、「超キメラ化（hyperchimerization）」（Queen, et al., 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:10029-10033; Co, et al., 1991 Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873; Co, et al., 1992 J Immunol 148:1149-1154）、および「ベニアリング（veneering）」（Mark, et al., “Derivation of therapeutically active humanized and veneered anti-CD18 antibodies.” In: Metcalf BW, Dalton BJ, eds. Cellular adhesion: molecular definition to therapeutic potential. New York: Plenum Press, 1994: 291-312）を用いてヒト型化できる。ヒト以外の供給源由来である場合、ヒンジ領域ドメインおよび定常領域ドメインなど、抗体、免疫グロブリン結合タンパク質、または免疫グロブリン結合ポリペプチドの他の領域もヒト型化できる。本開示に係るポリペプチドに対して、これらのポリペプチドが抗体でない場合であっても、当該技術分野におけるヒト型化抗体に関する知見を適用できる。

【0106】

本明細書で使用される場合、用語「必要としている患者」とは、本明細書で提供される5T4結合タンパク質または多特異性ポリペプチドまたはその組成物による治療または改善に適した疾患、障害、または異常のリスクを有する、またはそれに罹っている患者を指す。

【0107】

本明細書で使用される場合、用語「薬剤的に許容できる」とは、分子体および組成物が、当該技術分野において周知の経路で投与された場合に、アレルギー反応や他の重篤な有害反応を通常は発生させないことを指す。動物、特にヒト、での使用について、連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認された、または米国薬局方もしくは他の一般的に認知された薬局方に記載された、分子体および組成物が、「薬剤的に許容できる」と見なされる。

【0108】

本明細書で使用される場合、用語「プロモーター」とは、転写を開始するためのRNAポリメラーゼとの結合に関与するDNAの領域を指す。

【0109】

本明細書で使用される場合、用語「核酸」、「核酸分子」、または「ポリヌクレオチド」とは、一本鎖形態または二本鎖形態の、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはその重合体を指す。特に限定がない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有する天然ヌクレオチドの類似体を含むし、天然ヌクレオチドと同様の代謝を受ける核酸を包含する。特に記載がない限り、ある特定の核酸配列は、明示的に示された配列だけではなく、保存的に改変されたそのバリエーション（例えば、縮重コドン置換）および相補的配列も暗に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1または複数の選択された（または全ての）コドンの第三位が混合塩基残基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を作製することにより、達成できる（Batzer et al. (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; Cassol et al. (1992); Rossolini et al. (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98）。核酸という用語は、遺伝子、cDNA、および遺伝子にコードされるmRNAと同義的に使用される。本明細書で使用される場合、用語「核酸」、「核酸分子」、または「ポリヌクレオチド」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、核酸アナログを用いて作製されたDNA類似体およびRNA類似体、並びにその誘導体、フラグメント、および相同体を包含することが意図される。

【0110】

用語「発現」とは、核酸にコードされている産物の生合成を指す。例えば、目的のポリペプチドをコードする核酸セグメントの場合、発現は、核酸セグメントのmRNAへの転写と、mRNAの1または複数のポリペプチドへの翻訳と、を含む。

【0111】

用語「発現ユニット」および「発現カセット」は、本明細書では同義的に使用されており、目的のポリペプチドをコードしており、且つ、宿主細胞における当該核酸セグメントの発現を実現することが可能な、核酸セグメントを表す。発現ユニットは、全て操作可能な立体配置にある、転写プロモーターと、目的ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームと、転写ターミネーターと、を通常含む。転写プロモーターおよび転写ターミネーターの他に、発現ユニットは、例えばエンハンサーまたはポリアデニル化シグナルなどの他の核酸セグメントをさらに含み得る。

【0112】

用語「発現ベクター」とは、本明細書で使用される場合、1または複数の発現ユニットを含む、直鎖状または環状の、核酸分子を指す。1または複数の発現ユニットの他に、発現ベクターは、例えば1または複数の複製開始点または1または複数の選択マーカーなどの追加の核酸セグメントも含み得る。発現ベクターは、通常はプラスミドDNA由来またはウイルスDNA由来であるが、両方のエレメントを含む場合もある。

【0113】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」、「ポリペプチド鎖」、または「タンパク質」とは、一本鎖の、直鎖状の、且つ連続的な、共有結合的に連結したアミノ酸の並びを指す。ポリペプチドは1または複数の鎖内ジスルフィド結合を形成し得る。本明細書に記載のポリペプチドに関して、配列番号によって指定されたものに対応するアミノ酸残基の修飾または変化について言及がなされる場合、そのような残基の翻訳後修飾も包含され

10

20

30

40

50

る。ポリペプチドおよびタンパク質という用語は、2本のポリペプチド鎖が鎖間ジスルフィド結合などを介して非直鎖状に連結された実施形態も包含する。例えば、ネイティブな免疫グロブリン分子は2つの重鎖ポリペプチドと2つの軽鎖ポリペプチドとから構成される。重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドとの間の鎖間ジスルフィド結合によって各重鎖ポリペプチドが軽鎖ポリペプチドに結合して、2つのヘテロ二量体タンパク質またはヘテロ二量体ポリペプチド（すなわち、2つの非相同ポリペプチド鎖から構成されるタンパク質）を形成する。この2つのヘテロ二量体タンパク質が、重鎖ポリペプチド間のさらなる鎖間ジスルフィド結合によって結合して、免疫グロブリンタンパク質または免疫グロブリンポリペプチドを形成する。本明細書では、タンパク質またはポリペプチドは抗体または抗体の抗原結合性フラグメントであり得る。いくつかの実施形態では、タンパク質は s c F v - F c - s c F v タンパク質、s c F v - s c F v 二量体、またはダイアボディであり得る。

10

【0114】

当業者には理解されることであるが、本明細書では、タンパク質およびポリペプチドは、本開示の全体を通じた配列番号の参照によって示される、個々のポリペプチド鎖のアミノ酸配列によって定義される。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の s c F v - F c - s c F v タンパク質またはポリペプチドは、鎖間結合（例えば、鎖間ジスルフィド結合）によって結合して、二量体 s c F v - F c - s c F v タンパク質（例えば、ホモ二量体 s c F v - F c - s c F v タンパク質またはヘテロ二量体 s c F v - F c - s c F v タンパク質）を形成する、2本の s c F v - F c - s c F v ポリペプチド鎖から構成される（例えば、図10を参照）。そのような実施形態では、s c F v - F c - s c F v タンパク質は、個々の s c F v - F c - s c F v ポリペプチド鎖のアミノ酸配列によって定義される。ポリペプチドおよびタンパク質は炭水化物基などの非ペプチド性成分を含むこともできる。タンパク質またはポリペプチドに対して、当該タンパク質を産生する細胞により、炭水化物および他の非ペプチド性置換基を付加可能であるが、この置換基は細胞の種類によって異なる。本明細書では、タンパク質およびポリペプチドはそのアミノ酸骨格構造によって定義され；炭水化物基などの置換基は、通常特に指定はされないが、存在していてもよい。

20

【0115】

用語「アミノ末端側」および「カルボキシル末端側」とは、ポリペプチド内の位置を表すために本明細書では使用される。文脈によっては、これらの用語は、ポリペプチドの特定の配列または部分に関して、近接または相対位置を表すために用いられる。例えば、ポリペプチド内の参照配列のカルボキシル末端側に位置する特定の配列は、当該参照配列のカルボキシル末端の近位に位置してはいるが、当該完全ポリペプチドのカルボキシル末端に存在する必要はない。

30

【0116】

本明細書で使用される場合、用語「形質転換」、「トランスフェクション」、および「形質導入」とは、核酸（すなわち、ヌクレオチド重合体）の核内への導入を指す。本明細書で使用される場合、用語「遺伝子形質転換」とは、DNA、特に組換えDNAの、細胞内への導入および取り込みを指す。この導入核酸は発現ベクターを介して細胞内に導入することができる。

40

【0117】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」および「ADCC」とは、本明細書で使用される場合、F c γ Rを発現する非特異的な細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞およびマクロファージなどの単球系細胞）が、標的細胞上に結合した抗体（またはF c γ Rと結合することが可能な他のタンパク質）を認識して、標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性のプロセスを指す。原則的に、活性化F c γ Rを有するいかなるエフェクター細胞も、惹起してADCCを媒介させることができる。ADCCを媒介する主要な細胞はNK細胞であり、これはF c γ R I I Iのみを発現するが、単球は、その活性化、局在、または分化の状態に依存して、F c γ R I、F c γ R I I、およびF c γ R I I Iを

50

発現できる。造血細胞上のFcγR発現の概要に関しては、例えば、Ravetch et al., 1991, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92を参照されたい。

【0118】

ポリペプチドまたはタンパク質に関連して本明細書で使用される、用語「ADCC活性を有する」は、当該ポリペプチドまたはタンパク質、例えば、IgG（例えば、IgG1）などに由来するFcドメイン（例えば、免疫グロブリンヒンジ領域、並びにCH2ドメインおよびCH3ドメインを有する免疫グロブリン定常領域）を含むポリペプチドまたはタンパク質が、Fc受容体を発現する細胞溶解性免疫エフェクター細胞（例えば、NK細胞）上の細胞溶解性Fc受容体（例えば、FcγRIII）の結合を通じて、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）を媒介することが可能であること、を意味する。いくつかの実施形態では、Fcドメインを含む多特異性ポリペプチドまたは多特異性タンパク質（例えば、本明細書に記載の抗5T4×抗4-1BB分子）が、CH2および／またはCH3ドメインにおける変異の結果、エフェクター機能を持たない（例えば、ヌルADCC活性）場合がある。

10

【0119】

「補体依存性細胞傷害」および「CDC」とは、本明細書で使用される場合、正常血清中の成分（「補体」）が、標的抗原に結合した抗体または他の補体C1q結合タンパク質と共に、標的抗原を発現している標的細胞の溶解を示すプロセスを指す。補体は、共同して順序立てて働いて効果を発揮する、血清タンパク質の一群からなる。

【0120】

用語「古典的補体経路」および「古典的補体系」とは、本明細書で使用される場合、同義語であり、補体を活性化するための特定の経路を指す。古典経路は惹起に抗原抗体複合体を必要とし、C1～C9と名付けられた9種類の主要なタンパク質成分の順序だった活性化を含む。活性化プロセスのいくつかの段階において、その産物は次の段階を触媒する酵素となる。このカスケードにより、比較的小さな開始シグナルによる、大量の補体の増幅および活性化が実現される。

20

【0121】

ポリペプチドまたはタンパク質に関連して本明細書で使用される、用語「CDC活性を有する」は、当該ポリペプチドまたはタンパク質、例えば、IgG（例えば、IgG1）などに由来するFcドメイン（例えば、免疫グロブリンヒンジ領域、並びにCH2ドメインおよびCH3ドメインを有する免疫グロブリン定常領域）を含むポリペプチドまたはタンパク質が、補体C1qタンパク質の結合および古典的補体系の活性化を通じて、補体依存性細胞傷害（CDC）を媒介することが可能であること、を意味する。いくつかの実施形態では、多特異性ポリペプチドまたは多特異性タンパク質（例えば、本明細書に記載の抗5T4×抗4-1BB分子）が、CH2および／またはCH3ドメインにおける1または複数の変異の結果、エフェクター機能を持たない（例えば、ヌルCDC活性）場合がある。

30

【0122】

「エフェクター細胞の活性化の増強」とは、本明細書で使用される場合、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質によるエフェクター細胞応答の増加、長期化、および／または相乗を指す。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞の活性化の増強は、エフェクター細胞の細胞障害活性の増大を指す。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞の活性化の増強は、サイトカイン産生、細胞増殖の増加、またはエフェクター細胞の標的細胞を溶解する能力が増強されるような細胞表面分子発現の変化を指す。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質は、Wnt/β-カテニンシグナル伝達の調節することによって、エフェクター細胞の活性化を増強する。

40

【0123】

本明細書で使用される場合、用語「エフェクター細胞」とは、腫瘍細胞などの標的細胞を溶解または殺滅することが可能な免疫系の細胞を指す。本明細書では、エフェクター細胞は、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、またはNKT細胞、単球、マクロファージ

50

ジ、樹状細胞、または顆粒球などの、リンパ球を指し得る。特定の実施形態では、エフェクター細胞という用語は、T細胞、NK細胞、またはNK T細胞を指す。

【0124】

本明細書で使用される場合、用語「治療 (treatment)」、「治療する (treating)」、または「改善する (ameliorating)」は、治療的処置または予防的 (prophylactic/preventative) 処置のいずれかを指す。治療は、治療を受けている個体における疾患の少なくとも1つの症状が改善する場合、または治療が個体における進行性疾患の悪化を遅延できる場合、または治療が追加の関連疾患の発症を予防できる場合、治療的処置である。

【0125】

本明細書で使用される場合、本明細書に記載のポリペプチドもしくはタンパク質またはその組成物の「治療有効量 (または用量)」または「有効量 (または用量)」という用語は、その量の当該化合物が、治療を受けている疾患の1もしくは複数の症状の統計的に有意な回復、または臓器機能の統計的に有意な改善、をもたらすのに十分であることを指す。単独で投与された個々の活性成分についていう場合、治療有効量はその成分単独を指す。組み合わせについていう場合、治療有効量は、(同一製剤中で、または別々の製剤中で同時に) 逐次投与されたか同時投与されたかにかかわらず、治療効果をもたらす活性成分の総量を指す。

【0126】

本明細書において、用語「統計的有意性」とは、ある試験結果の入手が偶然に生じたものである確率を指す。例えば、所見または試験結果は、それが純粋に偶然に発生したものである確率 (p) が所定の統計的閾値 (α) 未満である、すなわち $p < \alpha$ である場合、統計的に有意であるとされる。ある特定の試験の統計的閾値は、データの特徴および当該技術分野において公知の慣習に基づいて設定できる。例えば、所与の結果について、当該結果が統計的に有意と見なされるために $p < 0.05$ となるように、αは従来的には5% (0.05) に設定される。

【0127】

本明細書で使用される場合、「5T4結合ドメイン」とは、TPBGおよびWIF1 (Wnt-activated inhibitory factor 1) としても知られている、癌胎児性トロホブラスト糖タンパク質 (5T4) (例えば、ヒト5T4) に特異的に結合する、本明細書に記載のポリペプチドのドメインを指す。5T4は、72 kDの癌胎児性糖タンパク質であり、タンパク質間相互作用に関連するいくつかのロイシンリッチリピートを有する、重度のN-グリコシル化が生じたタンパク質である。用語「5T4」は、5T4の任意のアイソフォームを指す場合がある。例示的なヒト5T4のヌクレオチド配列を配列番号163および配列番号167として、さらに、例示的なヒト5T4のアミノ酸配列を配列番号164および配列番号168として、下記の表1に示す。

【0128】

本明細書で使用される場合、「4-1BB結合ドメイン」とは、ヒト4-1BB (別名CD137) に特異的に結合することが可能な、本明細書に記載のタンパク質またはポリペプチドの結合ドメインを指す。用語「4-1BB」は、4-1BBの任意のアイソフォームを指す場合がある。例示的なヒト4-1BBのヌクレオチド配列を配列番号161および配列番号165として、さらに、例示的なヒト4-1BBのアミノ酸配列を配列番号162および配列番号166として、下記の表1に示す。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1 : 例示的な 4-1 BB および 5 T 4 の DNA 配列およびアミノ酸配列

タンパク質名	DNA 配列	DNA 配列番号	アミノ酸配列	アミノ酸配列番号
完全長ヒト 4-1BB	ATGGGAAACAGCTGTTACAACATAGTAGCCACTCTG TTGCTGGTCCCTCAACTTIGAGAGGACAAGATCAITG CAGGATCCTGTAGTAACCTGCCAGCTGGTACATTCT TGTGATAATAACAGGAATCAGATTGTCAGTCCCTGT CCTCCAAATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGG ACCTGTGACATATGACAGGCAGTGTAAAGGTGTTTC AGGACCAGGAAGGAGTGTCTCCACCAGCAATGC AGAGTGTGACTGCACTCCAGGGTTTCACTGCCTGGG GGCAGGATGCAACATGTGTGAACAGGATTGTAAAC AAGGTCAAGAACTGACAAAAAAGGTTGTAAAGAC TGTGTCTTTGGGACATTTAACGATCAGAAACGTGGC ATCTGTGACCCCTGGACAAACTGTTCTTTGGATGGA AAGTCTGTGCTTGTGAATGGGACGAAGGAGAGGGA CGTGGTCTGTGGACCATCTCCAGCCGACCTCTCTCC GGGAGCATCCTCTGTGACCCCGCTGCCCTGGGAG AGAGCCAGGACACTCTCCGAGATCATCTCTTCTT TCTTGCCTGACGTGCGACTGCGTGTCTTCTCTGCTG TTCTTCTCACGCTCCGTTTCTCTGTTGTTAAACGGG GCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT TTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGAT GGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGG AGGATGTGAAGTGTGA	161	MGNSCYNIVATLLLVNLFERTRSL QDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPC PPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVF RTRKECSSTNAECDCTPGFHC LG AGCSMCEQDCKQGGELTKKGCKD CCFGTFNDQKRGICRPWTKCSLDG KSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSP GASSVTPPAPAREPGHSPQHSFFLA LTSTALILFLFFLTLRFSVVKRGRK KLLYIFKQPFMRPVQITQEEDGCS CRFPEEEEGGCEL	162
完全長ヒト 5T4	ATGCGTGGGGGTGCTCCCGGGGCCCGCGCGCGG GGACGGGGCTGTGCGGCTGGCGCGACTAGCGCTGG TACTCCTGGGCTGGGTCTCCTCGTCTTCTCCACCTC CTCGGCATCCTCCTTCTCCTCCTCGGCGCGCTTCTG GCTTCCGCGGTGTCCGCCAGCCCCCGCTGCCGGAC CAGTGCCCCGCGCTGTGCGAGTGCTCCGAGGCAGC GCGCACAGTCAAGTGCGTTAACCGCAATCTGACCG AGGTGCCACCGACCTGCCCGCTACGTGCGCAACC TCTTCTTACC GGCAACCAAGCTGGCCGTGCTCCCTG CCGGCGCTTTCGCCCGCGCGCGCGCTGGCGGAGC TGGCCGCGCTCAACCTCAGCGGCAGCCGCTGGAC GAGGTGCGCGCGGGCGCTTCGAGCATCTGCCAG CCTGCGCGAGCTCGACCTCAGCCACAACCACTGGC CGACCTCAGTCCCTTCGCTTCTCGGGCAGCAATGC CAGCGTCTCGGCCCGCAGTCCCTTGTGGAAGTAT CCTGAACCACATCGTGCCCCCTGAAGATGAGCGGC AGAACC GGAGCTTCGAGGGCATGGTGGTGGCGGCC CTGCTGGCGGGCGTGCAGTGCAGGGGCTCCGCCGC TTGGAGCTGGCCAGCAACCACTTCTTACCTGCCG CGGGATGTGCTGGCCCAACTGCCAGCCTCAGGCAC CTGGACTTAAGTAATAATTCTGCTGGTGAGCCTGACC TACGTGTCTTCCGCAACCTGACACATCTAGAAAGC CTCCACCTGGAGGACAATGCCCTCAAGGTCTCTCAC AATGGCACCTTGGCTGAGTTGCAAGGTCTACCCAC ATTAGGGTTTCTCGGACAACAATCCCTGGGTCTGC GACTGCCACATGGCAGACATGGTGACCTGGCTCAA GGAAACAGAGGTAGTGCAGGGCAAGACCGGCTCA CCTGTGCATATCCGGAAAAAATGAGGAATCGGGTC CTCTTGGAAGTCAACAGTGCTGACCTGGACTGTGAC CCGATTCCTTCCXXCATXXCTGCAAACTCTTATGTCT TCCTGGGTATTGTTTTAGCCCTGATAGCGCTATTTT CCTCTGGTTTTGTATTTGAACCGCAAGGGGATAAA AAAGTGGATGCATAACATCAGAGATGCTGCGAGGG ATCACATGGAAGGGTATCATTACAGATATGAAATC AATGCGGACCCAGATTAACGAACCTCAGTTCTAAC TCGGATGTCTGA	163	MPGGCSRGPAAAGDGRILRLARLAL VLLGWVSSSPTSSASSFSAPPFL ASAVSAQPPLPDQCPALCECSEAA RTVKCVNRNI.TEVPTDI.PAYVRNI FLIGNQLAVLPAGAFARRPPLAEL AALNLSGSRLDEVRA GAFELHPSL RQLDI.SHNPLADI.SPF.FSGSNAS VSAPSPLVELLNHIVPDERQNR SFEGMVVAALLAGRALQGLRRLE LASNHFI.YL.PRDVLAQLPSL.RHLD LSNNSLVSLTYVSFRNLTHLESLL EDNALKVLHNGTLAELQGLPHIRV FLDNKPWVCTDCHMADMTWTW.KE TEVVQKDRLTCAYPEKMRNRVL LELNSADLDCDPLPPSLQTSYVFL GIVLALIGAIFFLVLYLNRKGKKW MHNIRDACRDHMEGYHYRYEINA DPRLTNLSSNSDV	164

10

20

30

40

【表 1 - 2】

ヒト 4-1BB (ECD*)	ATGGGAAAACAGCTGTTACAAACATAGTAGCCACTCTG TTGCTGGTCCTCAACTTTGAGAGGACAAGATCATTG CAGGATCCTTGTAGTAAGTCCCAGCTGGTACATTG TGTGATAATAACAGGAATCAGATTGTCAGTCCCTGT CCTCCAAATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGG ACCTGTGACATATGCAGGCAGTGTAAAGGTGTTTTT AGGACCAGGAAGGAGTGTCTTCCACACAGCAATGC AGAGTGTGACTGCACTCCAGGGTTTCACTGCCTGGG GGCAGGATGCAGCATGTGTGAACAGGATTGTAAAC AAGGTCAAGAACATGACAAAAAAGGTGTAAAGAC TGTGCTTGGGACATTAAACGATCAGAAACGTGGC ATCTGTCGACCCTGGACAACTGTTCTTTGGATGGA AAGTCTGTGCTTGTGAATGGGACGAAGGAGAGGGA CGTGGTCTGTGGACCATCTCCAGCCGACCTCTCTCC GGGAGCATCTCTGTGACCCGCTGCCCTGCGAG AGAGCCAGGACACTCTCCGCAG	165	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSL QDPCSNCPAGTFCNRRNQICSPC PPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVF RTRKKECSSTSNACDCTPGFHCIG AGCSMCEQDCKQQLTKKCKD CCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDG KSVI.VNGTKHRIJVVCGPSPADLSP GASSVTTPAPAREPGHSPQ	166
ヒト 5T4(E CD*)	ATGCTGGGGGGTGTCTCCCGGGCCCCGCGCGCGG GGACGGGGCTCTGCGGCTGGCGGACTAGCGCTGG TACTCCTGGGCTGGGTCTCCTCGTCTTCTCCACCTC CTCGGCATCCTCCTTCTCCTCCTCGGCGCGGTTCTG GCTTCCGCGGTGTCCGCCCCAGCCCCGCTGCGCGAC CAGTGCCCCGCGCTGTGCGAGTGCTCCGAGGCAGC GCGCACAGTCAAGTGCCTTAACCGCAICTGACCG AGGTGCCACGGACCTGCCCGCTACGTGCGCAACC TCTTCTTACCGGCAACCAGCTGGCGGTGCTCCCTG CCGCGCGCTTCCGCCCCGCGCGCGCTGGCGGAGC TGGCGCGCTCAACCTCAGCGGCGAGCGCTGGAC GAGGTGCGCGCGGCGCTTCGAGCATCTGCCAG CCTGCGCCAGCTCGACCTCAGCCACAACCCACTGGC CGACCTCAGTCCCTTCTGCTTCTCGGGCAGCAATGC CAGCGTCTCGGCCCCAGTCCCTTGTGGAAGTGAT CCTGAACCACATCGTGCCCTGAAGATGAGCGGC AGAACCAGGAGCTTCGAGGGCATGGTGGTGGCGGC CTGCTGGCGGGCGGTGCACTGCAGGGGCTCCGCGCG TTGGAGCTGGCCAGCAACCACTTCTTTACCTGCGG CGGATGTGCTGGCCCAACTGCCAGCCTCAGGCAC CTGGACTTAAGTAATAATTCGCTGGTGAGCCTGACC TACGTGTCTTCCGCAACCTGACACATCTAGAAAGC CTCCACCTGGAGGACAATGCCCTCAAGGTCTTCAC AATGGCACCCCTGGCTGAGTTGCAAGGTCTACCCAC ATTAGGGTTTCTGAGACAACAATCCCTGGGTCTGC GACTGCCACATGGCAGACATGGTGACCTGGCTCAA GGAAACAGAGGTAGTGACGGGCAAAGACCGGCTCA CCTGTGCATATCCGGAATAATGAGGAATCGGGTC CTCTTGGAACTCAACAGTGCTGACCTGGACTGTGAC CCGATTCTCCCCCATCTCTGCAACCTCT	167	MPGGCSRGPAAAGDGRRLRLARLAL VLLGWVSSSSPTSSASSFSSSAPFL ASAVSAQPLPDQCPALCECSEAA RTVKCVNRNLTEVPTDLPAYVRNL FLTGNQLAVLPAGAFARRPPLAEL AALNLSGSRLEVRAGAFEHLPSL RQLDLSHNPLADLSPFAFSGSNAS VSAPSPLVELLNHIVPPEDERQNR SFEQMVVAALLAGRALQGLRRLE LASNHFLYLPRDVLALQLPSLRHLD LSNNSLVSLTYVSFRNLTHLESLHL EDNALKVLINGTLAELQGLPHIRV FLDNNPWVCDCHMADMVTWLKE TEVVQGGKDRITCAYPEKMRNRVL LELNSADLDCDPLPSPSLQTS	168

*ECDー細胞外ドメイン

【0129】

本明細書で使用される場合、「多特異性ポリペプチド」とは、それぞれ標的抗原に特異的に結合することが可能な2つ以上の結合ドメインを含むポリペプチドを指す。例えば、本明細書に記載のポリペプチドは、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の結合ドメインを含み、2つ、3つ、4つ、またはそれ以上の標的抗原と結合することが可能であり得る。いくつかの実施形態では、多特異性ポリペプチドは二重特異性ポリペプチドである。ここで、「二重特異性ポリペプチド」とは、2つの結合ドメインを含み、2つの別個の標的抗原に結合することが可能なものである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の二重特異性ポリペプチドは、5T4などの、標的細胞上に発現した細胞表面抗原に特異的に結合する第一結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の二重特異性ポリペプチドは、4-1BBなどの、エフェクター細胞上に発現した細胞表面抗原に特異的に結合する結合ドメインを含む。特定の実施形態では、前記多特異性ポリペプチドは、s c F v - F c - s c F v のフォーマットをとるホモ二量体二重特異性ポリペプチドの、ADAPTIR（商標）である。

【0130】

足場を用いた多特異性ポリペプチドとしては、例えば、PCT国際公開第2007/146968号；同第2010/040105号；同第2010/003108号；同第2016/094873号；同第2017/053469号；米国特許出願公開第2006

10

20

30

40

50

／ 0 0 5 1 8 4 4 号；並びに米国特許第 7, 1 6 6, 7 0 7 号および同第 8, 4 0 9, 5 7 7 号（それぞれその全体が参照によって本明細書に援用される）で開示されたものがある。特定の実施形態では、本明細書に記載の多特異性ポリペプチドは、二重特異性ポリペプチドであり、s c F v - F c - s c F v 構造、別称 A D A P T I R（商標）ポリペプチドまたはフォーマット 1、を含み得る。その例示的な実施形態を図 1 0 に示す。フォーマット 1 構造を含むポリペプチドの構造は、N 末端から C 末端に向かって、第一 s c F v 結合ドメイン-免疫グロブリン（I g）ヒンジ領域-I g 定常領域-第二 s c F v 結合ドメインを含む（図 1 0）。特定の実施形態では、本明細書に記載の多特異性ポリペプチドは、I g G - s c F v 構造（別称 M o r r i s o n フォーマット、またはフォーマット 2）を含み得る。フォーマット 2 構造を含むポリペプチドの構造は、N 末端から C 末端に向かって、s c F v 結合ドメイン-I g 定常領域-I g ヒンジ領域-I g 可変領域を含む。フォーマット 2 は、本質としては、C 末端に s c F v ドメインを含むインタクトな I g 分子である。

10

【 0 1 3 1 】

結合ポリペプチドおよび結合タンパク質

いくつかの実施形態において、本開示は、5 T 4 に特異的に結合することが可能なポリペプチド（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド）、並びにこれらの結合ドメインを含む多特異性のポリペプチドおよびタンパク質を記載している。このような実施形態は 5 T 4 結合ポリペプチドと称される場合がある。特定の実施形態では、本発明は、5 T 4 結合ドメインと、エフェクター細胞上の細胞表面分子に結合することが可能な第二結合ドメインと、を含む多特異的結合タンパク質を提供する。特定の実施形態では、本発明は、5 T 4 結合ドメインと、4 - 1 B B に結合することが可能な第二結合ドメイン（例えば、4 - 1 B B 結合ドメイン）と、を含む二重特異性結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、前記 5 T 4 結合ポリペプチドは、N 末端から C 末端に向かって、5 T 4 結合ドメイン-F c ドメインの構造を含む。

20

【 0 1 3 2 】

いくつかの実施形態において、本開示は、4 - 1 B B に特異的に結合することが可能なポリペプチド、並びにこれらの結合ドメインを含む多特異性のポリペプチドおよびタンパク質を記載している。このような実施形態は 4 - 1 B B 結合ポリペプチドと称される場合がある。特定の実施形態では、本発明は、4 - 1 B B 結合ドメインと、標的細胞上の細胞表面分子に結合することが可能な第二結合ドメインと、を含む多特異的ポリペプチドを提供する。特定の実施形態では、本発明は、4 - 1 B B 結合ドメインと、5 T 4 に結合することが可能な第二結合ドメイン（例えば、5 T 4 結合ドメイン）と、を含む二重特異性ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、前記 4 - 1 B B 結合ポリペプチドは、N 末端から C 末端に向かって、4 - 1 B B 結合ドメイン-F c ドメインの構造を含む。

30

【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドは、免疫グロブリン定常領域、リンカーペプチド、ヒンジ領域、免疫グロブリン二量体形成／ヘテロ二量体形成ドメイン、接合部アミノ酸、タグなどをさらに含むことができる。以下、本開示のポリペプチドおよびタンパク質のこれらの成分についてさらに詳細に説明する。

40

【 0 1 3 4 】

本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4 - 1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、標的抗原と特異的に結合することが可能な 1 または複数の結合ドメインを含む。本明細書に記載の結合ドメインは、種々様々なフォーマットのうちのいずれかの抗体または融合タンパク質の形態をとることができる（例えば、前記融合タンパク質は二重特異性分子または多特異性分子の形態をとることができる）。二重特異性分子の非限定的な例として、s c F v - F c - s c F v 分子（例えば、フォーマット 1 の構造を含む二重特異性タンパク質）、s c F v - I g 分子（例えば、フォーマット 2 の構造を含む二重特異性タンパク質）、および s c F v - s c F v 分子が挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の

50

二重特異性分子は、第一結合ドメイン s c F v とそれに連結された第二結合ドメイン s c F v とを含むか、これらからなり、免疫グロブリン定常領域などの他の配列を含まない。他の実施形態では、本明細書に記載の二重特異性タンパク質はダイアボディである。

【0135】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質は、薬剤または毒性部分に複合化されている。

【0136】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、表 2～10 に示されるアミノ酸配列および／または核酸配列を含み得る。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドの結合ドメインは、(i) C D R として L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L) と、(i i) C D R として H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域 (V_H) と、を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドコンストラクトの場合に提供されるアミノ酸配列は、ヒト免疫グロブリンリーダー配列を含まない。示される C D R 配列およびアミノ酸置換位置は、I M G T 基準 (Brochet et al, Nucl. Acids Res. (2008) 36, W503-508) を用いて規定したものである。場合によっては、表 2～10 の配列を含む、本開示に示される配列は、親配列に対してアミノ酸置換を含有する（例えば、P C T 国際公開第 2 0 1 6 / 1 8 5 0 1 6 号で開示された、クローン 1 6 1 8 / 1 6 1 9 などの抗 4-1 B B 抗体もしくはその結合性フラグメント、または P C T 国際公開第 2 0 1 6 / 1 8 5 0 1 6 号で開示されたものなどの抗 5 T 4 抗体もしくはその結合性フラグメント）。いくつかの実施形態では、抗 5 T 4 結合ドメインの親配列は配列番号 3 8 および配列番号 6 8 に提供されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗 4-1 B B 結合ドメインの親配列は配列番号 2 8 および配列番号 1 6 に提供されるアミノ酸配列を含む。本明細書に記載の抗 4-1 B B 結合ドメインおよび抗 5 T 4 結合ドメインの例示的な親配列を下記の表 2 に示す。下線が引かれたテキストは C D R 配列を表している。

【表 2】

表 2：結合ドメインの親配列の例

親配列	アミノ酸配列	配列番号
1618 抗 4-1BB V _H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSY</u> SGSMYVWRQAPGKGLEWVSS ISSGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARSSY</u> YGSYYSIDYWGQGTLLTVSS	28
1618 抗 4-1BB V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYDNLPFTFGQGTKL EIK	16
1210 抗 5T4 V _H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSY</u> AMSWVRQAPGKGLEWVSA ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARYY</u> GGYYSAWMDYWGQGTLLTVSS	38
1210 抗 5T4 V _L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYGYLHTFGQGTKL EIK	68

【0137】

特定の実施形態では、本開示の結合ドメインとしての V_L 領域および／または V_H 領域は、親 V_L 領域および／または親 V_H 領域の V_L および／または V_H に由来するものであり（例えば、P C T 国際公開第 2 0 1 6 / 1 8 5 0 1 6 号に記載された 1 6 1 8 / 1 6 1 9）、所望により、既知のモノクローナル抗体の V_L 配列および／または V_H 配列と比較して、1 または複数個程度（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個程度）の挿入、1 または複数個程度（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個程度）の欠失、1 または複数個程度（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個程度）のアミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換）、または上記変化の組み合わせ、を含有する。上記の挿入、欠失、または置換は、アミノ末端またはカル

ボキシル末端または両端をはじめとして、 V_L 領域および／または V_H 領域のどこに存在してもよいが、ただし、各CDRが含む変化はゼロであるか、多くても1個、2個、または3個である。いくつかの実施形態では、この改変された V_L 領域および／または V_H 領域を含有する結合ドメインは、尚も、親結合ドメインと同様またはそれを超える親和性でその標的と特異的に結合できる。

【0138】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の結合ドメインは、抗体由来であり、重鎖可変領域(V_H)と軽鎖可変領域(V_L)とを含む。例として、 V_H 鎖および V_L 鎖を含むscFvが挙げられる。これらの結合ドメインおよび可変領域鎖の配置の順番は、標的への結合性がいくらかでも保持される限り、特に限定はされない。例えば、可変ドメインは以下の順番で配置され得る： $V_H5T4-V_L5T4-V_H4-1BB-V_L4-1BB$ ； $V_L5T4-V_H5T4-V_H4-1BB-V_L4-1BB$ ； $V_H5T4-V_L5T4-V_L4-1BB-V_H4-1BB$ ； $V_L5T4-V_H5T4-V_L4-1BB-V_H4-1BB$ ； $V_H4-1BB-V_L4-1BB-V_H5T4-V_L5T4$ ； $V_L4-1BB-V_H4-1BB-V_L5T4-V_H5T4$ ；または $V_L4-1BB-V_H4-1BB-V_H5T4-V_L5T4$ 。4-1BBに結合する結合ドメインおよび／または5T4に結合する結合ドメインにおける V_H 領域および V_L 領域の対は、一本鎖抗体(scFv)のフォーマットをとり得る。

【0139】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、scFvsである結合ドメインを含む。そのような実施形態では、前記結合ドメインはscFvドメインと称される場合がある。いくつかの実施形態では、目的の標的に対し特異的な V_H 領域および V_L 領域を含む一本鎖Fvフラグメント(scFv)が結合ドメインとなる。特定の実施形態では、これらの V_H 領域および V_L 領域は、ヒトの、またはヒト型化されたものである。いくつかの変形形態では、ペプチドリンカーで連結された V_L 領域および V_H 領域を含む一本鎖Fv(scFv)が結合ドメインとなる。

【0140】

V_L 領域および V_H 領域を連結するためのペプチドリンカーの使用は、当該技術分野において周知であり、この特定の分野の中に多数の刊行物が存在している。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、Gly-Gly-Gly-Gly-Serが3回反復したアミノ酸配列($(Gly_4Ser)_3$)（配列番号96）からなる、15merのものである。他のリンカーも用いられており、ファージディスプレイ技術が、選択的感染性ファージ(selective infective phage)技術と同様に用いられており、適切なリンカー配列が多様化および選択される(Tang et al., J. Biol. Chem. 271, 15682-15686, 1996; Hennecke et al., Protein Eng. 11, 405-410, 1998)。特定の実施形態では、前記 V_L 領域および V_H 領域は、 $n=1\sim5$ である式($Gly_4Ser)_n$ を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーによって連結されている。例えば、本発明の1つの実施形態では、前記リンカーは($Gly_4Ser)_4$ を含む。単一のリンカー（例えば、($Gly_4Ser)_n$)をランダム変異誘発を介して最適化することで、他の好適なリンカーを得ることができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のscFvの V_H 領域は、リンカー配列のN末端側に位置し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のscFvの V_L 領域は、リンカー配列のC末端側に位置し得る。いくつかの実施形態では、前記scFvは、同じ V_H 領域および V_L 領域の配列を同じ配向で含む抗体よりも効率的に5T4および／または4-1BBに結合し得る。特定の実施形態において、前記scFvは、 V_H-V_L 配向でよりも V_L-V_H 配向で5T4および／または4-1BBにより効率的に結合する場合もあれば、逆に V_L-V_H 配向でよりも V_H-V_L 配向でより効率的に結合する場合もある。

【0141】

いくつかの実施形態では、前記ポリペプチドは、前記結合ドメインを連結している（例えば、前記 s c F v ドメインを連結している）結合ドメインリンカーを含む。いくつかの実施形態では、前記結合ドメインリンカーは G l y₄ S e r リンカーである。いくつかの実施形態では、前記結合ドメインリンカーは、G l y - G l y - G l y - G l y - S e r が 4 回反復したアミノ酸配列（（G l y₄ S e r）₃）（配列番号 98）からなる、20mer のものである。いくつかの実施形態において、前記結合ドメインリンカーは、配列番号 86～108 から選択されるアミノ酸配列を含む。他のリンカーも用いられており、ファージディスプレイ技術が、選択的感染性ファージ技術と同様に用いられており、適切なリンカー配列が多様化および選択される（Tang et al., J. Biol. Chem. 271, 15682-15686, 1996; Hennecke et al., Protein Eng. 11, 405-410, 1998）。特定の
10
実施形態では、前記 V L 領域および V H 領域は、n = 1～5 である式（G l y₄ S e r）_n を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーによって連結されている。単一のリンカー（例えば、（G l y₄ S e r）_n）をランダム変異誘発を介して最適化することで、他の好適なリンカーを得ることができる。いくつかの例では、二重特異性分子が、4-1 B B に結合する s c F v に連結された 5 T 4 に結合する s c F v を含み得る。いくつかの実施形態では、二重特異性分子が、ヒンジ領域も定常領域も含まない。

【0142】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、ヒンジをさらに含む。いくつかの実施形態では、前記ヒンジは、野生型免疫グロブリンヒンジ領域内の 1 または複数のシステイン残基が 1 または複数の他のアミノ酸残基（例えば、セリンまたはアラニン）で置換された、改変型の免疫グロブリンヒンジである。例示的な改変型免疫グロブリンヒンジ、カルボキシル末端側リンカー、およびアミノ末端側リンカーは、野生型ヒト I g G 1 ヒンジに存在する 1、2、または 3 個のシステイン残基が、1、2、または 3 個の異なるアミノ酸残基（例えば、セリンまたはアラニン）で置換された、免疫グロブリンヒト I g G 1 ヒンジ領域を包含する。改変型免疫グロブリンヒンジは、さらにプロリンが、別のアミノ酸（例えば、セリンまたはアラニン）で置換されていてもよい。例えば、前述の改変型ヒト I g G 1 ヒンジは、さらに、野生型ヒト I g G 1 ヒンジ領域の 3 個のシステインのカルボキシル末端側に位置するプロリンが、別のアミノ酸残基（例えば、セリン、アラニン）で置換されていてもよい。1つの
20
実施形態では、コアヒンジ領域のプロリンは置換されない。特定の実施形態では、ヒンジポリペプチド、カルボキシル末端側リンカーポリペプチド、またはアミノ末端側リンカーポリペプチドは、野生型ヒト I g G 1 ヒンジ、野生型ヒト I g G 2 ヒンジ、または野生型ヒト I g G 4 ヒンジなどの、野生型免疫グロブリンヒンジ領域と、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、または少なくとも 99% 同一な配列を含むか、またはそのような配列である。

【0143】

特定の実施形態では、別のポリペプチド鎖とヘテロ二量体を形成しているポリペプチドに存在するヒンジは、野生型免疫グロブリンヒンジ領域またはその改変型免疫グロブリンヒンジ領域などの免疫グロブリンヒンジであり得る。特定の実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質の一方のポリペプチド鎖のヒンジが、当該ヘテロ二量体の他方のポリペプチド鎖の対応するヒンジと同一である。他の特定の実施形態では、一方の鎖のヒンジが他方の鎖のヒンジと（長さおよび配列において）異なっている。異なる鎖に異なるヒンジがあることで、これらのヒンジが接続されている各結合ドメインの結合親和性に対して、異なる処置を加えることが可能となり、その結果、ヘテロ二量体を、一方の結合ドメインの標的に対して、他方の結合ドメインの標的よりも優先的に結合させることができるようになる。例えば、特定の実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質が、一方の鎖に 4-1 B B 結合ドメ
40
50

インを有し、別の鎖に 5 T 4 結合ドメインを有する。2つの異なる鎖に2つの異なるヒンジがあることで、ヘテロ二量体の、5 T 4 への結合を第一とし、4-1 B B への結合を第二とすることができる。すなわち、このヘテロ二量体は、4-1 B B 発現エフェクター細胞を 5 T 4 発現標的細胞（例えば、5 T 4 を発現している腫瘍またはがん細胞）に動員することで、その 5 T 4 発現細胞の傷害または破壊をもたらすことができる。

【0144】

特定の実施形態では、カルボキシル末端側リンカーまたはアミノ末端側リンカーが、グリシン-セリン（例えば、G l y₄ S e r）リピートを含む可動性リンカー配列である。特定の実施形態では、前記リンカーは、3つの G l y₄ S e r リピート（配列番号 96）と、その後にプロリン残基を含む。特定の実施形態では、前記プロリン残基の後に、グリシン、アルギニン、およびセリンからなる群から選択されるアミノ酸が続く。いくつかの実施形態では、カルボキシル末端側リンカーまたはアミノ末端側リンカーが、配列番号 86～108 から選択される配列を含むか、それからなる。

【0145】

本開示で用いるのに適した、いくつかの例示的なヒンジ、カルボキシル末端側リンカー、およびアミノ末端側リンカーの配列を、下記の表 3 に示す。追加の例示的なヒンジ領域およびリンカー領域が、米国特許出願公開第 2013/0129723 号の配列番号 241～244、601、78、763～791、228、379～434、618～749 に記載されている（これらの配列は参照によって本明細書に援用される）。

表 3：ヒンジおよびリンカーの例

10

20

30

40

50

【表 3】

ヒンジ領域	アミノ酸配列	配列番号
sss(s)-hIgG1ヒンジ	EPKSSDKTHTSPSS	71
csc(s)-hIgG1ヒンジ	EPKSCDKTHTSPPCS	72
ssc(s)-hIgG1ヒンジ	EPKSSDKTHTSPPCS	73
scc(s)-hIgG1ヒンジ	EPKSSDKTHTCPPCS	74
css(s)-hIgG1ヒンジ	EPKSCDKTHTSPSS	75
scs(s)-hIgG1ヒンジ	EPKSSDKTHTCPPSS	76
ccc(s)-hIgG1ヒンジ	EPKSCDKTHTSPPCS	77
ccc(p)-hIgG1ヒンジ	EPKSCDKTHTSPPCP	78
sss(p)-hIgG1ヒンジ	EPKSSDKTHTSPSP	79
csc(p)-hIgG1ヒンジ	EPKSCDKTHTSPPCP	80
ssc(p)-hIgG1ヒンジ	EPKSSDKTHTSPPCP	81
scc(p)-hIgG1ヒンジ	EPKSSDKTHTCPPCP	82
css(p)-hIgG1ヒンジ	EPKSCDKTHTSPSP	83
scs(p)-hIgG1ヒンジ	EPKSSDKTHTCPPSP	84
Scppcp	SCPPCP	85
STD1	NYGGGSGGGGSGGGGSGNS	86
STD2	NYGGGSGGGGSGGGGSGNYGGGSGGGGSGGGGSGNS	87
H1	NS	88
H2	GGGGSGNS	89
H3	NYGGGSGNS	90
H4	GGGGSGGGGSGNS	91
H5	NYGGGSGGGGSGNS	92
H6	GGGGSGGGGSGGGGSGNS	93
H7	GPPCPNS	94
Gly ₄ Ser	GGGS	95
(G ₄ S) ₃	GGGGSGGGGSGGGGSG	96
H105	SGGGGSGGGGSGGGGSG	97
(G ₄ S) ₄	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG	98
H75(NKG2A四重変異体)	QRHNNSSLNTGTQMAGHSPNS	99
H83 (NKG2A由来)	SSLNTGTQMAGHSPNS	100
H106 (NKG2A由来)	QRHNNSSLNTGTQMAGHS	101
H81 (NKG2D由来)	EVQIPLTESYSPNS	102
H91 (NKG2D由来)	NSLANQEVQIPLTESYSPNS	103
H94	SGGGGSGGGGSGGGGSPNS	104
H111	SGGGGSGGGGSGGGGSPGS	105
H113	SGGGGSGGGGSGGGGSPAS	106
H114	SGGGGSGGGGSGGGGSPS	107
H115	SGGGGSGGGGSGGGGSPSS	108

【0146】

他の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質は、第二の同一でないポリペプチド鎖内の異なるヘテロ二量体形成ドメインとヘテロ二量体化することが可能な、ヘテロ二量体形成ドメインを含む。特定の変形例では、ヘテロ二量体化のための前記第二のポリペプチド鎖は、第二の結合ドメインを含む。従って、本開示の特定の実施形態では、一方が第一結合ドメインを含むポリペプチドを含み、2本目が所望により第二結合ドメインを含む、2本の同一でないポリペプチド鎖が、二量体化して、ヘテロ二量体結合タンパク質を形成している。二量体形成／ヘテロ二量体形成ドメインは、2本の同一でないポリペプチド鎖からのヘテロ二量体形成が望まれ、片方または両方のポリペプチド鎖が結合ドメインを含む場合に、使用できる。特定の実施形態では、本明細書に記載の特定のヘテロ二量体の一方のポリペプチド鎖メンバーが、結合ドメインを含有しない。ヘテロ二量体の種類の例として、米国特許出願公開第2013/0095097号および同第2013/0129723号、PCT国際公開第2016/094873号に記載されるものが挙げられる。

【0147】

特定の実施形態では、前記第一ポリペプチド鎖および第二ポリペプチド鎖は、「免疫グ

ロブリン二量体形成ドメイン」または「免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメイン」を含むことにより、二量体化する。「免疫グロブリン二量体形成ドメイン」または「免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメイン」とは、本明細書では、第二ポリペプチド鎖の異なる免疫グロブリン領域と優先的に相互作用または結合する、第一ポリペプチド鎖の免疫グロブリン領域を指し、この異なる免疫グロブリン領域同士の相互作用が、第一ポリペプチド鎖および第二ポリペプチド鎖のヘテロ二量体化（すなわち、2本の異なるポリペプチド鎖間の二量体、別名「ヘテロ二量体」、の形成）の実質的な一因となり、またはそれを効率的に促進する。ヘテロ二量体の各ポリペプチド鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは、互いに異なっていることで、両方の鎖によるヘテロ二量体化を促進し、どちらかの鎖によるホモ二量体化を最小限にするように、異なる改変を加えることができる。本明細書において提供される免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは、異なるポリペプチド間の効率的なヘテロ二量体化を可能にし、得られるヘテロ二量体タンパク質の精製を容易にする。

【0148】

本明細書で提供されるように、本開示に係る2本の異なるポリペプチド鎖のヘテロ二量体化の促進に有用な免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは、野生型および改変型の免疫グロブリンのCH1ドメインおよびCLドメイン、例えばヒトのCH1ドメインおよびCLドメイン、を含む。特定の実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインが、例えば、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号114、186～192、および194にそれぞれ記載されるような、または米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号114に記載されるような、野生型のIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、またはIgMのCH1ドメインなどの、野生型CH1ドメインである（前記配列は参照によって本明細書に援用される）。別の実施形態では、改変型CH1ドメインと野生型CLドメインとの間でジスルフィド結合が形成されないように、野生型免疫グロブリンCLドメイン（例えば、ヒトCL）とのジスルフィド結合形成に関与する野生型CH1ドメイン（例えば、ヒトCH1）のシステイン残基が、改変型免疫グロブリンCH1ドメインで欠失または置換されている。

【0149】

特定の実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは、例えば、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号112および配列番号113（前記配列は参照によって本明細書に援用される）にそれぞれ記載されるような、野生型Cκドメインまたは野生型Cλドメインなどの、野生型CLドメインである。別の実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは、改変型Cκドメインまたは改変型Cλドメインなどの改変型免疫グロブリンCLドメインであり、例えば、改変型ヒトCκドメインまたは改変型ヒトCλドメインである。特定の実施形態では、前記改変型免疫グロブリンCLドメイン、例えば米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号141に記載のCκドメインまたは米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号140に記載のCλドメイン（前記配列は参照によって本明細書に援用される）において、野生型免疫グロブリンCH1ドメインとのジスルフィド結合の形成に関与する野生型CLドメインのシステイン残基が欠失または置換されている。特定の実施形態では、前記改変型Cκドメインにおいて、前記野生型ヒトCκドメインの最後のシステインのみが欠失しているが、これは、カルボキシル末端にアルギニンを有し且つ改変型Cκドメインのアミノ末端を別のドメイン（例えば、免疫グロブリンCH2ドメインおよび免疫グロブリンCH3ドメインを含む小領域などの、免疫グロブリン小領域）と連結させるリンカーによって、前記野生型ヒトCκドメインから欠失した第1アルギニンが供給され得るためである。

【0150】

別の実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは、Cκ-Cκ境界における鎖間水素結合ネットワークの形成に関与し得る位置において、野生型Cκドメインと

10

20

30

40

50

比較して1または複数のアミノ酸置換を含有する、改変型Cκドメインである。例えば、特定の実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは、N29位、N30位、Q52位、V55位、T56位、S68位、またはT70位の1または複数のアミノ酸が異なるアミノ酸で置換された改変型ヒトCκドメインである。アミノ酸の付番は、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号141（前記配列は参照によって本明細書に援用される）に記載の改変型ヒトCκ配列における位置に基づいている。特定の実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは、N29位、N30位、V55位、またはT70位に1、2、3、または4つのアミノ酸置換を有する改変型ヒトCκドメインである。上記位置の置換基として使用されるアミノ酸は、アラニンか、または、アルギニン、トリプトファン、チロシン、グルタミン酸、グルタミン、リジン、アスパラギン酸、メチオニン、セリンもしくはフェニルアラニンなどの側鎖部分に嵩があるアミノ酸残基であり得る。改変型ヒトCκドメインは、CH1ドメインとのヘテロ二量体化を促進するが、別のCκドメインとのホモ二量体化は最小限にするものである。改変型ヒトCκドメインの代表的なものとして、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号142～178；米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号160（N29W V55A T70A）、配列番号161（N29Y V55A T70A）、配列番号202（T70E N29A N30A V55A）、配列番号167（N30R V55A T70A）、配列番号168（N30K V55A T70A）、配列番号170（N30E V55A T70A）、配列番号172（V55R N29A N30A）、配列番号175（N29W N30Y V55A T70E）、配列番号176（N29Y N30Y V55A T70E）、配列番号177（N30E V55A T70E）、配列番号178（N30Y V55A T70E）、配列番号838（N30D V55A T70E）、配列番号839（N30M V55A T70E）、配列番号840（N30S V55A T70E）、および配列番号841（N30F V55A T70E）（前記配列は参照によって本明細書に援用される）に記載のものがある。

【0151】

特定の実施形態では、本明細書に記載のCκドメインの変異に加えて、またはその代わりに、ポリペプチドヘテロ二量体の免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインの両方（すなわち、免疫グロブリンCH1ドメインおよび免疫グロブリンCLドメイン）が変異を有し、その結果、得られた免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインが、変異部位のアミノ酸残基間で塩橋（すなわち、イオン性相互作用）を形成する。例えば、ポリペプチドヘテロ二量体の免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは、変異型CH1ドメインと変異型Cκドメインとの組み合わせであり得る。前記変異型CH1ドメインでは、野生型ヒトCH1ドメインの68位のバリン（V68）が負電荷を有するアミノ酸残基（例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸）で置換されており、最初のアルギニンと最後のシステインが欠失している変異型ヒトCκドメインの29位のロイシン（L29）が正電荷を有するアミノ酸残基（例えば、リジン、アルギニンまたはヒスチジン）で置換されている。得られた変異型CH1ドメインの負電荷を有するアミノ酸残基と、得られた変異型Cκドメインの正電荷を有するアミノ酸残基と、の間の電荷間の相互作用により、塩橋が形成され、この塩橋が変異型CH1ドメインと変異型Cκドメインとの間のヘテロ二量体の境界面を安定化させる。あるいは、野生型CH1のV68が正電荷を有するアミノ酸残基で置換され、最初のアルギニンおよび最後のシステインが欠失している変異型ヒトCκドメインのL29が負電荷を有するアミノ酸残基で置換されていてもよい。V68が負電荷または正電荷を有するアミノ酸で置換されている変異型CH1配列の例として、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号844および配列番号845（前記配列は参照によって本明細書に援用される）に記載のものがある。L29が負電荷または正電荷を有するアミノ酸で置換されている変異型Cκ配列の例として、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号842および配列番号843（前記配列は参照によって本明細書に援用される）に記載のものがある。

【0152】

ＣＨ１ドメインのＶ６８およびＣκドメインのＬ２９の変異に加えて、またはその代わりに、ヒトＣＨ１ドメインのＶ６８およびヒトＣκドメインのＬ２９以外の位置で、相反する電荷を有するアミノ酸による置換を行って、それらのアミノ酸間にイオン性相互作用を生み出すことができる。そのような位置は、あらゆる好適な方法で特定することができ、そのような方法としては、ランダム変異誘発、ＣＨ１－Ｃκ対の結晶構造解析によるＣＨ１－Ｃκ境界面に位置するアミノ酸残基の特定、さらに、一連の判定基準（例えば、イオン性相互作用に対する関与傾向、パートナーになり得る残基との近接性など）を用いたＣＨ１－Ｃκ境界面に位置するアミノ酸残基間の適切な位置の特定、が挙げられる。

【０１５３】

特定の実施形態では、本開示のポリペプチドヘテロ二量体は、免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインを一對だけ含有する。例えば、ポリペプチドヘテロ二量体の第一鎖が免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインとしてＣＨ１ドメインを含み、第二鎖が免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインとしてＣＬドメイン（例えば、ＣκまたはＣλ）を含み得る。あるいは、第一鎖が免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインとしてＣＬドメイン（例えば、ＣκまたはＣλ）を含み、第二鎖が免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインとしてＣＨ１ドメインを含み得る。本明細書に記載されるように、第一鎖および第二鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは、互いに結合することで、本開示のヘテロ二量体タンパク質を形成することが可能である。

【０１５４】

他の特定の実施形態では、本開示のヘテロ二量体タンパク質は２対の免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインを有し得る。例えば、ヘテロ二量体の第一鎖が２つのＣＨ１ドメインを含み、第二鎖が前記第一鎖内の２つのＣＨ１ドメインと結合する２つのＣＬドメインを有し得る。あるいは、第一鎖が２つのＣＬドメインを含み、第二鎖が前記第一鎖内の２つのＣＬドメインと結合する２つのＣＨ１ドメインを有し得る。特定の実施形態では、第一ポリペプチド鎖がＣＨ１ドメインおよびＣＬドメインを含み、第二ポリペプチド鎖が前記第一ポリペプチド鎖内のＣＨ１ドメインおよびＣＬドメインとそれぞれ結合するＣＬドメインおよびＣＨ１ドメインを含む。

【０１５５】

ヘテロ二量体タンパク質が１つのみのヘテロ二量体化対（すなわち、各鎖に１つの免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメイン）を含む実施形態では、各鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは、その鎖の免疫グロブリン定常領域のアミノ末端側に位置し得る。あるいは、各鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは、その鎖の免疫グロブリン定常領域のカルボキシル末端側に位置し得る。

【０１５６】

ヘテロ二量体タンパク質が２つのヘテロ二量体化対（すなわち、各鎖に２つの免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメイン）を含む実施形態では、各鎖の両方の免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインが、その鎖の免疫グロブリン定常領域のアミノ末端側に位置し得る。あるいは、各鎖の両方の免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインが、その鎖の免疫グロブリン定常領域のカルボキシル末端側に位置し得る。別の実施形態では、各鎖の一方の免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインがその鎖の免疫グロブリン定常領域のアミノ末端側に位置し、各鎖の他方の免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインがその鎖の免疫グロブリン定常領域のカルボキシル末端側に位置し得る。言い換えれば、これらの実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、各鎖の２つの免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインの間に挿入されている。

【０１５７】

本明細書で示されるように、いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドおよびタンパク質（例えば、５Ｔ４結合ポリペプチド、４－１ＢＢ結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、ポリペプチド鎖に免疫グロブリン定常領域（別名、定常領域、Ｆｃドメイン、Ｆｃ領域など）をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記免疫グロブリン定常領域は、配列番号１５８のアミノ酸配列、配列番号１６０のアミノ

10

20

30

40

50

酸配列、またはそのバリエーションを含む。免疫グロブリン定常領域が含まれることで、本発明のポリペプチドおよびタンパク質の、対象への投与後の循環血液からのクリアランスが遅くなる。変異または他の変化により、免疫グロブリン定常領域は、ポリペプチドのエフェクター機能（例えば、ADCC、ADCP、CDC、補体結合、およびFc受容体への結合）の比較的容易なさらなる調節を可能にし、エフェクター機能は、当該技術分野において公知であり且つ本明細書に記載の、治療対象の疾患に基づいて増加または減少され得る。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質は、これらのエフェクター機能のうちの1または複数を調節することが可能な免疫グロブリン定常領域を含む。他の実施形態では、これらのエフェクター機能のうちの1または複数が、対応する野生型免疫グロブリン定常領域と比較して、本開示の、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質の免疫グロブリン定常領域では、低減しているか、または存在しない。例えば、例えば4-1BB結合ドメインを含むことなどにより、エフェクター細胞の活性化を増強するように設計された、二量体型の5T4結合ポリペプチドまたは4-1BB結合ポリペプチドの場合、免疫グロブリン定常領域は、対応する野生型免疫グロブリン定常領域と比較して、エフェクター機能が低減されているか、エフェクター機能がないことが好ましい。

【0158】

本開示のポリペプチドおよびタンパク質（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）に存在する免疫グロブリン定常領域は、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH4ドメイン、またはこれらのあらゆる組み合わせ、の一部または全てを含むか、またはそれに由来し得る。例えば、免疫グロブリン定常領域は、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインの両方、CH3ドメインおよびCH4ドメインの両方、2つのCH3ドメイン、CH4ドメイン、2つのCH4ドメイン、並びにCH2ドメインおよびCH3ドメインの一部を含み得る。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質は、CH1ドメインを含まない。

【0159】

本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質は、免疫グロブリンの特定のクラスもしくはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、またはIgD）由来、または様々な種（ヒト、マウス、ラット、および他の哺乳類を含む）由来の、野生型免疫グロブリンCH2ドメインまたは改変型免疫グロブリンCH2ドメインを含み得る。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質のCH2ドメインは、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号115、199～201、および195～197（前記配列は参照によって本明細書に援用される）にそれぞれ記載されるヒトのIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、またはIgDの野生型CH2ドメインなどの、野生型ヒト免疫グロブリンCH2ドメインである。特定の実施形態では、前記CH2ドメインは、米国特許出願公開第2013/0129723号（前記配列は参照によって本明細書に援用される）の配列番号115に記載の野生型ヒトIgG1 CH2ドメインである。

【0160】

特定の実施形態では、本開示のポリペプチドまたはタンパク質の改変型CH2領域は、野生型のヒトのIgG1、IgG2、もしくはIgG4、またはマウスIgG2a（例えば、IGHG2c）のCH2領域などの、野生型免疫グロブリンCH2領域と少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一の配列を含むか、そのような配列である。

【0161】

本開示のポリペプチドまたはタンパク質の改変型免疫グロブリンCH2領域（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、様々な種（ヒト、マウス、ラット、および他の哺乳類を含む）由来の

10

20

30

40

50

、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、およびI g Dなどの、様々な免疫グロブリンアイソタイプの、C H 2領域に由来し得る。特定の実施形態では、本開示の融合タンパク質の改変型免疫グロブリンC H 2領域は、米国特許出願公開第2 0 1 3 / 0 1 2 9 7 2 3号（前記配列は参照によって本明細書に援用される）の、配列番号1 1 5、1 9 9、2 0 1、および3 2 0にその配列が記載される、ヒトのI g G 1、I g G 2もしくはI g G 4、またはマウスI g G 2 a（例えば、I G H G 2 c）の、C H 2領域に由来し得る。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質（例えば、5 T 4結合ポリペプチド、4-1 B B結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）の改変型C H 2ドメインは、A D C C、A D C P、C D C、補体結合、F c受容体結合、またはこれらのあらゆる組み合わせなどの、免疫学的活性（すなわち、エフェクター機能）を増強または低減する、当該技術分野において公知の変異を有する、改変型ヒトI g G 1 C H 2ドメインである。

【0 1 6 2】

特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質のC H 2ドメインは、1または複数のアミノ酸の欠失または置換を含む改変型免疫グロブリンC H 2領域（例えば、改変型ヒトI g G 1 C H 2ドメイン）である。いくつかの実施形態では、前記C H 2ドメインは、2 9 7位のアスパラギンにおけるアミノ酸置換（例えば、アスパラギンのアラニンへのアミノ酸置換）を含む。このようなアミノ酸置換は、この部位でのグリコシル化を低減または排除し、F cのF c γ RおよびC 1 qへの効率的な結合を抑止する。2 9 7位のA s nがA l aに置換された改変型ヒトI g G 1 C H 2ドメインの配列は、米国特許出願公開第2 0 1 3 / 0 1 2 9 7 2 3号の配列番号3 2 4（前記配列は参照によって本明細書に援用される）に記載されたものである。いくつかの実施形態では、前記改変型C H 2ドメインは、2 3 4～2 3 8位において少なくとも1つの置換または欠失を含む。例えば、免疫グロブリンC H 2領域は、2 3 4位、2 3 5位、2 3 6位、2 3 7位、もしくは2 3 8位；2 3 4位および2 3 5位；2 3 4位および2 3 6位；2 3 4位および2 3 7位；2 3 4位および2 3 8位；2 3 4～2 3 6位；2 3 4位、2 3 5位および2 3 7位；2 3 4位、2 3 6位および2 3 8位；2 3 4位、2 3 5位、2 3 7位、および2 3 8位；2 3 6～2 3 8位；または2 3 4～2 3 8位の2個、3個、4個、もしくは5個のアミノ酸のあらゆる他の組み合わせに、置換を含み得る。いくつかの実施形態では、改変型C H 2領域は、2 3 4～2 3 8位に1または複数（例えば、2個、3個、4個、または5個）のアミノ酸欠失を含み、例えば、2 3 6位または2 3 7位の一方にアミノ酸欠失を含み、他方は置換されている。特定の実施形態では、2 3 4～2 3 8位の1または複数におけるアミノ酸残基は、1または複数のアラニン残基で置換されている。別の実施形態では、2 3 4～2 3 8位のアミノ酸残基のうち1つのみが欠失しており、2 3 4～2 3 8位の1または複数の残りのアミノ酸は別のアミノ酸（例えば、アラニンまたはセリン）で置換されている場合がある。

【0 1 6 3】

いくつかの実施形態では、上記の変異は、前記改変型C H 2ドメインを含むポリペプチドのA D C C活性またはF c受容体結合能を低減または排除する。

【0 1 6 4】

他の特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質のC H 2ドメインは、2 5 3位、3 1 0位、3 1 8位、3 2 0位、3 2 2位、および3 3 1位に1または複数のアミノ酸置換を含む改変型免疫グロブリンC H 2領域（例えば、改変型ヒトI g G 1 C H 2ドメイン）である。例えば、免疫グロブリンC H 2領域は、2 5 3位、3 1 0位、3 1 8位、3 2 0位、3 2 2位、または3 3 1位に、3 1 8位および3 2 0位、3 1 8位および3 2 2位に、3 1 8位、3 2 0位および3 2 2位に、または、2 5 3位、3 1 0位、3 1 8位、3 2 0位、3 2 2位、および3 3 1位における2個、3個、4個、5個もしくは6個のアミノ酸の他のあらゆる組み合わせに、置換を含み得る。そのような実施形態では、上記の変異は、前記改変型C H 2ドメインを含むポリペプチドのC D C活性を低減または排除する。

【0165】

他の特定の実施形態では、297位のアミノ酸置換に加えて、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質の改変型CH2領域（例えば、改変型ヒトIgG1 CH2ドメイン）は、234～238位に1または複数（例えば、2個、3個、4個、または5個）の追加の置換をさらに含み得る。例えば、免疫グロブリンCH2領域は、234位および297位に、234位、235位、および297位に、234位、236位および297位に、234～236位および297位に、234位、235位、237位および297位に、234位、236位、238位および297位に、234位、235位、237位、238位および297位に、236～238位および297位に、または、297位に加えて234～238位における2個、3個、4個、もしくは5個のアミノ酸の他のあらゆる組み合わせに、置換を含み得る。さらに、またはあるいは、改変型CH2領域は、236位または237位など、234～238位に1または複数（例えば、2個、3個、4個、または5個）のアミノ酸欠失を含み得る。この追加の変異は、前記改変型CH2ドメインを含むポリペプチドのADCC活性またはFc受容体結合能を低減または排除する。特定の実施形態では、234～238位の1または複数におけるアミノ酸残基は、1または複数のアラニン残基で置換されている。別の実施形態では、234～238位のアミノ酸残基のうち1つのみが欠失しており、234～238位の1または複数の残りのアミノ酸は別のアミノ酸（例えば、アラニンまたはセリン）で置換されている場合がある。

10

【0166】

特定の実施形態では、234～238位における1または複数（例えば、2個、3個、4個、または5個）のアミノ酸置換に加えて、本開示の融合タンパク質の、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質の変異型CH2領域（例えば、改変型ヒトIgG1 CH2ドメイン）は、補体結合に関与する1または複数の位置（例えば、I253位、H310位、E318位、K320位、K322位、またはP331位）において、1または複数（例えば、2個、3個、4個、5個、または6個）の追加のアミノ酸置換（例えば、アラニンによる置換）を含有し得る。変異型免疫グロブリンCH2領域の例としては、234位、235位、237位（存在する場合）、318位、320位、および322位にアラニン置換を有する、ヒトのIgG1、IgG2、IgG4のCH2領域、およびマウスIgG2aのCH2領域が挙げられる。例示的な変異型免疫グロブリンCH2領域は、L234、L235、G237、E318、K320、およびK322にアラニン置換を有するマウスIGHG2c CH2領域である。

20

30

【0167】

さらに別の実施形態では、297位のアミノ酸置換および234～238位の追加の欠失または置換に加えて、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質の改変型CH2領域（例えば、改変型ヒトIgG1 CH2ドメイン）は、253位、310位、318位、320位、322位、および331位に1または複数（例えば、2個、3個、4個、5個、または6個）の追加の置換をさらに含み得る。例えば、免疫グロブリンCH2領域は、（1）297位の置換と、（2）234～238位における1または複数の置換または欠失またはその組み合わせと、を含み、さらに、I253位、H310位、E318位、K320位、K322位、およびP331位に1または複数（例えば、2個、3個、4個、5個、または6個）のアミノ酸置換（例えば、E318位、K320位およびK322位における1個、2個、3個の置換など）を含み得る。上記位置におけるアミノ酸はアラニンまたはセリンで置換されていてもよい。

40

【0168】

特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質の免疫グロブリンCH2領域は、（i）297位のアスパラギンのアミノ酸置換、および234位、235位、236位もしくは237位の1個のアミノ酸置換；（ii）297位のアスパラギンのアミノ酸置換、および234～237位のうち2つのアミノ酸置換；（iii）297位のアスパラギンのアミノ酸置換、および234～237位のうち3つのアミノ酸置換；（iv）297位のアスパラギンのアミノ酸置換、234位、235位、および237

50

位のアミノ酸置換、並びに236位のアミノ酸欠失；(v) 234～237位のうち3つのアミノ酸置換、並びに318位、320位、および322位のアミノ酸置換；または、(vi) 234～237位のうち3つのアミノ酸置換、236位のアミノ酸欠失、並びに318位、320位、および322位のアミノ酸置換、を含む。

【0169】

297位のアスパラギンのアミノ酸置換を有する、例示的な改変型免疫グロブリンCH2領域としては、L234、L235、G237、およびN297にアラニン置換、並びにG236に欠失を有するヒトIgG1 CH2領域（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号325）、V234、G236、およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG2 CH2領域（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号326）、F234、L235、G237、およびN297にアラニン置換、並びにG236に欠失を有するヒトIgG4 CH2領域（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号322）、F234およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG4 CH2領域（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号343）、L235およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG4 CH2領域（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号344）、G236およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG4 CH2領域（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号345）、並びに、G237およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG4 CH2領域（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号346）が挙げられる。これらのCH2領域は本開示のポリペプチド（例えば、5T4結合ポリペプチドおよび／または二重特異性4-1BBポリペプチド）に用いることができる。

【0170】

特定の実施形態では、上記のアミノ酸置換に加えて、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質の改変型CH2領域（例えば、改変型ヒトIgG1 CH2ドメイン）は、上記の位置以外の1または複数の位置に、1または複数の追加のアミノ酸置換を含有し得る。そのようなアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換であっても非保存的アミノ酸置換であってもよい。例えば、特定の実施形態では、改変型IgG2 CH2領域において、P233がE233に変化している場合がある（例えば、参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号326を参照）。さらに、またはあるいは、特定の実施形態では、前記改変型CH2領域は、1または複数のアミノ酸の挿入、欠失、またはその両方、を含み得る。これらの挿入、欠失、または置換は、ヒンジを介してCH2領域が別の領域（例えば、結合ドメインまたは免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメイン）と連結されることにより生じる、野生型免疫グロブリンCH2領域のN末端またはC末端など、免疫グロブリンCH2領域のどこにでも存在し得る。

【0171】

特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質の改変型CH2ドメインは、235位、318位、320位、および322位にアラニン置換を有し（すなわち、L235A置換、E318A置換、K320A置換、およびK322A置換を有するヒトIgG1 CH2ドメイン）（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号595）、所望により、N297変異（例えば、アラニンへの変異）を有する、ヒトIgG1 CH2ドメインである。他の特定の実施形態では、改変型CH2ドメインは、234位、235位、237位、318位、320位、および322位にアラニン置換を有し（すなわち、L234A置換、L235A置換、G237A置換、E318A置換、K320A置換、およびK322A置換を有するヒトIgG1 CH2ドメイン）（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号596）、所望によりN297変異（例

例えば、アラニンへの変異)を有する、ヒトIgG1 CH2ドメインである。

【0172】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質(例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および/またはその多特異的結合タンパク質)の免疫グロブリン定常領域は、EU付番方式に従う、L234A置換、L235A置換、G237A置換、およびK322A置換を含むヒトIgG1 CH2ドメインを含む。

【0173】

本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質(例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および/またはその多特異的結合タンパク質)の免疫グロブリン定常領域を形成し得るCH3ドメインは、様々な種(ヒト、マウス、ラット、および他の哺乳類を含む)の、特定の免疫グロブリンクラスまたは免疫グロブリンサブクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM)由来の、野生型免疫グロブリンCH3ドメインまたはその改変型免疫グロブリンCH3ドメインであり得る。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド(例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および/またはその多特異的結合タンパク質)のCH3ドメインは、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号116、208~210、204~207、および212(前記配列は参照によって本明細書に援用される)にそれぞれ記載されるヒトのIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、またはIgMの野生型CH3ドメインなどの、野生型ヒト免疫グロブリンCH3ドメインである。特定の実施形態では、前記CH3ドメインは、米国特許出願公開第2013/0129723号(前記配列は参照によって本明細書に援用される)の配列番号116に記載の野生型ヒトIgG1 CH3ドメインである。

【0174】

特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド(例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および/またはその多特異的結合タンパク質)のCH3ドメインは、改変型ヒト免疫グロブリンCH3ドメインであって、例えば、ヒトIgG1抗体、ヒトIgG2抗体、ヒトIgG3抗体、ヒトIgG4抗体、ヒトIgA1抗体、ヒトIgA2抗体、ヒトIgD抗体、ヒトIgE抗体、またはヒトIgM抗体の野生型CH3ドメインに基づく、またはそれに由来する、改変型CH3ドメインなどである。例えば、改変型CH3ドメインは、H433位およびN434位(位置はEU付番に従って付番)に1つまたは2つの変異を有するヒトIgG1 CH3ドメインであり得る。このような位置における変異は補体結合に関与し得る。他の特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド(例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および/またはその多特異的結合タンパク質)の改変型CH3ドメインは、F405位またはY407位に1つまたは2つのアミノ酸置換を有する、ヒトIgG1 CH3ドメインであり得る。このような位置のアミノ酸は、別のCH3ドメインとの相互作用に関与している。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドの改変型CH3ドメインは、ヒトIgG1 CH3ドメインの最後のリジンが欠失した、改変型ヒトIgG1 CH3ドメインであり得る。この改変型CH3ドメインの配列は、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号761(前記配列は参照によって本明細書に援用される)に記載されている。

【0175】

特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質(例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および/またはその多特異的結合タンパク質)は、いわゆる「ノブと穴(knobs-into-holes)」型の変異を含むCH3ドメインを含む(Marvin and Zhu, Acta Pharmacologica Sinica 26:649-58, 2005; Ridgway et al., Protein Engineering 9:617-21, 1996を参照)。より具体的には、CH3/CH3結合に必要な立体的相補性がこれら2つのCH3ドメインを互いに対合させ

10

20

30

40

50

るように、各ポリペプチド鎖の各CH3ドメインに変異が導入され得る。例えば、ポリペプチドヘテロ二量体の一方の一本鎖ポリペプチドのCH3ドメインがT366W変異（小型アミノ酸を大型アミノ酸と置換する「ノブ」型変異）を含有し、当該ポリペプチドヘテロ二量体のもう一方の一本鎖ポリペプチドのCH3ドメインがY407A変異（大型アミノ酸を小型アミノ酸と置換する「穴」型変異）を含有し得る。他の例示的なノブと穴型変異としては、（１）一方のCH3ドメインのT366Y変異、および他方のCH3ドメインのY407T変異、並びに、（２）一方のCH3ドメインのT366W変異、並びに他方のCH3ドメインのT366S変異、L368A変異、およびY407V変異が挙げられる。

【0176】

本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）の免疫グロブリン定常領域を形成し得るCH4ドメインは、IgE分子またはIgM分子由来の野生型免疫グロブリンCH4ドメインまたはその改変型免疫グロブリンCH4ドメインであり得る。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドのCH4ドメインは、野生型ヒト免疫グロブリンCH4ドメインであって、例えば、米国特許出願公開第2013/0129723号の配列番号213および配列番号214（前記配列は参照によって本明細書に援用される）にそれぞれ記載されるヒトIgE分子およびヒトIgM分子の野生型CH4ドメインなどである。特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドのCH4ドメインは、改変型ヒト免疫グロブリンCH4ドメインであって、例えば、IgEまたはIgMのFc領域と関連していることが知られている免疫学的活性を増加または減少させる変異を有する、ヒトIgE分子またはヒトIgM分子のCH4ドメインに基づく、またはそれに由来する改変型CH4ドメインなどである。

【0177】

特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）の免疫グロブリン定常領域は、CH2ドメイン、CH3ドメイン、またはCH4ドメインの組み合わせ（すなわち、CH2、CH3、およびCH4から選択される2つ以上の定常領域ドメイン）を含む。例えば、免疫グロブリン定常領域は、CH2ドメインとCH3ドメインとを含むか、またはCH3ドメインとCH4ドメインとを含み得る。他の特定の実施形態では、前記免疫グロブリン定常領域は、2つのCH3ドメインを含むが、CH2ドメインもCH4ドメインも含まない（すなわち、2つ以上のCH3のみを含む）、免疫グロブリン定常領域であり得る。本明細書に記載のポリペプチドの免疫グロブリン定常領域を形成する複数の定常領域ドメインは、同じ免疫グロブリン分子、または同じクラスの免疫グロブリン分子、または同じサブクラスの免疫グロブリン分子、に基づいているか、それに由来し得る。特定の実施形態では、前記免疫グロブリン定常領域は、IgG CH2-CH3（例えば、IgG1 CH2-CH3、IgG2 CH2-CH3、およびIgG4 CH2-CH3）であり、ヒト（例えば、ヒトIgG1、ヒトIgG2、およびヒトIgG4）CH2CH3であり得る。例えば、特定の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドの免疫グロブリン定常領域は、（１）野生型ヒトIgG1のCH2ドメインおよびCH3ドメイン、（２）N297A置換を有するヒトIgG1 CH2（すなわち、CH2（N297A））および野生型ヒトIgG1 CH3、または（３）ヒトIgG1 CH2（N297A）および最後のリジンが欠失している改変型ヒトIgG1 CH3、を含む。あるいは、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）の複数の定常領域ドメインは、異なる免疫グロブリン分子、または異なるクラスの免疫グロブリン分子、または異なるサブクラスの免疫グロブリン分子、に基づいているか、それに由来し得る。例えば、特定の実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、ヒトIgM CH3ドメインおよびヒトIgG1 CH3ドメインの両方を含む。本明細書に記載のポリペプチドの免疫グロブリン定常領域を形成する複数の定常領域ドメインは

10

20

30

40

50

、直接的に連結している場合もあるし、1または複数（例えば、約2～約10個）のアミノ酸を介して互いに連結している場合もある。

【0178】

本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）に使用できる例示的な免疫グロブリン定常領域は、米国特許出願公開第2013/0129723の配列番号305～309、321、323、341、342、および762（前記配列は参照によって本明細書に援用される）に記載されたものである。本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質に使用できる免疫グロブリン定常領域のさらなる例を下記の表4に記載する。

【表4】

表4：免疫グロブリン定常領域の例

名称	アミノ酸配列	配列番号
SS-Fc ドメイン	SSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFKNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	158
ΔSS-Fc ドメイン	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFKNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	160

【0179】

特定の実施形態では、本明細書に記載のホモ二量体タンパク質またはヘテロ二量体タンパク質（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）の各ポリペプチド鎖の免疫グロブリン定常領域は、互いに同一である。他の特定の実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質の一方のポリペプチド鎖の免疫グロブリン定常領域が、当該ヘテロ二量体の他方のポリペプチド鎖の免疫グロブリン定常領域と異なっている。例えば、ヘテロ二量体タンパク質の一方の免疫グロブリン定常領域が「ノブ」型変異を有するCH3ドメインを含有し、当該ヘテロ二量体タンパク質の他方の免疫グロブリン定常領域が「穴」型変異を有するCH3ドメインを含有し得る。

【0180】

いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、上記の変異のいずれかを含み免疫グロブリン定常領域と、親結合ドメインのアミノ酸配列と比較して1または複数のアミノ酸変異を含む結合ドメインと、を含み得る。例えば、いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、ヒトIgG1 CH2ドメインにL234A変異、L235A変異、G237A変異、およびK322A変異のうちの1または複数の含み免疫グロブリン定常領域と、配列番号38および配列番号46からなる群から選択されるVHドメイン並びに配列番号44、48、および50からなる群から選択されるVLドメインを含む5T4結合ドメインと、を含み得る。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、ヒトIgG1 CH2ドメインにL234A変異、L235A変異、G237A変異、およびK322A変異のうちの1または複数の含み免疫グロブリン定常領域と、配列番号14のVHドメインアミノ酸配列および配列番号16のVLドメインアミノ酸配列を含む41BB結合ドメインと、を含み得る。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドは、ヒトIgG1 CH2ドメインにL234A変異、L235A変異、G237A変異、およびK322A変異のうちの1または複数の含み免疫グロブリン定常領域と、配列番号38および配列番号46からなる群から選択されるVHドメイン並びに配列番号44、48、および50からなる群から選択されるVLドメインを含む5T4結合ドメインと、配列番号14のVHドメインアミノ酸配列および配列番号16のVLドメインアミノ酸配列を含む41BB結合ドメインと、を含み得る。

【0181】

本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、それぞれその全体が参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 2 9 7 2 3 号および同第 2 0 1 3 / 0 0 9 5 0 9 7 号で一般に開示された足場を用いて作製されてもよい。本明細書に記載のポリペプチドは、各々が免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインを含む、2つの同一でないポリペプチド鎖を含んでいてもよい。この接続用の免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインが異なっている。1つの実施形態では、前記免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは C H 1 ドメインまたはその誘導体を含む。別の実施形態では、前記免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインは C L ドメインまたはその誘導体を含む。1つの実施形態では、前記 C L ドメインは、C κ もしくは C λ アイソタイプ、またはその誘導体である。

10

【0182】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、他の 5 T 4 結合ポリペプチドまたは 4-1 B B 結合ポリペプチドと比較して、改善された特徴を有し得る。例えば、本発明の 5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、またはその多特異性タンパク質は、異なる 5 T 4 結合ポリペプチドおよび／または 4-1 B B 結合ポリペプチドの等電点と比較して、等電点の低下を示し得る。「等電点」または「p I」とは、実効電荷がゼロになる pH である。タンパク質の等電点は、あらゆる好適な方法で、例えば分析用キャピラリー等電点電気泳動クロマトグラフィーで、測定することができる。

20

【0183】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、従来公知の 5 T 4 結合性ドメインおよび／もしくは 4-1 B B 結合性ドメイン、並びに／または、5 T 4 結合性の親ドメインもしくは親タンパク質および／もしくは 4-1 B B 結合性の親ドメインもしくは親タンパク質よりも高い親和性で、5 T 4（例えば、ヒト 5 T 4）および／または 4-1 B B に結合し得る。いくつかの実施形態では、5 T 4 結合性のドメインもしくはポリペプチドおよび／または 4-1 B B 結合性のドメインもしくはポリペプチドの解離定数は、約 2 ~ 5 n M であり得る。特定の実施形態では、5 T 4 結合性のドメインもしくはポリペプチドおよび／または 4-1 B B 結合性のドメインもしくはポリペプチドの解離速度（off rate）は、従来公知の抗体もしくは s c F v コンストラクト、または 5 T 4 結合性の親ドメインもしくは親タンパク質および／もしくは 4-1 B B 結合性の親ドメインもしくは親タンパク質の解離速度と比較して、1 / 4 ~ 1 / 1 0 倍に減少し得る。

30

【0184】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、ポリペプチドまたはタンパク質の組み換え発現時に生成される、低レベルの高分子量集合体を有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドおよびタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、ポリペプチドまたはタンパク質内に存在するドメインの組み合わせに依存して、ヒト血清中でより長期の安定性を示し得る。

40

【0185】

5 T 4 結合ドメインおよびそれを含むタンパク質

いくつかの実施形態では、本発明は、5 T 4（例えばヒト 5 T 4）に特異的に結合する 5 T 4 結合ドメインを提供する。いくつかの実施形態では、本発明はさらに、5 T 4 結合ドメインを含むポリペプチド（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド）を提供する。特定の変異形態では、前記 5 T 4 結合ポリペプチドは、前記 5 T 4 結合ドメインのカルボキシル末端側にヒンジ領域を含み、さらに免疫グロブリン定常領域を含む。さらなる変異形態では

50

、前記 5 T 4 結合ポリペプチドは、前記免疫グロブリン定常領域のカルボキシル末端側にカルボキシル末端結合ドメインリンカーを含み、さらに、前記カルボキシル末端側リンカーのカルボキシル末端側に第二結合ドメインを含む。さらに他の変更形態では、5 T 4 結合ポリペプチドは、前記 5 T 4 結合ドメインを含むポリペプチドのアミノ末端側にヒンジ領域を含み、さらに、前記ヒンジ領域のアミノ末端側に免疫グロブリン定常 (immunoglobulin constant) を含む。

【0186】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の 5 T 4 結合ドメインは、5 T 4 の細胞外ドメイン上に位置するエピトープ（例えば、配列番号 168 の中に含まれるエピトープ）と結合する。特定の態様では、このエピトープは非連続的且つ／または立体構造のエピトープである。

10

【0187】

5 T 4 結合ドメインポリペプチドは、ヒト 5 T 4 に特異的に結合し、重鎖 CDR1 (H CDR1)、H CDR2、H CDR3、軽鎖 CDR1 (L CDR1)、L CDR2、および L CDR3 を含み、前記 H CDR1 は配列番号 30、52、および 60 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；前記 H CDR2 は配列番号 32 および 62 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；前記 H CDR3 は配列番号 34 のアミノ酸配列を含み；前記 L CDR1 は配列番号 8、42、および 54 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；前記 L CDR2 は配列番号 10 のアミノ酸配列を含み；前記 L CDR3 は配列番号 36 のアミノ酸配列を含み得る。

20

【0188】

特定の実施形態では、5 T 4 結合ドメインポリペプチドは、ヒト 5 T 4 に特異的に結合し、H CDR1、H CDR2、H CDR3、L CDR1、L CDR2、および L CDR3 を含み、(a) 前記 H CDR1 は配列番号 30 に記載のアミノ酸配列を含み；(b) 前記 H CDR2 は配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含み；(c) 前記 H CDR3 は配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含み；(d) 前記 L CDR1 は配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を含み；前記 L CDR2 は配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を含み；(f) 前記 L CDR3 は配列番号 36 に記載のアミノ酸配列を含み得る。他の特定の実施形態では、5 T 4 結合ドメインポリペプチドは、ヒト 5 T 4 に特異的に結合し、H CDR1、H CDR2、H CDR3、L CDR1、L CDR2、および L CDR3 を含み、(a) 前記 H CDR1 は配列番号 30 に記載のアミノ酸配列を含み；(b) 前記 H CDR2 は配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含み；(c) 前記 H CDR3 は配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含み；(d) 前記 L CDR1 は配列番号 42 に記載のアミノ酸配列を含み；(e) 前記 L CDR2 は配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を含み；(f) 前記 L CDR3 は配列番号 36 に記載のアミノ酸配列を含む。他の特定の実施形態では、5 T 4 結合ドメインポリペプチドは、ヒト 5 T 4 に特異的に結合し、H CDR1、H CDR2、H CDR3、L CDR1、L CDR2、および L CDR3 を含み、(a) 前記 H CDR1 は配列番号 52 に記載のアミノ酸配列を含み；(b) 前記 H CDR2 は配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含み；(c) 前記 H CDR3 は配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含み；(d) 前記 L CDR1 は配列番号 54 に記載のアミノ酸配列を含み；(e) 前記 L CDR2 は配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を含み；(f) 前記 L CDR3 は配列番号 36 に記載のアミノ酸配列を含む。他の特定の実施形態では、5 T 4 結合ドメインポリペプチドは、ヒト 5 T 4 に特異的に結合し、H CDR1、H CDR2、H CDR3、L CDR1、L CDR2、および L CDR3 を含み、(a) 前記 H CDR1 は配列番号 60 に記載のアミノ酸配列を含み；(b) 前記 H CDR2 は配列番号 62 に記載のアミノ酸配列を含み；(c) 前記 H CDR3 は配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含み；(d) 前記 L CDR1 は配列番号 54 に記載のアミノ酸配列を含み；(e) 前記 L CDR2 は配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を含み；(f) 前記 L CDR3 は配列番号 36 に記載のアミノ酸配列を含む。

30

他の特定の実施形態では、5 T 4 結合ドメインポリペプチドは、ヒト 5 T 4 に特異的に結合し、H CDR1、H CDR2、H CDR3、L CDR1、L CDR2、および L CDR3 を含み、(a) 前記 H CDR1 は配列番号 52 に記載のアミノ酸配列を含み；(b) 前記 H CDR2 は配列番号 32 に記載のアミノ酸配列を含み；(c) 前記 H CDR3 は配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含み；(d) 前記 L CDR1 は配列番号 54 に記載のアミノ酸配列を含み；(e) 前記 L CDR2 は配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を含み；(f) 前記 L CDR3 は配列番号 36 に記載のアミノ酸配列を含む。他の特定の実施形態では、5 T 4 結合ドメインポリペプチドは、ヒト 5 T 4 に特異的に結合し、H CDR1、H CDR2、H CDR3、L CDR1、L CDR2、および L CDR3 を含み、(a) 前記 H CDR1 は配列番号 60 に記載のアミノ酸配列を含み；(b) 前記 H CDR2 は配列番号 62 に記載のアミノ酸配列を含み；(c) 前記 H CDR3 は配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含み；(d) 前記 L CDR1 は配列番号 54 に記載のアミノ酸配列を含み；(e) 前記 L CDR2 は配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を含み；(f) 前記 L CDR3 は配列番号 36 に記載のアミノ酸配列を含む。

40

他の特定の実施形態では、5 T 4 結合ドメインポリペプチドは、ヒト 5 T 4 に特異的に結合し、H CDR1、H CDR2、H CDR3、L CDR1、L CDR2、および L CDR3 を含み、(a) 前記 H CDR1 は配列番号 60 に記載のアミノ酸配列を含み；(b) 前記 H CDR2 は配列番号 62 に記載のアミノ酸配列を含み；(c) 前記 H CDR3 は配列番号 34 に記載のアミノ酸配列を含み；(d) 前記 L CDR1 は配列番号 54 に記載のアミノ酸配列を含み；(e) 前記 L CDR2 は配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を含み；(f) 前記 L CDR3 は配列番号 36 に記載のアミノ酸配列を含む。

【0189】

特定の実施形態では、5 T 4 結合ドメインポリペプチドは、配列番号 40、44、48

50

、50、58、68、および70からなる群から選択される軽鎖可変領域（V_L）のアミノ酸配列と少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または100%同一の配列を含むか、またはそのような配列であり、このポリペプチドは、s c F v - F c - s c F v フォーマットの多特異性ポリペプチドであり、V_Lの99位のLCDR1にYからFへの置換、および／またはV_Lの148位のFR3にFからSへの置換を含む。特定の実施形態では、5T4結合ドメインを含むポリペプチドは、配列番号40、44、48、50、58、68、および70からなる群から選択される軽鎖可変領域（V_L）のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、5T4結合ドメインポリペプチドは、配列番号38、46、56、および64からなる群から選択される重鎖可変領域（V_H）のアミノ酸配列を含む。

【0190】

特定の実施形態では、5T4結合ドメインポリペプチドは、配列番号38のアミノ酸配列を含むV_H領域と、配列番号40のアミノ酸配列を含むV_L領域と、を含む。特定の実施形態では、5T4結合ドメインポリペプチドは、配列番号38のアミノ酸配列を含むV_H領域と、配列番号44のアミノ酸配列を含むV_L領域と、を含む。特定の実施形態では、5T4結合ドメインポリペプチドは、配列番号46のアミノ酸配列を含むV_H領域と、配列番号48のアミノ酸配列を含むV_L領域と、を含む。特定の実施形態では、5T4結合ドメインポリペプチドは、配列番号46のアミノ酸配列を含むV_H領域と、配列番号50のアミノ酸配列を含むV_L領域と、を含む。特定の実施形態では、5T4結合ドメインポリペプチドは、配列番号56のアミノ酸配列を含むV_H領域と、配列番号58のアミノ酸配列を含むV_L領域と、を含む。特定の実施形態では、5T4結合ドメインポリペプチドは、配列番号64のアミノ酸配列を含むV_H領域と、配列番号58のアミノ酸配列を含むV_L領域と、を含む。特定の実施形態では、5T4結合ドメインポリペプチドは、配列番号38のアミノ酸配列を含むV_H領域と、配列番号68のアミノ酸配列を含むV_L領域と、を含む。特定の実施形態では、5T4結合ドメインポリペプチドは、配列番号46のアミノ酸配列を含むV_H領域と、配列番号70のアミノ酸配列を含むV_L領域と、を含む。

【0191】

抗5T4結合ドメイン配列の例を表5に示す。

表5：5T4結合ドメインポリペプチドのCDRおよび可変領域のアミノ酸配列およびDNA配列

Construct：コンストラクト Component：成分 Sequence：配列
【表5-1】

Construct	Component	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA sequence	AA SEQ ID
ALG.APV-178	HCDR1	GGCTTCACATTCAGCAGCTATGCT	29	GFTFSSYA	30
	HCDR2	ATCTCCGGCAGCGGCGGAAGCACC	31	ISGSGGST	32
	HCDR3	GCCAGGTACTATGGCGGCTACTACTCCGCCTGGATGGACTAC	33	ARYYGGYSAWMDY	34
ALG.APV-208	LCDR1	CAGTCCATCTCCAGCTAT	7	QSISSY	8
	LCDR2	GCCGCTTCC	9	AAS	10
	LCDR3	CAGCAGACCTATGGCTACCTGCACACC	35	QQTYGYLHT	36

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

Construct	Component	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA sequence	AA SEQ ID
ALG.APV- 179 ALG.APV- 209 ALG.APV- 222	V _H	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGA GGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGA AGCCTGAGGCTGAGCTGCGTGCC TCCGGCTTCACATTCAGCAGCTAT GCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCC CCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTG TCCGCTATCTCCGCGCAGCGCGGA AGCACCTACTACGCTGACTCCGTC AAGGGCAGGTTACCATCAGCCGG GACAAACAGCAAGAACCCTGTAC CTGCAGATGAATAGCCTCAGGGCT GAAGACACCGCTGTGTACTACTGC GCCAGGTACTATGGCGGCTACTAC TCCGCTGGATGGACTACTGGGGA CAGGGCACACTGGTGACCGTGTCC AGC	37	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARYYGG YYSAWMDYWGQGLTVTV SS	38
	V _L	GATATTCAGATGACACAGTCCCCT AGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGA GATCGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCCAGTCCATCTCCAGCTAT TTAAACTGGTACCAGCAGAGAAGCCT GGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATC TACGCCGCTTCCAGCCTCCAGAGC GGCGTGCCCTAGCAGGTTCTCCGGC TCCGGAAGCGGAACAGACTTCACC CTGACCATCAGTCCCCTGCAGCCC GAGGACTCCGCTACCTACTACTGC CAGCAGACCTATGGCTACCTGCAC ACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTG GAGATCAAG	39	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDSAT YYCQQTYYGLHTFGQGT KLEIK	40
	HCDR1	GGCTTCACATTCAGCAGCTATGCT	29	GFTFSSYA	30
	HCDR2	ATCTCCGGCAGCGCGGAAGCACC	31	ISGSGGST	32
	HCDR3	GCCAGGTACTATGGCGGCTACTAC TCCGCTGGATGGACTAC	33	ARYYGGYYSAWMDY	34
	LCDR1	CAGTCCATCTCCAGCTTC	41	QSISSF	42
	LCDR2	GCCGCTTCC	9	AAS	10
	LCDR3	CAGCAGACCTATGGCTACCTGCAC ACC	35	QQTYGYLHT	36
	V _H	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGA GGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGA AGCCTGAGGCTGAGCTGCGTGCC TCCGGCTTCACATTCAGCAGCTAT GCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCC CCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTG TCCGCTATCTCCGCGCAGCGCGGA AGCACCTACTACGCTGACTCCGTC AAGGGCAGGTTACCATCAGCCGG GACAAACAGCAAGAACCCTGTAC CTGCAGATGAATAGCCTCAGGGCT GAAGACACCGCTGTGTACTACTGC GCCAGGTACTATGGCGGCTACTAC TCCGCTGGATGGACTACTGGGGA	37	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARYYGG YYSAWMDYWGQGLTVTV SS	38

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

Construct	Component	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA sequence	AA SEQ ID
ALG.APV- 187 ALG.APV- 210 ALG.APV- 223	V _L	CAGGGCACACTGGTGACCGTGTCC AGC	43	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSFLN WYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDSAT YYCQQTYYGLHTFGQGT KLEIK	44
		GATATTCAGATGACACAGTCCCCT AGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGA GATCGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCCAGTCCATCTCCAGCTTC TTAAACTGGTACCAGCAGAAGCCT GGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATC TACGCCGCTTCCAGCCTCCAGAGC GGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGC TCCGGAAGCGGAACAGACTTCACC CTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCC GAGGACTCCGCTACCTACTACTGC CAGCAGACCTATGGCTACCTGCAC ACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTG GAGATCAAG			
		GGCTTCACATTCAGCAGCTATGCT			
		ATCTCCGGCAGCGCGGAAGCACC			
		GCCAGGTACTATGGCGGCTACTAC TCCGCCTGGATGGACTAC			
		CAGTCCATCTCCAGCTTC			
		GCCGCTTC			
		CAGCAGACCTATGGCTACCTGCAC ACC			
		GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGA GGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGA AGCCTGAGGCTGAGCTGCGTGCC TCCGGCTTCACATTCAGCAGCTAT GCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCC CCTGGAAAGTGCCTGGAGTGGGTG TCCGCTATCTCCGGCAGCGGCGGA AGCACCTACTACGCTGACTCCGTC AAGGGCAGGTTACCATCAGCCGG GACAAACAGCAAGAACCCTGTAC CTGCAGATGAATAGCCTCAGGGCT GAAGACACCGCTGTGTACTACTGC GCCAGGTACTATGGCGGCTACTAC TCCGCCTGGATGGACTACTGGGA CAGGGCACACTGGTGACCGTGTCC AGC			
		GATATTCAGATGACACAGTCCCCT AGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGA GATCGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCCAGTCCATCTCCAGCTTC TTAAACTGGTACCAGCAGAAGCCT GGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATC TACGCCGCTTCCAGCCTCCAGAGC GGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGC TCCGGAAGCGGAACAGACTTCACC CTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCC GAGGACTCCGCTACCTACTACTGC CAGCAGACCTATGGCTACCTGCAC			
	V _H	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGA GGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGA AGCCTGAGGCTGAGCTGCGTGCC TCCGGCTTCACATTCAGCAGCTAT GCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCC CCTGGAAAGTGCCTGGAGTGGGTG TCCGCTATCTCCGGCAGCGGCGGA AGCACCTACTACGCTGACTCCGTC AAGGGCAGGTTACCATCAGCCGG GACAAACAGCAAGAACCCTGTAC CTGCAGATGAATAGCCTCAGGGCT GAAGACACCGCTGTGTACTACTGC GCCAGGTACTATGGCGGCTACTAC TCCGCCTGGATGGACTACTGGGA CAGGGCACACTGGTGACCGTGTCC AGC	45	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKCLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARYYGG YYSAWMDYWGQGLTVT SS	46
	V _L	GATATTCAGATGACACAGTCCCCT AGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGA GATCGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCCAGTCCATCTCCAGCTTC TTAAACTGGTACCAGCAGAAGCCT GGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATC TACGCCGCTTCCAGCCTCCAGAGC GGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGC TCCGGAAGCGGAACAGACTTCACC CTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCC GAGGACTCCGCTACCTACTACTGC CAGCAGACCTATGGCTACCTGCAC	47	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSFLN WYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDSAT YYCQQTYYGLHTFGCGT KLEIK	48

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

Construct	Component	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA sequence	AA SEQ ID
ALG.APV- 191		ACCTTCGGCTGCGGCACAAAGCTG GAGATCAAG			
	HCDR1	GGCTTCACATTGAGCAGCTATGCT	29	GFTFSSYA	30
	HCDR2	ATCTCCGGCAGCGCGGAAGCACC	31	ISGSGGST	32
	HCDR3	GCCAGGTACTATGGCGGCTACTAC TCCGCCTGGATGGACTAC	33	ARYYGGYSAWMDY	34
	LCDR1	CAGTCCATCTCCAGCTTC	41	QSISSE	42
	LCDR2	GCCGCTTCC	9	AAS	10
	LCDR3	CAGCAGACCTATGGCTACCTGCAC ACC	35	QQTYGYLHT	36
	V _H	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGA GGAGGACTGGTGACGCTGGCGGA AGCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCC TCCGGCTTCACATTGAGCAGCTAT GCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCC CCTGGAAAGTGCTGGAGTGGGTG TCCGCTATCTCCGGCAGCGCGGA AGCACCTACTACGCTGACTCCGTC AAGGGCAGGTTCAACATCAGCCGG GACAAACAGCAAGAACCCTGTAC CTGCAGATGAATAGCCTCAGGGCT GAAGACACCGCTGTGTACTACTGC GCCAGGTACTATGGCGGCTACTAC TCCGCCTGGATGGACTACTGGGA CAGGGCACACTGGTGACCGTGTCC AGC	45	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKCLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARYYGG YYSAWMDYWGQGLTVT SS	46
	V _L	GATATTCAGATGACACAGTCCCCT AGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGA GATCGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCCAGTCCATCTCCAGCTTC TTAAACTGGTACCAGCAGAAGCCT GGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATC TACGCCGCTTCCAGCCTCCAGAGC GGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGC TCCGGAAGCGGAACAGACTTCACC CTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCC GAGGACTTCGCTACCTACTACTGC CAGCAGACCTATGGCTACCTGCAC ACCTTCGGCTGCGGCACAAAGCTG GAGATCAAG	49	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSFLN WYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQTYGYLHTFGCGT KLEIK	50
	HCDR1	GGCTTCGACTTCGAGAGCTATGCT	51	GDFDESya	52
	HCDR2	ATCTCCGGCAGCGCGGAAGCACC	31	ISGSGGST	32
	HCDR3	GCCAGGTACTATGGCGGCTACTAC TCCGCCTGGATGGACTAC	33	ARYYGGYSAWMDY	34
ALG.APV- 198	LCDR1	CAGTCCATCAGGAGCGCC	53	QSIRSA	54
	LCDR2	GCCGCTTCC	9	AAS	10
	LCDR3	CAGCAGACCTATGGCTACCTGCAC ACC	35	QQTYGYLHT	36

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

Construct	Component	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA sequence	AA SEQ ID
	V _H	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGA GGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGA AGCCTGAGGCTGAGCTGCGTGCC TCCGGCTTCGACTTCGAGAGCTAT GCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCC CCTGGAAAGTGCCTGGAGTGGGTG TCCGCTATCTCCGGCAGCGCGGA AGCACCTACTACGCTGACTCCGTC AAGGGCAGGTTACCATCAGCCGG GACAAACAGCAAGAACACCCTGTAC CTGCAGATGAATAGCCTCAGGGCT GAAGACACCGCTGTGTACTACTGC GCCAGGTACTATGGCGGCTACTAC TCCGCTGGATGGACTACTGGGGA CAGGCGACACTGGTGACCGTGTCC AGC	55	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFDIESYAM SWVRQAPGKCLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARYYGG YYSAWMDYWGQGLTVTV SS	56
	V _L	GATATTCAGATGACACAGTCCCCT AGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGA GATCGGGTGACCATCACCTGCAGG GCCAGCCAGTCCATCAGGAGCGCC CTGAACTGGTACCAGCAGAGAAGCCT GGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATC TACGCCGCTTCCAGCCTCCAGAGC GGCGTGCTAGCAGGTTCTCCGGC TCCGGAAGCGGAACAGACTTCACC CTGACCATCAGTCCCCTGCAGCCC GAGGACTTCGCTACCTACTACTGC CAGCAGACCTATGGCTACCTGCAC ACCTTCGGCTGCGGCACAAAGCTG GAGATCAAG	57	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIRSA WYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQTYYGLHTFGCGT KLEIK	58
ALG.APV- 199	HCDR1	GGCTTCGACTTCGACAGCTATGCT	59	GFDFDSYA	60
	HCDR2	ATCTCCGGCAGGGCGGAAGCACC	61	ISGRGGST	62
	HCDR3	GCCAGGTACTATGGCGGCTACTAC TCCGCTGGATGGACTAC	33	ARYYGGYSAWMDY	34
	LCDR1	CAGTCCATCAGGAGCGCC	53	QSIRSA	54
	LCDR2	GCCGCTTCC	9	AAS	10
	LCDR3	CAGCAGACCTATGGCTACCTGCAC ACC	35	QQTYYGLHT	36
	V _H	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGA GGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGA AGCCTGAGGCTGAGCTGCGTGCC TCCGGCTTCGACTTCGACAGCTAT GCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCC CCTGGAAAGTGCCTGGAGTGGGTG TCCGCTATCTCCGGCAGGGCGGA AGCACCTACTACGCTGACTCCGTC AAGGGCAGGTTACCATCAGCCGG GACAAACAGCAAGAACACCCTGTAC CTGCAGATGAATAGCCTCAGGGCT GAAGACACCGCTGTGTACTACTGC GCCAGGTACTATGGCGGCTACTAC TCCGCTGGATGGACTACTGGGGA	63	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFDIESYAM SWVRQAPGKCLEWVSAI SGRGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARYYGG YYSAWMDYWGQGLTVTV SS	64

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

Construct	Component	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA sequence	AA SEQ ID
ALG.APV-004	V _L	CAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGC	57	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSIRSA LN WYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQTYGYLHTFGCGT KLEIK	58
		GATATTCAGATGACACAGTCCCT			
		AGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGA			
		GATCGGGTGACCATCACCTGCAGG			
		GCCAGCCAGTCCATCAGGAGCGCC			
		CTGAACTGGTACCAGCAGAAAGCCT			
		GGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATC			
		TACGCCGCTTCCAGCCTCCAGAGC			
		GGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGC			
		TCCGGAAGCGGAACAGACTTCACC			
		CTGACCATCAGTCCCTGCAGCCC			
		GAGGACTTCGCTACCTACTACTGC			
		CAGCAGACCTATGGCTACCTGCAC			
		ACCTTCGGCTGCGGCACAAAGCTG			
		GAGATCAAG			
ALG.APV-004	HCDR1	GGATTCACCTTTAGCAGCTATGCC	29	GFTFSSYA	30
	HCDR2	ATTAGTGGTAGTGGTGGTAGACA	31	ISGSGGST	32
	HCDR3	GCGCGCTACTACGGTGGTTACTAC TCTGCTTGGATGGACTAT	33	ARYYGGYYSAWMDY	34
	LCDR1	CAGAGCATTAGCAGCTAT	7	QSISSY	8
	LCDR2	GCTGCATCC	9	AAS	10
	LCDR3	CAACAGACTTACGGTTACCTGCAC ACT	35	QQTYGYLHT	36
	V _H	GAGGTGCAGCTGCTCGAGAGCGGG	45	EVQLLESQGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKCLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARYYGG YYSAWMDYWGQGLTVTV SS	46
		GGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG			
		TCCCTGCGCCTCTCTGTGCAGCC			
		AGCGGATTACCTTTAGCAGCTAT			
		GCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT			
		CCAGGGAAGTGTCTGGAGTGGGTC			
		TCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGT			
		AGCACATACTATGCAGACTCCGTG			
		AAGGGCCGGTTACCATCTCCCGT			
		GACAATTCCAAGAACACGCTGTAT			
		CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCC			
		GAGGACACGGCIGTATATTATTGT			
		GCGCGCTACTACGGTGGTTACTAC			
		TCTGCTTGGATGGACTATTGGGGC			
		CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCC			
		TCA			
	V _L	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCA TCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGA GACCGCGTCACCATCACTTGCCGG GCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTAT TTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATC TATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGT GGGTCCCATCAGTTTCACTGGC AGTGGAAGCGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT CAACAGACTTACGGTTACCTGCAC	65	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQTYGYLHTFGCGT RLEIK	66

10

20

30

40

50

【表 5 - 7】

Construct	Component	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA sequence	AA SEQ ID
ALG.APV- 006 ALG.APV- 010		ACTTTTGGCTGTGGGACCAGGCTG GAGATCAAA			
	HCDR1	GGATTACCTTTAGCAGCTATGCC	29	GFTFSSYA	30
	HCDR2	ATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACA	31	ISGSGGST	32
	HCDR3	GCGCGCTACTACGGTGGTTACTAC TCTGCTTGGATGGACTAT	33	ARYYGGYSAWMDY	34
	LCDR1	CAGAGCATTAGCAGCTAT	7	QSISSY	8
	LCDR2	GCTGCATCC	9	AAS	10
	LCDR3	CAACAGACTTACGGTTACCTGCAC ACT	35	QQTYGYLHT	36
	V _H	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGG GGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG TCCCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCC AGCGGATTACCTTTAGCAGCTAT GCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTC TCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGT AGCACATACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGGTTACCATCTCCCGT GACAATTCCAAGAACACGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCC GAGGACACGGCTGTATATTATTGT GCGCGCTACTACGGTGGTTACTAC TCTGCTTGGATGGACTATTGGGGC CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCC TCA	37	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARYYGG YYSAWMDYWGQGLTVTV SS	38
	V _L	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCA TCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGA GACCGCGTCACCATCACCTTGCCGG GCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTAT TTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA GGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATC TATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGT GGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGC AGTGGAAGCGGGACAGATTTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT GAAGATTTTGCAACTTATTACTGT CAACAGACTTACGGTTACCTGCAC ACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTG GAGATCAAA	67	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYLN WYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQTYGYLHTFGQGT KLEIK	68
	HCDR1	GGATTACCTTTAGCAGCTATGCC	29	GFTFSSYA	30
	HCDR2	ATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACA	31	ISGSGGST	32
	HCDR3	GCGCGCTACTACGGTGGTTACTAC TCTGCTTGGATGGACTAT	33	ARYYGGYSAWMDY	34
ALG.APV- 014 ALG.APV- 018	LCDR1	CAGAGCATTAGCAGCTAT	7	QSISSY	8
	LCDR2	GCTGCATCC	9	AAS	10
	LCDR3	CAACAGACTTACGGTTACCTGCAC ACT	35	QQTYGYLHT	36
	V _H	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGG GGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG TCCCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCC AGCGGATTACCTTTAGCAGCTAT	45	EVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKCLEWVSAI SGSGGSTYYADSVKGRF	46

10

20

30

40

50

【表 5 - 8】

Construct	Component	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA sequence	AA SEQ ID
		GCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGTGCTGGAGTGGGT TCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGT AGCACATACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGT GACAATTCCAAGAACACGCTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCC GAGGACACGGCTGTATATTATTGT GCGCGCTACTACGGTGGTTACTAC TCTGCTTGGATGGACTATTGGGGC CAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCC TCA		TISRDNKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARYYG YSSAWMDYWGQGLVTV SS	
	V _L	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCA TCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGA GACCGCGTCACCATCACTTGCCGG GCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTAT TTAAATTGGTATCAGCAGAAACCA GGGAAAGCCCTAAGCTCTGTATC TATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGT GGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGC AGTGGAAAGCGGACAGATTCACT CTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT GAAGATTTTGCACTTATTACTGT CAACAGACTTACGGTTACCTGCAC ACTTTGGCTGCGGGACCAAGCTG GAGATCAAA	69	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSISSYL N WYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQTYYGLHTFGCGT KLEIK	70

10

20

【0192】

いくつかの実施形態では、本発明は、5 T 4 結合ドメインを含む多特異性ポリペプチド（例えば、二重特異性ポリペプチド）を提供する。そのような実施形態では、5 T 4 結合性のタンパク質またはポリペプチドが、5 T 4 以外の標的と結合する1または複数の追加の結合ドメイン（例えば、第二結合ドメイン）を含み得る。これらの他の結合ドメインは、例えば、特定のサイトカイン、または前記結合ドメインポリペプチドを特定の細胞型、毒素、追加の細胞受容体、もしくは抗体などに標的化する分子を含み得る。多特異性5 T 4 結合ポリペプチドまたは多特異性5 T 4 結合タンパク質は、2つの結合ドメイン（これらのドメインは同一または異なる標的に特異的に結合するように設計され得る）、ヒンジ領域、リンカー（例えば、カルボキシル末端リンカーまたはアミノ末端側リンカー）、および免疫グロブリン定常領域を含み得る。多特異性5 T 4 結合タンパク質は、2つの同一の、ジスルフィド架橋されたポリペプチドを含むホモ二量体タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、前記5 T 4 結合ドメインは、5 T 4 に結合するモノクローナル抗体に由来し得る。

30

【0193】

本開示のいくつかの実施形態では、5 T 4 結合ポリペプチドは、第二のポリペプチド鎖とヘテロ二量体を形成することが可能であり、（a）免疫グロブリン定常領域のアミノ末端側に接した（例えば、前記免疫グロブリン定常領域がC H 2 ドメインおよびC H 3 ドメインを含む場合の、C H 2 ドメインのアミノ末端側の、または、前記免疫グロブリン小領域がC H 3 ドメインおよびC H 4 ドメインを含む場合の、C H 3 ドメインのアミノ末端側の）ヒンジ領域を含むか、（b）結合ドメイン（例えば、s c F v）と免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインとの間に挟まれた、それらを接続するヒンジ領域を含むか、（c）免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインと免疫グロブリン定常領域（例えば、前記免疫グロブリン定常領域はC H 2 ドメインおよびC H 3 ドメインまたはC H 3 ドメインおよびC H 4 ドメインを含む）との間に挟まれた、それらを接続するヒンジ領域を含むか、（d）免疫グロブリン定常領域と結合ドメインとの間に挟まれた、それらを接続するヒンジ領域を含むか、（e）ポリペプチド鎖のアミノ末端にヒンジ領域を含むか、（f）ポリペプチド鎖のカルボキシル末端にヒンジ領域を含む。本明細書に記載のヒンジ領域を含むポリペプチド鎖は、異なるポリペプチド鎖と結合して、本明細書において提供されるヘテロ

40

50

二量体タンパク質を形成することを可能とし、形成されたヘテロ二量体は標的特異性または特異的な標的結合親和性を保持する結合ドメインを含有することとなる。

【0194】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される5T4結合ポリペプチドは、2つのscFvを含むポリペプチドである。いくつかの実施形態では、前記2つのscFvは5T4結合ドメインを含む。特定の実施形態では、前記2つのscFvは同一の5T4結合ドメインを含む。他の実施形態では、前記2つのscFvは異なる5T4結合ドメインを含む。他の実施形態では、前記ポリペプチドは、第一のscFvとして5T4結合ドメインを含み、第二のscFvとしてエフェクター細胞結合ドメインを含む。例えば、前記エフェクター細胞結合ドメインは4-1BBに特異的なscFvであり得る。

10

【0195】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される5T4結合ポリペプチドは、配列番号118、120、122、124、126、128、130、132、134、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約82%、少なくとも約85%、少なくとも約87%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%同一の抗5T4 scFvを含み、当該ポリペプチドは、scFv-Fc-scFvフォーマットの多特異性ポリペプチドであり、抗5T4 VLの99位のLCDR1にYからFへの置換、および／または抗5T4 VLの148位のFR3にFからSへの置換を含む。いくつかの実施形態では、本明細書において提供される5T4結合ポリペプチドは、配列番号118、120、122、124、126、128、130、132、134、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む抗5T4 scFvを含む。例示的な抗5T4 scFvのアミノ酸配列および核酸配列を下記の表6に記載する。

20

表6：例示的な抗5T4 scFvのアミノ酸配列およびDNA SEQUENCE：DNA配列

Name：名称 Sequence：配列

30

40

50

【表 6 - 1】

Name	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA Sequence	AA SEQ ID
ALG.APV -178 ALG.APV -208 anti-5T4	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGAC TGGTGCAGCCTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAG CTGCGCTGCCTCCGGCTTCACATTCAGCAGC TATGCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCTG GAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGCTATCTC CGGCAGCGCGGAAGCACCTACTACGCTGAC TCCGTCAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGGG ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAATAGCCTCAGGGCTGAAGACACCGCTGTG TACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACT ACTCCGCTGGATGGACTACTGGGGACAGGG CACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGGAGGC GGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGAGGAGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGCTCCGATATTCAGAT GACACAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGC GTGGGAGATCGGGTGACCATCACCTGCAGGG CCAGCCAGTCCATCTCCAGCTATTTAAACTG GTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAAG CTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAGA GCGGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGG AAGCGGAACAGACTTCACCCTGACCATCAGC TCCCTGCAGCCCAGGACTCCGCTACCTACT ACTGCCAGCAGACCTATGGCTACCTGCACAC CTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAGATCAAG	117	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKLEWV SAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC ARYYGGYYSAWMDYWG QGTLVTVSSGGGSGG GGSGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDS ATYYCQQTYGYLHTFG QGTKLEIK	118
ALG.APV -179 ALG.APV. 209 ALG.APV 222 anti-5T4	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGAC TGGTGCAGCCTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAG CTGCGCTGCCTCCGGCTTCACATTCAGCAGC TATGCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCTG GAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGCTATCTC CGGCAGCGCGGAAGCACCTACTACGCTGAC TCCGTCAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGGG ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAATAGCCTCAGGGCTGAAGACACCGCTGTG TACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACT ACTCCGCTGGATGGACTACTGGGGACAGGG CACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGGAGGC GGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGAGGAGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGCTCCGATATTCAGAT GACACAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGC GTGGGAGATCGGGTGACCATCACCTGCAGGG CCAGCCAGTCCATCTCCAGCTTCTTAAACTG GTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAAG CTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAGA GCGGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGG AAGCGGAACAGACTTCACCCTGACCATCAGC TCCCTGCAGCCCAGGACTCCGCTACCTACT	119	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKLEWV SAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC ARYYGGYYSAWMDYWG QGTLVTVSSGGGSGG GGSGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSFLNW YQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDS ATYYCQQTYGYLHTFG QGTKLEIK	120

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

Name	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA Sequence	AA SEQ ID
	ACTGCCAGCAGACCTATGGCTACCTGCACAC CTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAGATCAAG			
ALG.APV -187 ALG.APV. 210 ALG.APV 223 anti-5T4	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGAC TGGTGCAGCCTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAG CTGCGCTGCCTCCGGCTTCACATTACAGCAGC TATGCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCTG GAAAGTGCCTGGAGTGGGTGTCCGCTATCTC CGGCAGCGGCGGAAGCACCTACTACGCTGAC TCCGTCAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGGG ACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGAT GAATAGCCTCAGGGCTGAAGACACCGCTGTG TACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACT ACTCCGCTGGATGGACTACTGGGGACAGGG CACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGGAGGC GGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGCTCCGATATTCAGAT GACACAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGC GTGGGAGATCGGGTGACCATCACCTGCAGGG CCAGCCAGTCCATCTCCAGCTTCTTAACTG GTACCAGCAGAAGCCTGGAAGGCTCCCAAG CTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAGA GCGGCGTGCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGG AAGCGGAACAGACTTCACCTGACCATCAGC TCCCTGCAGCCCGAGGACTCCGCTACCTACT ACTGCCAGCAGACCTATGGCTACCTGCACAC CTTCGGCTGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG	121	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKCLEWV SAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC ARYYGGYYSAWMDYWG QGT LVT VSSGGGSGG GGSGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSFLNW YQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDS ATYYCQQTYGYLHTFG CGTKLEIK	122
ALG.APV -191 anti-5T4	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGAC TGGTGCAGCCTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAG CTGCGCTGCCTCCGGCTTCACATTACAGCAGC TATGCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCTG GAAAGTGCCTGGAGTGGGTGTCCGCTATCTC CGGCAGCGGCGGAAGCACCTACTACGCTGAC TCCGTCAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGGG ACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGAT GAATAGCCTCAGGGCTGAAGACACCGCTGTG TACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACT ACTCCGCTGGATGGACTACTGGGGACAGGG CACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGGAGGC GGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGCTCCGATATTCAGAT GACACAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGC GTGGGAGATCGGGTGACCATCACCTGCAGGG CCAGCCAGTCCATCTCCAGCTTCTTAACTG GTACCAGCAGAAGCCTGGAAGGCTCCCAAG CTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAGA GCGGCGTGCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGG AAGCGGAACAGACTTCACCTGACCATCAGC TCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACT ACTGCCAGCAGACCTATGGCTACCTGCACAC CTTCGGCTGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG	123	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKCLEWV SAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC ARYYGGYYSAWMDYWG QGT LVT VSSGGGSGG GGSGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSFLNW YQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDE ATYYCQQTYGYLHTFG CGTKLEIK	124
ALG.APV -196 anti-5T4	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGAC TGGTGCAGCCTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAG CTGCGCTGCCTCCGGCTTCGACTTCGAGAGC	125	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFD FESY AMSWVRQAPGKCLEWV	126

10

20

30

40

【表 6 - 3】

Name	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA Sequence	AA SEQ ID
ALG.APV -198 anti-5T4	TATGCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCCTG GAAAGTGCCTGGAGTGGGTGTCCGCTATCTC CGGCAGCGGCGGAAGCACCTACTACGCTGAC TCCGTCAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGGG ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAATAGCCTCAGGGCTGAAGACACCGCTGTG TACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACT ACTCCGCTGGATGGACTACTGGGGACAGGG CACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGGAGGC GGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGCTCCGATATTCAGAT GACACAGTCCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGC GTGGGAGATCGGGTGACCATCACCTGCAGGG CCAGCCAGTCCATCAGGAGCGCCCTGAACTG GTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAAG CTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAGA GCGGCGTGCCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGG AAGCGGAACAGACTTCACCCTGACCATCAGC TCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACT ACTGCCAGCAGACCTATGGCTACCTGCACAC CTTCGGCTGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG		SAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC ARYYGGYYSAWMDYWG QGTLVTVSSGGGSGG GGSGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGRV TITCRASQSIRSNLW YQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQTGYLHTFG CGTKLEIK	
ALG.APV -199 anti-5T4	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGAC TGGTGCAGCCTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAG CTGCGCTGCCTCCGGCTTCGACTTCGACAGC TATGCATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCCTG GAAAGTGCCTGGAGTGGGTGTCCGCTATCTC CGGCAGGGCGGAAGCACCTACTACGCTGAC TCCGTCAAGGGCAGGTTACCATCAGCCGGG ACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAATAGCCTCAGGGCTGAAGACACCGCTGTG TACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACT ACTCCGCTGGATGGACTACTGGGGACAGGG CACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGGAGGC GGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGGCG GAAGCGGAGGAGGAGGCTCCGATATTCAGAT GACACAGTCCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGC GTGGGAGATCGGGTGACCATCACCTGCAGGG CCAGCCAGTCCATCAGGAGCGCCCTGAACTG GTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAAG CTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAGA GCGGCGTGCCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGG AAGCGGAACAGACTTCACCCTGACCATCAGC TCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACT ACTGCCAGCAGACCTATGGCTACCTGCACAC CTTCGGCTGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAG	127	EVQLLESGLVQPGG SLRLSCAASGFDSDY AMSWVRQAPGKCLEWV SAISGRGGSTYYADSV KGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC ARYYGGYYSAWMDYWG QGTLVTVSSGGGSGG GGSGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGRV TITCRASQSIRSNLW YQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQTGYLHTFG CGTKLEIK	128
ALG.APV -006 anti-5T4	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCT TGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGCCTCTC CTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTAGCAGC TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAG TGGTAGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGAC TCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGTG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAT	129	EVQLLESGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKLEWV SAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC ARYYGGYYSAWMDYWG QGTLVTVSSGGGSGG	130

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

Name	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA Sequence	AA SEQ ID
	GAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTA TATTATTGTGCGCGCTACTACGGTGGTTACT ACTCTGCTTGGATGGACTATTGGGGCCAGGG AACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGTGGA GGCAGCGGTGGGGGTGGGTCTGGAGGCGGTG GCAGTGGCGGCGGAGGCTCTGACATCCAGAT GACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCT GTAGGAGACCGGTCACCATCACTTGCCGGG CAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTG GTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCTAAG CTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAA GTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG AAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATT ACTGTCAACAGACTTACGGTTACCTGCACAC TTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA		GGSGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQTGYGLHTFG QGTKLEIK	
ALG.APV -010 anti-5T4	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCC TGAGCGCATCTGTAGGAGACCGGTCACCAT CACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGC TATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA AAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATC CAGTTTGCAAGTGGGGTCCCATCACGTTTC AGTGGCAGTGGAAGCGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT TGCAACTTATTACTGTCAACAGACTTACGGT TACCTGCACACTTTTGCCAGGGGACCAAGC TGGAGATCAAAGGCGGTGGAGGCAGCGGTGG GGGTGGGTCTGGAGGCGGTGGCAGTGGCGGC GGAGGCTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCG GGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT GCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCC TTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC AGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATAC TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCA TCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTA TCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTACTACG GTGGTTACTACTCTGCTTGGATGGACTATTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	169	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITCRASQSISSY LNWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFG SGSGTDFTLTISLQ EDFATYYCQQTGYLH TFGQGTKEIKGGGGS GGGGSGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGS LRISCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKLEWVS AISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCA RYYGGYSAWMDYWGQ GTLVTVSS	170
ALG.APV -014 anti-5T4	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCT TGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTC CTGTGCAGCCAGCGGATTCACCTTTAGCAGC TATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGTGCCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAG TGGTAGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGAC TCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTA TATTATTGTGCGCGCTACTACGGTGGTTACT ACTCTGCTTGGATGGACTATTGGGGCCAGGG AACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGTGGA GGCAGCGGTGGGGGTGGGTCTGGAGGCGGTG	131	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKLEWV SAISGSGGSTYYADSV KGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYC ARYYGGYSAWMDYWG QGTLVTVSSGGGGSGG GGSGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQSISSYLNW YQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVPSRFSGSGS	132

10

20

30

40

【表 6 - 5】

Name	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA Sequence	AA SEQ ID
	GCAGTGGCGGCGGAGGCTCTGACATCCAGAT GACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCT GTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGCCGGG CAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTG GTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAG CTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAA GTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG AAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGC AGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATT ACTGTCAACAGACTTACGGTTACCTGCACAC TTTTGGCTGCGGGACCAAGCTGGAGATCAAA		GTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQTYGYLHTFG CGTKLEIK	
ALG.APV -018 anti-5T4	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCC TGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCAT CACTTGCCCGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGC TATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA AAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATC CAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTC AGTGGCAGTGGAAGCGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT TGCAACTTATTACTGTCAACAGACTTACGGT TACCTGCACACTTTTGGCTGCGGGACCAAGC TGGAGATCAAAGGCGGTGGAGGCAGCGGTGG GGGTGGGTCTGGAGGCGGTGGCAGTGGCGGC GGAGGCTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCG GGGGAGGCTGGGTACAGCCTGGGGGGTCCCT GCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCC TTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCC AGGCTCCAGGGAAGTGCTGGAGTGGGTCTC AGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATAC TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCA TCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTA TCTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTACTACG GTGGTTACTACTCTGCTTGGATGGACTATTG GGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA	133	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITICRASQSISSY LNWYQQKFGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQTYGYLH TFGCGTKLEIKGGGGS GGGSGGGSGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKCLEWVS AISGSGGSTYYADSVK GRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVVYCA RYYGGYYSAMMDYWGQ GTLVTVSS	134

10

20

【0196】

いくつかの実施形態では、5 T 4 結合ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に（またはカルボキシル末端からアミノ末端へ順に）、（i）5 T 4 結合ドメインと、（ii）ヒンジ領域と、（iii）免疫グロブリン定常領域と、（iv）カルボキシル末端側リンカー（またはアミノ末端側リンカー）と、（v）第二結合ドメインと、を含む。別の実施形態では、前記第二結合ドメインは4-1BBに特異的なscFvである。いくつかの実施形態では、5 T 4 結合ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に（またはカルボキシル末端からアミノ末端へ順に）、（i）第二結合ドメインと、（ii）ヒンジ領域と、（iii）免疫グロブリン定常領域と、（iv）カルボキシル末端側リンカー（またはアミノ末端側リンカー）と、（v）5 T 4 結合ドメインと、を含む。別の実施形態では、前記第二結合ドメインは、4-1BB結合ドメインを含むか、4-1BB結合ドメインである。特定の実施形態では、5 T 4 結合タンパク質は、5 T 4 を発現する標的細胞にエフェクター細胞を動員するための、エフェクター細胞結合ドメインを含み得る。特定の実施形態では、前記エフェクター細胞結合ドメインは、4-1BBに特異的に結合する。

30

40

【0197】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の5 T 4 結合ポリペプチドの第二結合ドメインは、4-1BB結合ドメインであり、PCT国際公開第2016/185016号；PCT国際出願番号PCT/EP2017/059656号；Dubrot et al., 2010; Gauttier et al., 2014; Kim et al., 2001; McMillin et al., 2006; Melero et al., 1997; Miller et al., 2002; Sallin et al., 2014; Taraban et al., 2002; Uno et al., 2006;

50

Vinay and Kwon, 2012; Wilcox et al., 2002（それぞれその全体が参照によって本明細書に援用される）で開示された1または複数の4-1BB結合配列（例えば、CDRまたは可変領域）を含む。

【0198】

いくつかの実施形態では、前記第二結合ドメインは、4-1BBに特異的に結合し、免疫グロブリン軽鎖可変領域（V_L）および免疫グロブリン重鎖可変領域（V_H）を含み；前記V_Lは、配列番号16および22からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約93%同一の、少なくとも約95%同一の、少なくとも約97%同一の、少なくとも約98%同一の、少なくとも約99%同一の、または100%同一のアミノ酸配列を含み；前記V_Hは、配列番号14、20、26、および28からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約93%同一の、少なくとも約95%同一の、少なくとも約97%同一の、少なくとも約98%同一の、少なくとも約99%同一の、または100%同一のアミノ酸配列を含み、当該ポリペプチドは、scFv-Fc-scFvフォーマットの多特異性ポリペプチドであり、V_Hの150位のHC_{DR1}にYからHへの置換、および／またはV_Hの127位のFR3にRからHへの置換を含む。いくつかの実施形態では、前記第二結合ドメインは、4-1BBと特異的に結合し、V_LおよびV_Hを含み；前記V_Lは配列番号16および22からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；前記V_Hは配列番号14、20、26、および28からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0199】

いくつかの実施形態では、前記第二結合ドメインは、4-1BB結合ドメインポリペプチドであり、このポリペプチドは配列番号110、112、114、および116からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約82%、少なくとも約85%、少なくとも約87%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%同一の配列を含むscFvである。抗4-1BB結合ドメイン配列の例を表6および表7に示し、以下でさらに詳細に論じる。

【0200】

4-1BB結合ドメインおよび4-1BB結合ドメインを含むタンパク質

いくつかの実施形態では、本発明は、4-1BB（例えばヒト4-1BB）に特異的に結合する4-1BB結合ドメインを提供する。4-1BBはCD137またはTNFRSF9としても知られており、腫瘍壊死因子（TNF）受容体ファミリーのメンバーである。4-1BBは、活性化T細胞サブセット（例えば、CD4+T細胞、CD8+T細胞、および制御性T細胞（Treg））、ナチュラルキラー（NK）細胞、樹状細胞、単球、マスト細胞、および好酸球をはじめとする、複数の細胞型で発現される。CD8+T細胞上の4-1BBの活性化は細胞の活性化を維持および／または増強し、一方、CD4+T細胞上の4-1BBの活性化は、細胞の活性化を惹起し、場合によっては、活性化誘導細胞死をもたらす得る。Treg上の4-1BBの活性化は、通常、Tregの機能を抑制する。いくつかの研究で、4-1BB抗体の拮抗薬としての使用により、腫瘍免疫が誘導されることが明らかとなっている。例示的なヒト4-1BBのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号163および167と、配列番号164および166とに記載されている。

【0201】

いくつかの実施形態では、本発明はさらに、4-1BB結合ドメインを含むポリペプチド（例えば、4-1BB結合ポリペプチド）を提供する。特定の変形態では、前記4-1BB結合ポリペプチドは、前記4-1BB結合ドメインのカルボキシル末端側にヒンジ領域を含み、さらに免疫グロブリン定常領域を含む。さらなる変形態では、前記4-1BB結合ポリペプチドは、前記免疫グロブリン定常領域のカルボキシル末端側にカルボキシル末端結合ドメインリンカーを含み、さらに、前記カルボキシル末端側リンカーのカルボキシル末端側に第二結合ドメインを含む。

【0202】

さらに他の変更形態では、4-1BB結合ポリペプチドは、前記4-1BB結合ドメインを含むポリペプチドのアミノ末端側にヒンジ領域を含み、さらに、前記ヒンジ領域のアミノ末端側に免疫グロブリン定常 (immunoglobulin constant) を含む。

【0203】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の4-1BB結合ドメインは、4-1BBの細胞外ドメイン上に位置するエピトープ（例えば、配列番号166の中に含まれるエピトープ）と結合する。特定の態様では、このエピトープは非連続的且つ／または立体構造のエピトープである。

【0204】

4-1BB結合ドメインポリペプチドは、ヒト4-1BBに特異的に結合し、重鎖CDR1 (HCDR1)、HCDR2、HCDR3、軽鎖CDR1 (LCDR1)、LCDR2、およびLCDR3を含み、前記HCDR1は配列番号2、18、24からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み；前記HCDR2は配列番号4のアミノ酸配列を含み；前記HCDR3は配列番号6のアミノ酸配列を含み；前記LCDR1は配列番号8のアミノ酸配列を含み；前記LCDR2は配列番号10のアミノ酸配列を含み；前記LCDR3は配列番号12のアミノ酸配列を含み、当該ポリペプチドは、scFv-Fc-scFvフォーマットの多特異性ポリペプチドであり、抗4-1BB V_Hの150位のHCDR1にYからHへの置換、および／または抗4-1BB V_Hの127位のFR3にRからHへの置換を含み得る。

【0205】

特定の実施形態では、4-1BB結合ドメインポリペプチドは、ヒト4-1BBに特異的に結合し、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含み、(a) 前記HCDR1は配列番号2に記載のアミノ酸配列を含み；(b) 前記HCDR2は配列番号4に記載のアミノ酸配列を含み；(c) 前記HCDR3は配列番号6に記載のアミノ酸配列を含み；(d) 前記LCDR1は配列番号8に記載のアミノ酸配列を含み；前記LCDR2は配列番号10に記載のアミノ酸配列を含み；(f) 前記LCDR3は配列番号12に記載のアミノ酸配列を含み得る。他の特定の実施形態では、5T4結合ドメインポリペプチドは、ヒト5T4に特異的に結合し、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含み、(a) 前記HCDR1は配列番号18に記載のアミノ酸配列を含み；(b) 前記HCDR2は配列番号4に記載のアミノ酸配列を含み；(c) 前記HCDR3は配列番号6に記載のアミノ酸配列を含み；(d) 前記LCDR1は配列番号8に記載のアミノ酸配列を含み；(e) 前記LCDR2は配列番号10に記載のアミノ酸配列を含み；(f) 前記LCDR3は配列番号12に記載のアミノ酸配列を含む。他の特定の実施形態では、5T4結合ドメインポリペプチドは、ヒト5T4に特異的に結合し、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含み、(a) 前記HCDR1は配列番号24に記載のアミノ酸配列を含み；(b) 前記HCDR2は配列番号4に記載のアミノ酸配列を含み；(c) 前記HCDR3は配列番号6に記載のアミノ酸配列を含み；(d) 前記LCDR1は配列番号8に記載のアミノ酸配列を含み；(e) 前記LCDR2は配列番号10に記載のアミノ酸配列を含み；(f) 前記LCDR3は配列番号12に記載のアミノ酸配列を含む。

【0206】

特定の実施形態では、4-1BB結合ドメインポリペプチドは、配列番号16および22からなる群から選択される軽鎖可変領域 (V_L) のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、4-1BB結合ドメインポリペプチドは、配列番号14、20、26、および28からなる群から選択される重鎖可変領域 (V_H) のアミノ酸と少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または100%同一

10

20

30

40

50

のアミノ酸配列を含むか、またはそのようなアミノ酸配列であり、このポリペプチドは、
 s c F v - F c - s c F v フォーマットの多特異性ポリペプチドであり、抗 4-1 B B V_H の 150 位の H C D R 1 に Y から H への置換、および／または抗 4-1 B B V_H の 127 位の F R 3 に R から H への置換を含む。特定の実施形態では、4-1 B B 結合ドメインポリペプチドは、配列番号 14、20、26、および 28 からなる群から選択される重鎖可変領域 (V_H) のアミノ酸配列を含む。

【0207】

特定の実施形態では、4-1 B B 結合ドメインポリペプチドは、配列番号 14 のアミノ酸配列を含む V_H 領域と、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V_L 領域と、を含む。特定の実施形態では、4-1 B B 結合ドメインポリペプチドは、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む V_H 領域と、配列番号 22 のアミノ酸配列を含む V_L 領域と、を含む。特定の実施形態では、4-1 B B 結合ドメインポリペプチドは、配列番号 26 のアミノ酸配列を含む V_H 領域と、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V_L 領域と、を含む。特定の実施形態では、4-1 B B 結合ドメインポリペプチドは、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V_H 領域と、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V_L 領域と、を含む。

【0208】

抗 4-1 B B 結合ドメイン配列の例を表 7 に示す。

表 7：例示的な 4-1 B B 結合ドメインのポリペプチド配列および核酸配列

Construct：コンストラクト Component：成分 Sequence：配列

【表 7-1】

Construct	Component	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA sequence	AA SEQ ID
ALG.APV-178	HCDR1	GGATTCACCTTTTCTCACGGTTCT	1	GFTFSHGS	2
	HCDR2	ATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACA	3	ISSGSGST	4
ALG.APV-179	HCDR3	GCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTGACTAT	5	ARSSYYGSYYSIDY	6
ALG.APV-187	LCDR1	CAGAGCATTAGCAGCTAT	7	QSISSY	8
	LCDR2	GCTGCATCC	9	AAS	10

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

Construct	Component	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA sequence	AA SEQ ID
ALG.APV-198	LCDR3	CAACAGTACTACGACAACCTGCCCACT	11	QQYYDNLPT	12
ALG.APV-199	V _H	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGG	13	EVQLLESQGGGLVQ	14
ALG.APV-208		GGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGG		PGGSLRLSCAASG	
ALG.APV-209		TCCCTGCGCCTCTCTGTGCAGCC		FTFSGSMYWVRQ	
ALG.APV-210		AGCGGATTACCTTTTCTCACGGT		APGKGLEWVSSIS	
ALG.APV-222		TCTATGTACTGGGTCCGCCAGGCT		SGSGSTYYADSVK	
ALG.APV-223		CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC		GRFTISHDNSKNT	
ALG.APV-223		TCATCTATTTCTTCTGGTTCTGGT		LYLQMNSLRAEDT	
	V _L	TCTACATACTATGCAGACTCCGTG	15	AVYYCARSSYYGS	16
		AAGGGCCGGTTCCACATCTCCCAT		YYSIDYWGQGTIV	
		GACAATTCCAAGAACAGCTGTAT		TVSS	
		CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCC			
		GAGGACACGGCTGTATATTATTGT			
		GCGCGCTCTTCTTACTACGGTCT			
		TACTACTCTATTGACTATTGGGGC			
		CAGGGAACCTGGTCACCGTCTCC			
		TCA			
		GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAT		DIQMTQSPSSLSA	
		CCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGA		SVGDRVITCRAS	
		CCGCGTCACCATCACTTGCCGGGCA		QSISSYLNWYQQK	
		AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAA		PGKAPKLLIYAAS	
		ATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA		SLQSGVPSRFSGS	
		AGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT		GSGTDFTLTISSL	
	HCDR1	GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCC	17	QPEDFATYYCQQY	18
		CATCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAAG		YDNLPTFGQGTKL	
		CGGGACAGATTTCACTCTCACCATC		EIK	
		AGCAGTCTACAACCTGAAGATTTTG			
		CAACTTATTACTGTCAACAGTACTA			
		CGACAACCTGCCCACTTTTGCCAG			
		GGGACCAAGCTGGAGATCAAA			
		GGATTCACCTTTGATTACGGTTCT			
		ATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACA			
		GCGCGCTCTTCTTACTACGGTCTT			
	HCDR2	ACTACTCTATTGACTAT	3	ISSGSGST	4
	HCDR3	CAGAGCATTAGCAGCTAT	5	ARSSYYGSYYSIDY	6
	LCDR1	GCTGCATCC	7	QSISSY	8
	LCDR2	CAACAGTACTACGACAACCTGCCCACT	9	AAS	10
	LCDR3	CT	11	QQYYDNLPT	12
	V _H	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGG	19	EVQLLESQGGGLVQ	20
		GAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC		PGGSLRLSCAASG	
		CCTGCGCCTCTCTGTGCAGCCAGC		FTFDYGSIMYWVRQ	
		GGATTACCTTTGATTACGGTTCTA		APGKGLEWVSSIS	
		TGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG		SGSGSTYYADSVK	
		GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCT		GRFTISHDNSKNT	
		ATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACAT		LYLQMNSLRAEDT	
		ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG		AVYYCARSSYYGS	
		GTTTACCATCTCCACGACAATTCC		YYSIDYWGQGTIV	
		AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA		TVSS	
		ACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGC			
		TGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCT			
		TACTACGGTCTTACTACTCTATTG			
ALG.APV-191	HCDR1	GGATTCACCTTTGATTACGGTTCT	17	GFTFDYGS	18
	HCDR2	ATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACA	3	ISSGSGST	4
	HCDR3	GCGCGCTCTTCTTACTACGGTCTT	5	ARSSYYGSYYSIDY	6
	LCDR1	ACTACTCTATTGACTAT	7	QSISSY	8
	LCDR2	GCTGCATCC	9	AAS	10
	LCDR3	CAACAGTACTACGACAACCTGCCCACT	11	QQYYDNLPT	12
	V _H	CT	19	EVQLLESQGGGLVQ	20
		GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGG		PGGSLRLSCAASG	
		GAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC		FTFDYGSIMYWVRQ	
		CCTGCGCCTCTCTGTGCAGCCAGC		APGKGLEWVSSIS	
		GGATTACCTTTGATTACGGTTCTA		SGSGSTYYADSVK	
		TGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG		GRFTISHDNSKNT	
		GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCT		LYLQMNSLRAEDT	
		ATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACAT		AVYYCARSSYYGS	
		ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG		YYSIDYWGQGTIV	
		GTTTACCATCTCCACGACAATTCC		TVSS	
		AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGA			
		ACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGC			
		TGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCT			
		TACTACGGTCTTACTACTCTATTG			

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

Construct	Component	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA sequence	AA SEQ ID
ALG.APV-196		ACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTCTCCTCA			
	V _L	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAT CCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGA CCGCGTCACCATCACTTGCCGGGCA AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAA ATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT GCATCCAGTTTGACAGTGGGGTCC CATCACGTTTCAGTGGCAGTGGGAAG CGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTGTCAACAGTACTA CGACAACCTGCCCCACTTTTGGCCAG GGGACCAAGCTGGAGATCAAA	21	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITCRAS QSISSYLNWYQOK PGKAPKLLIYAAS SLHSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQYY YDNLPTFGQGTKL EIK	22
	HCDR1	GGATTACCTTTTCTTACGGTTCT	23	GFTFSYGS	24
	HCDR2	ATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACA	3	ISSGSGST	4
	HCDR3	GCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTT ACTACTCTATTGACTAT	5	ARSSYYGSYYSID Y	6
	LCDR1	CAGAGCATTAGCAGCTAT	7	QSISSY	8
	LCDR2	GCTGCATCC	9	AAS	10
	LCDR3	CAACAGTACTACGACAACCTGCCCA CT	11	QYYDNLPT	12
	V _H	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGG GAGGCTTGTTACAGCCTGGGGGGTC CCTGCGCTCTCTGTGCAGCCAGC GGATTACCTTTTCTTACGGTTCTA TGTAAGGTGCGCCAGGCTCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCT ATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACAT ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG GTTACCATCTCCCATGACAATTCC AAGAACACGCTGTATCTGCAATGA ACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGC TGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCT TACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCCTGGT CACCGTCTCCTCA	25	EVQLLESQGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSYSGMYWVRQ APGKGLEWVSSIS SGSGSTYYADSVK GRFTISHDNSKNT LYLQMNSLRADT AVYYCARSSYYGS YYSIDYWGQGTLLV TVSS	26
	V _L	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAT CCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGA CCGCGTCACCATCACTTGCCGGGCA AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAA ATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCC CATCACGTTTCAGTGGCAGTGGGAAG CGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGTCTACAACCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTGTCAACAGTACTA	15	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITCRAS QSISSYLNWYQOK PGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQYY YDNLPTFGQGTKL EIK	16

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

Construct	Component	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA sequence	AA SEQ ID
		CGACAACCTGCCCCACTTTTGCCAG GGACCAAGCTGGAGATCAAA			
ALG.APV-004 ALG.APV-006 ALG.APV-010 ALG.APV-014 ALG.APV-018	HCDR1	GGATTACCTTTTCTTACGGTTCT	23	GFTFSYGS	24
	HCDR2	ATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACA	3	ISSGSGST	4
	HCDR3	GCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTT ACTACTCTATTGACTAT	5	ARSSYYGSYYSID Y	6
	LCDR1	CAGAGCATTAGCAGCTAT	7	QSISSY	8
	LCDR2	GCTGCATCC	9	AAS	10
	LCDR3	CAACAGTACTACGACAACCTGCCCA CT	11	QQYYDNLPT	12
	V _H	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGG GAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGCGCTCTCCTGTGCAGCCAGC GGATTACCTTTTCTTACGGTTCTA TGTAAGGGTCCGCCAGGCTCCAGG GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCT ATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACAT ACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG GTTACCATCTCCCGTGACAATTCC AAGAACACGCTGTATCTGCAATGA ACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGC TGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCT TACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGT CACCGTCTCCTCA	27	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASG FTFSYGSIMYWRQ APGKGLEWVSSIS SGSGSTYYADSVK GRFTISRDNKNT LYLQMNSLRADT AVYYCARSSYYGS YYSIDYWGQGLV TVSS	28
	V _L	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAT CCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGA CCGCGTCACCATCACTTGCCGGGCA AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAA ATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAA AGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT GCATCCAGTTTGCAAAGTGCGGTCC CATCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAG CGGGACAGATTCACTCTCACCATC AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTG CAACTTATTACTGTCAACAGTACTA CGACAACCTGCCCACTTTTGCCAG GGACCAAGCTGGAGATCAAA	15	DIQMTQSPSSLSA SVGDRVITCRAS QSISSYLNWYQOK PGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGS SGSDFTLTISL QPEDFATYYCQY YDNLPTFGQGTKL EIK	16

【0209】

いくつかの実施形態では、本発明は、4-1BB結合ドメインを含む多特異性ポリペプチド（例えば、二重特異性ポリペプチド）を提供する。多特異性4-1BB結合ポリペプチドまたは多特異性4-1BB結合タンパク質は、2つの結合ドメイン（これらのドメインは同一または異なる標的に特異的に結合するように設計され得る）、ヒンジ領域、リンカー（例えば、カルボキシル末端リンカーまたはアミノ末端側リンカー）、および免疫グロブリン定常領域を含み得る。多特異性4-1BB結合タンパク質は、2つの同一の、ジスルフィド架橋されたポリペプチドを含むホモ二量体タンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、前記4-1BB結合ドメインは、4-1BBに結合するモノクローナル抗体（例えば、ウレルマブ（BMS-66513）またはPF-05082566（ファイザー社））由来、PCT国際公開第2016/185016号に記載の4-1BB結合ドメイン由来、または、PCT国際出願番号PCT/EP2017/059656に記載の4-1BB結合ドメイン由来であり得る。

【0210】

いくつかの実施形態では、4-1BB結合ドメインを含む多特異性ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に、（i）第一結合ドメインと；（ii）ヒンジ領域と；（iii）免疫グロブリン定常領域と；（iv）結合ドメインリンカーと；（v）4

ー1BB結合ドメインと、を含み得る。いくつかの実施形態では、4ー1BB結合ドメインを含む多特異性ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に、(i) 4ー1BB結合ドメインと；(ii) 結合ドメインリンカーと；(iii) 免疫グロブリン定常領域と；(iv) ヒンジ領域と；(v) 第一結合ドメインと、を含み得る。例示的な抗4ー1BB結合ドメイン配列のアミノ酸配列および核酸配列を表7に記載する。

【0211】

特定の実施形態では、4ー1BB結合性のタンパク質またはポリペプチドが、4ー1BB以外の標的と結合する1または複数の追加の結合ドメイン（例えば、第二結合ドメイン）を含み得る。これらの他の結合ドメインは、例えば、特定のサイトカイン、または前記結合ドメインポリペプチドを特定の細胞型、毒素、追加の細胞受容体、もしくは抗体などに標的化する分子を含み得る。

【0212】

本開示のいくつかの実施形態では、4ー1BB結合ポリペプチドは、第二のポリペプチド鎖とヘテロ二量体を形成することが可能であり、(a) 免疫グロブリン定常領域のアミノ末端側に接した（例えば、前記免疫グロブリン定常領域がCH2ドメインおよびCH3ドメインを含む場合の、CH2ドメインのアミノ末端側の、または、前記免疫グロブリン小領域がCH3ドメインおよびCH4ドメインを含む場合の、CH3ドメインのアミノ末端側の）ヒンジ領域を含むか、(b) 結合ドメイン（例えば、scFv）と免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインとの間に挟まれた、それらを接続するヒンジ領域を含むか、(c) 免疫グロブリンヘテロ二量体形成ドメインと免疫グロブリン定常領域（例えば、前記免疫グロブリン定常領域はCH2ドメインおよびCH3ドメインまたはCH3ドメインおよびCH4ドメインを含む）との間に挟まれた、それらを接続するヒンジ領域を含むか、(d) 免疫グロブリン定常領域と結合ドメインとの間に挟まれた、それらを接続するヒンジ領域を含むか、(e) ポリペプチド鎖のアミノ末端にヒンジ領域を含むか、(f) ポリペプチド鎖のカルボキシル末端にヒンジ領域を含む。本明細書に記載のヒンジ領域を含むポリペプチド鎖は、異なるポリペプチド鎖と結合して、本明細書において提供されるヘテロ二量体タンパク質を形成することを可能とし、形成されたヘテロ二量体は標的特異性または特異的な標的結合親和性を保持する結合ドメインを含有することとなる。

【0213】

特定の実施形態では、4ー1BB結合ポリペプチドは、4ー1BBを発現するエフェクター細胞に標的細胞を動員するための、標的細胞結合ドメインを含み得る。特定の実施形態では、前記標的細胞結合ドメインは、5T4に特異的に結合する。特定の実施形態では、本明細書に記載の4ー1BB結合タンパク質は、(i) 4ー1BBと特異的に結合する結合ドメインと、(ii) 5T4に特異的に結合する別の結合ドメインと、を含み得る。前記5T4結合ドメインに派生させることができる抗5T4抗体の非限定的な例として、PCT国際公開第2016/185016号およびPCT国際出願番号PCT/EP2017/059656に記載のものが挙げられる。

【0214】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される4ー1BB結合ポリペプチドは、2つのscFvを含むポリペプチドである。いくつかの実施形態では、前記2つのscFvは4ー1BB結合ドメインを含む。特定の実施形態では、前記2つのscFvは同一の4ー1BB結合ドメインを含む。他の実施形態では、前記2つのscFvは異なる4ー1BB結合ドメインを含む。他の実施形態では、前記ポリペプチドは、第一のscFvとして4ー1BB結合ドメインを含み、第二のscFvとして標的細胞結合ドメインを含む。例えば、前記標的細胞結合ドメインは5T4に特異的なscFvであり得る。

【0215】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される二重特異性4ー1BB結合ポリペプチドおよび二重特異性4ー1BB結合タンパク質は、配列番号110、112、114、および116からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約82%、少なくとも約85%、少なくとも約87%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なく

10

20

30

40

50

とも約 92%、少なくとも約 93%、少なくとも約 94%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、または 100% 同一の抗 4-1BB scFv を含み、当該ポリペプチドは、scFv-Fc-scFv フォーマットの多特異性ポリペプチドであり、抗 4-1BB V_H の 150 位の HCDR1 に Y から H への置換、および／または抗 4-1BB V_H の 127 位の FR3 に R から H への置換を含む。特定の実施形態では、本明細書において提供される前記二重特異性 4-1BB 結合ポリペプチドおよび二重特異性 4-1BB 結合タンパク質は、配列番号 110、112、114、および 116 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む抗 4-1BB scFv を含む。例示的な抗 4-1BB scFv のアミノ酸配列および核酸配列を下記の表 8 に記載する。

10

表 8：例示的な抗 4-1BB scFv の DNA SEQUENCE：DNA 配列およびアミノ酸配列

Construct：コンストラクト
【表 8-1】

Construct	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA Sequence	AA SEQ ID
ALG.APV-178-4-1BB	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCC	109	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL	110
ALG.APV-179-4-1BB	TCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTCACCTTTCTCACGGTTCTATGTACTGGGTCCGCCA		SCAASGFTFSHGSMYVVRQA	
ALG.APV-187-4-1BB	GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACA		PGKGLEWVSSISSGSGSTYY	
ALG.APV-198-4-1BB	TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAACATCTCCCATGACAATTCCAAGAACA		ADSVKGRFTISHDNSKNTLY	
ALG.APV-199-4-1BB	CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTATATTATTGTGC		LQMNSLRAEDTAVYYCARSS	
ALG.APV-208-4-1BB	GCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCCTG		YYGSYYSIDYWGGQTLVTVS	
ALG.APV-209-4-1BB	GTACACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCGGGGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGAT		SGGGGSGGGGSGGGGSGGGG	
ALG.APV-210-4-1BB	CAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATC		SDIQMTQSPSSLSASVGDV	
ALG.APV-222-4-1BB	TGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTA		TITCRASQSISSYLNWYQQK	
ALG.APV-223-4-1BB	AATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCA		PGKAPKLLIYAASSLQSGVP	
ALG.APV-191-4-1BB	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCC	111	SRFSGSGSGTDFTLTISSLQ	112
	TCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTCACCTTTGATTACGGTTCTATGTACTGGGTCCGCCA		PEDFATYYCQYYDNLPFTG	
	GGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACA		QGTKLEIK	
	TACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAACATCTCCCATGACAATTCCAAGAACA			
	CGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTATATTATTGTGC			
	GCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTGACTATTGGGGCCAGGGAACCCCTG			
	GTACACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCGGGGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGAT			
	CAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATC			

20

30

40

50

【表 8 - 2】

Construct	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA Sequence	AA SEQ ID
	TGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGCC GGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTA AATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGC CCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCA GTTTGCAAGTGGGGTCCCATCACGTTTC AGTGGCAGTGGGAAGCGGGACAGATTTCAC TCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTAC TACGACAACCTGCCCACTTTTGCCAGGG GACCAAGCTGGAGATCAAA			
ALG.APV- 196-4-1BB	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGG CTTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGCGCC TCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTT TCTTACGGTTCATGTACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCT CATCTATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGCCGGTT CACCATCTCCCATGACAATTCCAAGAACA CGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGCGT GCCGAGGACACGGCTGTATATTATTGTGC GCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACT CTATTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTTG GTACCGTCTCCTCAGGTGGAGTGGCTC CGGGGGTGGAGGTTCCGGAGGAGCGGAT CAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATC TGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGCC GGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTA AATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGC CCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCA GTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTC AGTGGCAGTGGGAAGCGGGACAGATTTCAC TCTCACCATCAGCAGTCTACACCTGAAG ATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTAC TACGACAACCTGCCCACTTTTGCCAGGG GACCAAGCTGGAGATCAAA	113	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSYGS MYVVRQA PGKGLEWVSSISSGSGSTYY ADSVKGRFTISHDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARSS YYGSYYSIDYWGQGT LVTVS SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGRV TITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTITSSLQ PEDFATYYCQYYDNLPFTFG QGTKLEIK	114
ALG.APV- 006-4-1BB	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGG CTTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGCGCC TCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTT TCTTACGGTTCATGTACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCT CATCTATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGCCGGTT CACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACA CGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGCGT GCCGAGGACACGGCTGTATATTATTGTGC GCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACT CTATTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTTG GTACCGTCTCCTCAGGTGGAGTGGCTC CGGGGGTGGAGGTTCCGGAGGAGCGGAT CAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATC TGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGCC GGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTA AATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGC CCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCA GTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTC AGTGGCAGTGGGAAGCGGGACAGATTTCAC TCTCACCATCAGCAGTCTACACCTGAAG ATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTAC TACGACAACCTGCCCACTTTTGCCAGGG GACCAAGCTGGAGATCAAA	115	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSYGS MYVVRQA PGKGLEWVSSISSGSGSTYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARSS YYGSYYSIDYWGQGT LVTVS SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGRV TITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTITSSLQ PEDFATYYCQYYDNLPFTFG QGTKLEIK	116
ALG.APV- 010-4-1BB	GAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGG CTTGGTACAGCCTGGGGGTCCTGCGCC TCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTT TCTTACGGTTCATGTACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCT CATCTATTTCTTCTGGTTCTGGTTCTACA TACTATGCAGACTCCGTGAAGGCCGGTT CACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACA CGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGCGT GCCGAGGACACGGCTGTATATTATTGTGC GCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACT CTATTGACTATTGGGGCCAGGGAACCTTG GTACCGTCTCCTCAGGCGGCGGCGGAG CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGAGGCT CCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATC TGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGCC			

【表 8 - 3】

Construct	DNA Sequence	DNA SEQ ID	AA Sequence	AA SEQ ID
	GGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTA AATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGC CCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCA GTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTC AGTGGCAGTGGGAAGCGGGACAGATTTCAC TCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAG ATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTAC TACGACAACCTGCCCACTTTTGCCAGGG GACCAAGCTGGAGATCAAA			

【0216】

二重特異性分子

いくつかの実施形態では、本発明は、2つの結合ドメインを含み、一方の結合ドメインが5 T 4に対して特異的であり、第二の結合ドメインが異なる標的抗原に対し特異的である、多特異性5 T 4結合ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、2つの結合ドメインを含み、結合ドメインが4-1 B Bに対して特異的であり、第二の結合ドメインが異なる標的抗原に対し特異的である、二重特異性4-1 B B結合ポリペプチドを提供する。特定の実施形態では、本発明は、2つの結合ドメインを含み、一方の結合ドメインが4-1 B Bに対して特異的であり、他方の結合ドメインが5 T 4に対して特異的である、二重特異性ポリペプチドを提供する。このような実施形態は、本明細書では、抗5 T 4×抗4-1 B B分子または抗5 T 4×抗4-1 B Bポリペプチドまたは抗5 T 4×抗4-1 B Bタンパク質と称される。特定の実施形態では、前記抗5 T 4×抗4-1 B B分子の5 T 4結合ドメインおよび4-1 B B結合ドメインは、5 T 4および4-1 B Bにそれぞれ特異的に結合するs c F vドメインである。

10

【0217】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗5 T 4×抗4-1 B B分子は、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に、(i) 5 T 4結合ドメインと；(i i) 結合ドメインリンカーと；(i i i) 4-1 B B結合ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗5 T 4×抗4-1 B B分子は、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に、(i) 4-1 B B結合ドメインと；(i i) 結合ドメインリンカーと；(i i i) 5 T 4結合ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗5 T 4×抗4-1 B B分子は、アミノ末端からカルボキシル末端へ順に（またはカルボキシル末端からアミノ末端へ順に）、(i) 5 T 4結合ドメインと、(i i) ヒンジ領域と、(i i i) 免疫グロブリン定常領域と、(i v) カルボキシル末端側リンカー（またはアミノ末端側リンカー）と、(v) 第二結合ドメインと、を含む。

20

【0218】

本明細書に記載の抗5 T 4×抗4-1 B B分子は、表4～7に示される抗5 T 4結合ドメイン配列および抗4-1 B B結合ドメイン配列をあらゆる組み合わせで含み得る。特定の実施形態では、本発明の抗5 T 4×抗4-1 B B分子は、H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、およびL C D R 3をそれぞれ含む、5 T 4結合ドメインおよび4-1 B B結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、前記抗5 T 4×抗4-1 B B分子は、(a) (i) 配列番号30、52、および60からなる群から選択されるH C D R 1アミノ酸配列、配列番号32および62からなる群から選択されるH C D R 2アミノ酸配列、並びに配列番号34のH C D R 3アミノ酸配列を含むV_Hと；(i i) 配列番号8、42、および54からなる群から選択されるL C D R 1アミノ酸配列、配列番号10のL C D R 2アミノ酸配列、並びに配列番号36のL C D R 3アミノ酸配列を含むV_Lと、を含む第一s c F vドメイン；並びに、(b) (i) 配列番号2、18、および24からなる群から選択されるH C D R 1アミノ酸配列、配列番号4のH C D R 2アミノ酸配列、並びに配列番号6のH C D R 3アミノ酸配列を含むV_Hと；(i i) 配列番号8のL C D R 1アミノ酸配列、配列番号10のL C D R 2アミノ酸配列、および配列番号12のL C D R 3アミノ酸配列を含むV_Lと、を含む第二s c F vドメイン、を含む。

30

40

【0219】

いくつかの実施形態では、本発明の抗5 T 4×抗4-1 B B分子は、V_HドメインおよびV_Lドメインをそれぞれ含む、5 T 4結合ドメインおよび4-1 B B結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、前記抗5 T 4×抗4-1 B B分子は、i) 配列番号38、46、56、および64からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むV_Hと、配列番号40、44、48、50、58、66、68、および70からなる群から選択されるアミノ酸を含むV_Lと、を含む第一s c F vドメイン；並びに、i i) 配列番号14、20、26、および28からなる群から選択されるアミノ酸を含むV_Hと、配列番号16および22からなる群から選択されるアミノ酸を含むV_Lと、を含む第二s c F vドメイン、を

50

含む。

【0220】

特定の実施形態では、抗5T4×抗4-1BB分子の5T4結合ドメインは、配列番号118、120、122、124、126、128、130、132、134、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または100%同一のscFvを含むか、またはそのようなscFvであり、当該分子は、scFv-Fc-scFvフォーマットの多特異性ポリペプチドであり、抗5T4 VLの99位のLCDR1にYからFへの置換、および／または抗5T4 VLの148位のFR3にFからSへの置換を含む。特定の実施形態では、抗5T4×抗4-1BB分子の5T4結合ドメインは、配列番号118、120、122、124、126、128、130、132、134、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むscFvを含む。

10

【0221】

特定の実施形態では、抗5T4×抗4-1BB分子の4-1BB結合ドメインは、配列番号110、112、114、および116からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または100%同一のscFvを含むか、またはそのようなscFvであり、当該分子は、scFv-Fc-scFvフォーマットの多特異性ポリペプチドであり、抗4-1BB VHの150位のHCDR1にYからHへの置換、および／または抗4-1BB VHの127位のFR3にRからHへの置換を含む。特定の実施形態では、抗5T4×抗4-1BB分子の4-1BB結合ドメインは、配列番号110、112、114、および116からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むscFvを含む。

20

【0222】

特定の実施形態では、前記抗5T4×抗4-1BB分子は、下記の表9に示されるCDR配列、VH/VL配列、および／またはscFv配列を組み合わせる。

30

40

50

【表 9 - 1】

表 9 : 抗 5 T 4 結合配列および抗 4 - 1 B B 結合配列の組み合わせ例

ALG.APV-178(scFv-Fc-scFvフォーマット)			
4-1BB結合ドメイン		5T4結合ドメイン	
成分	配列番号	成分	配列番号
HCDR1	2	HCDR1	30
HCDR2	4	HCDR2	32
HCDR3	6	HCDR3	34
LCDR1	8	LCDR1	8
LCDR2	10	LCDR2	10
LCDR3	12	LCDR3	36
V _H	14	V _H	38
V _L	16	V _L	40
scFv	110	scFv	118
ALG.APV-179、ALG.APV-209、ALG.APV-222(scFv-Fc-scFvフォーマット)			
4-1BB結合ドメイン		5T4結合ドメイン	
成分	配列番号	成分	配列番号
HCDR1	2	HCDR1	30
HCDR2	4	HCDR2	32
HCDR3	6	HCDR3	34
LCDR1	8	LCDR1	42
LCDR2	10	LCDR2	10
LCDR3	12	LCDR3	36
V _H	14	V _H	38
V _L	16	V _L	44
scFv	110	scFv	120
ALG.APV-187、ALG.APV-210、ALG.APV-223(scFv-Fc-scFvフォーマット)			
4-1BB結合ドメイン		5T4結合ドメイン	
成分	配列番号	成分	配列番号
HCDR1	2	HCDR1	30
HCDR2	4	HCDR2	32
HCDR3	6	HCDR3	34
LCDR1	8	LCDR1	42
LCDR2	10	LCDR2	10
LCDR3	12	LCDR3	36
V _H	14	V _H	46
V _L	16	V _L	48
scFv	110	scFv	122

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

ALG.APV-191(scFv-Fc-scFvフォーマット)			
4-1BB結合ドメイン		5T4結合ドメイン	
成分	配列番号	成分	配列番号
HCDR1	18	HCDR1	30
HCDR2	4	HCDR2	32
HCDR3	6	HCDR3	34
LCDR1	8	LCDR1	42
LCDR2	10	LCDR2	10
LCDR3	12	LCDR3	36
V _H	20	V _H	46
V _L	22	V _L	50
scFv	112	scFv	124
ALG.APV-196(scFv-Fc-scFvフォーマット)			
4-1BB結合ドメイン		5T4結合ドメイン	
成分	配列番号	成分	配列番号
HCDR1	24	HCDR1	52
HCDR2	4	HCDR2	32
HCDR3	6	HCDR3	34
LCDR1	8	LCDR1	54
LCDR2	10	LCDR2	10
LCDR3	12	LCDR3	36
V _H	26	V _H	56
V _L	16	V _L	58
scFv	114	scFv	126
ALG.APV-198(scFv-Fc-scFvフォーマット)			
4-1BB結合ドメイン		5T4結合ドメイン	
成分	配列番号	成分	配列番号
HCDR1	2	HCDR1	52
HCDR2	4	HCDR2	32
HCDR3	6	HCDR3	34
LCDR1	8	LCDR1	54
LCDR2	10	LCDR2	10
LCDR3	12	LCDR3	36
V _H	14	V _H	56
V _L	16	V _L	58
scFv	110	scFv	126
ALG.APV-199(scFv-Fc-scFvフォーマット)			
4-1BB結合ドメイン		5T4結合ドメイン	
成分	配列番号	成分	配列番号
HCDR1	2	HCDR1	60
HCDR2	4	HCDR2	62
HCDR3	6	HCDR3	34
LCDR1	8	LCDR1	54
LCDR2	10	LCDR2	10
LCDR3	12	LCDR3	36
V _H	14	V _H	64
V _L	16	V _L	58
scFv	110	scFv	128
ALG.APV-006(scFv-Fc-scFvフォーマット)			
4-1BB結合ドメイン		5T4結合ドメイン	
成分	配列番号	成分	配列番号
HCDR1	24	HCDR1	30
HCDR2	4	HCDR2	32
HCDR3	6	HCDR3	34
LCDR1	8	LCDR1	8
LCDR2	10	LCDR2	10
LCDR3	12	LCDR3	36
V _H	28	V _H	38
V _L	16	V _L	68
scFv	116	scFv	130

10

20

30

40

50

【表 9 - 3】

ALG.APV-010(scFv-Fc-scFvフォーマット)			
4-1BB結合ドメイン		5T4結合ドメイン	
成分	配列番号	成分	配列番号
HCDR1	24	HCDR1	30
HCDR2	4	HCDR2	32
HCDR3	6	HCDR3	34
LCDR1	8	LCDR1	8
LCDR2	10	LCDR2	10
LCDR3	12	LCDR3	36
V _H	28	V _H	38
V _L	16	V _L	68
scFv	116	scFv	170
ALG.APV-014(scFv-Fc-scFvフォーマット)			
4-1BB結合ドメイン		5T4結合ドメイン	
成分	配列番号	成分	配列番号
HCDR1	24	HCDR1	30
HCDR2	4	HCDR2	32
HCDR3	6	HCDR3	34
LCDR1	8	LCDR1	8
LCDR2	10	LCDR2	10
LCDR3	12	LCDR3	36
V _H	28	V _H	46
V _L	16	V _L	70
scFv	116	scFv	132
ALG.APV-018(scFv-Fc-scFvフォーマット)			
4-1BB結合ドメイン		5T4結合ドメイン	
成分	配列番号	成分	配列番号
HCDR1	24	HCDR1	30
HCDR2	4	HCDR2	32
HCDR3	6	HCDR3	34
LCDR1	8	LCDR1	8
LCDR2	10	LCDR2	10
LCDR3	12	LCDR3	36
V _H	28	V _H	46
V _L	16	V _L	70
scFv	116	scFv	134

【0223】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗5T4×抗4-1BB分子は、配列番号136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、172、174、および176からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または100%同一のアミノ酸配列を含み得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗5T4×抗4-1BB分子は、配列番号136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、172、174、および176からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み得る。本明細書に記載の抗5T4×抗4-1BB分子の例示的なアミノ酸および核酸配列を表10および表11に記載する。表10および表11のそれぞれにおいて、免疫グロブリンFcドメイン（ヒンジーCH1-CH2）は下線部で示され、結合ドメインリンカー配列は太字で示される。

表10：抗5T4×抗4-1BB分子のDNA SEQUENCE：DNA配列の例
Construct：コンストラクト Sequence：配列

10

20

30

40

50

【表 10 - 1】

Construct	DNA SEQ	DNA SEQ ID
ALG.APV-178	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTTC CCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTTCTCACGGTTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGGTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCA TGACAATTCCAAGAACAGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGG GGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGATCAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCTCCTTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TACAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCGAGTGAGCCCAAATCTTCT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGTGCACCGT CAGCTTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCGACACAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCGCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGT TCCGGAGGTGGCGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCAAGGAG GTGGGGATCCCCCTC AGAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCCTCCGGCTTACATTACAGCAGC TATGCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCTGGAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCG CTATCTCCGGCAGCGCGGAAGCACCTACTACGCTGACTCCGTCAAGGGCAGGTT CACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTC AGGGCTGAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACTACT CCGCTGGATGGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGG AGGCGGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCC GATATTAGATGACACAGTCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATCGGG TGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCCATCTCCAGCTATTTAACTGGTACCA GCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAG AGCGCGGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGAAGCGGAACAGACTTCACCCTGA CCATCAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTCCGCTACCTACTACTGCCAGCAGACCTA TGGTACCTGCACACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGC	135

10

20

30

40

50

【表 10 - 2】

Construct	DNA SEQ	DNA SEQ ID
ALG.APV-179	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTTC CCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTTCTCACGGTTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGGTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCA TGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGG GGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGATCAGGTGGAGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TACAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCGAGTGAGCCCAAATCTTCT GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGTGCACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCGACACAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCGCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGT ACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTCAGGAG GTGGGGGATCCCCCTTCAGAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCA GCCGTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCCCTCCGGCTTACATTACAGCAG TATGCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCG CTATCTCCGGCAGCGCGGAAGCACCTACTACGCTGACTCCGTCAAGGGCAGGTT CACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTC AGGGCTGAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACTACT CCGCTTGGATGGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGG AGGCGGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCC GATATTCAGATGACACAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATCGGG TGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCCATCTCCAGCTTCTTAAACTGGTACCA GCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAG AGCGGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGAAGCGGAACAGACTTCACCCTGA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTCCGCTACCTACTACTGCCAGCAGACCTA TGGCTACCTGCACACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGC	137
ALG.APV-187	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTTC CCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTTCTCACGGTTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGGTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCA TGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGG GGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGATCAGGTGGAGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG	139

10

20

30

40

【表 10 - 3】

Construct	DNA SEQ	DNA SEQ ID
	GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCAGTTTTCAGTGGCAGTGGAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TACAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCGAGTGAGCCCAAATCTTCT GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGTGCACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCGCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGT ACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACCGCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTCAAGAG GTGGGGGATCCCTTCAGAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCCGGAGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACATTGAGCAGC TATGCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCCTGGAAAGTGCTGGAGTGGGTGTCCG CTATCTCCGGCAGCGCGGGAAGCACCTACTACGCTGACTCCGTCAAGGGCAGGTT CACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTC AGGGCTGAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACTACT CCGCCTGGATGGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGG AGCGGGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCC GATATTCAGATGACACAGTCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATCGGG TGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCCATCTCCAGCTTCTTAAACTGGTACCA GCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAG AGCGGCGTGCCTAGCAGGTCTCCGGCTCCGGAAGCGGAACAGACTTCACCCTGA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTCCGCTACCTACTACTGCCAGCAGACCTA TGGCTACCTGCACACCTTCGGCTGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGC	10
ALG.APV-191	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCTGGGGGGTC CCTGCGCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTCACCTTGATTACGGTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGGTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCA CGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGG GGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGATCAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGGTCACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGACAGTGGGGTCCCA TCAGGTTTCAGTGGCAGTGGAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCCTCGGAGCCCAAATCTTCT GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGTGCACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCGCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGT	141
		30
		40

10

20

30

40

【表 10 - 4】

Construct	DNA SEQ	DNA SEQ ID
	ACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGT TCCGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTCAAGAG GTGGGGGATCCCCCTTC AGAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACATTCAGCAGC TATGCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCGAAAGTGCCTGGAGTGGGTGTCCG CTATCTCCGGCAGCGCGGAAGCACCTACTACGCTGACTCCGTCAAGGGCAGGTT CACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTC AGGGCTGAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGTACTATGGCGGCTACTACT CCGCTTGGATGGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGG AGGCGGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCC GATATTCAGATGACACAGTCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATCGGG TGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCCATCTCCAGCTTCTTAAACTGGTACCA GCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCAGCCTCCAG AGCGCGGTGCCGTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGAAGCGGAACAGAGTTCACCCCTGA CCATCAGCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGCCAGCAGACCTA TGGTACCTGCACACCTTCGGCTCGGGCACAAAGCTGGAGATCAAGAGC	10
ALG.APV-196	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTTC CCTGCGCTCTCTCTGTGCAGCCAGCGGATTCACCTTTTCTTACGGTTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGGTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCCACCTCTCCCA TGACAATTCCAAGAACAGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTTATGTGCGGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTTGGTCACCGTCTCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGG GGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGATCAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCTCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCTCACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTTGGTATCAGCAGAAACAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTTCAGTGGCAGTGGAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TACAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCTCTCGGAGCCCAAATCTTCT GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGTGCACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCGACACAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCGCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGT ACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGT TCCGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTCAAGAG GTGGGGGATCCCCCTTC AGAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCCTCCGGCTTCGACTTCGAGAGC TATGCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCGAAAGTGCCTGGAGTGGGTGTCCG CTATCTCCGGCAGCGCGGAAGCACCTACTACGCTGACTCCGTCAAGGGCAGGTT CACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTC	143

10

20

30

40

50

【表 10 - 5】

Construct	DNA SEQ	DNA SEQ ID
	AGGGCTGAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACTACT CCGCCTGGATGGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGGCGG AGGCGGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCC GATATTCAGATGACACAGTCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATCGGG TGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCCATCAGGAGCGCCCTGAACTGGTACCA GCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAG AGCGGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGAAGCGGAACAGACTTCACCCTGA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGCCAGCAGACCTA TGGCTACCTGCACACCTTCGGCTGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGC	
ALG.APV-198	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCGAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCT CCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTTCTCACGGTCTATGTATC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGGTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCA TGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGG GGGTGGAGGTTCCGGAGGAGCGGATCAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGGTACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TACAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCGAGTGAGCCCAAATCTTCT GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCGAGCACCTGAAGCCCGGGTGCACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCGCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGT ACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGGAGAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGT TCCGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTCAGGAG GTGGGGGATCCCCCTTCA GAAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCCCTCCGGCTTCGACTTCGAGAGC TATGCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCTGGAAAGTGCCTGGAGTGGGTGTCCG CTATCTCCGGCAGCGCGCGGAAGCACCTACTACGCTGACTCCGTCAAGGGCAGGTT CACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTC AGGGCTGAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACTACT CCGCCTGGATGGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGG AGGCGGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCC GATATTCAGATGACACAGTCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATCGGG TGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCCATCAGGAGCGCCCTGAACTGGTACCA GCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAG AGCGGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGAAGCGGAACAGACTTCACCCTGA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGCCAGCAGACCTA TGGCTACCTGCACACCTTCGGCTGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGC	145
ALG.APV-199	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCGAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCT	147

10

20

30

40

50

【表 10 - 6】

Construct	DNA SEQ	DNA SEQ ID
	CCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTTCTCAGGTTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGGTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCA TGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGG GGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGATCAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TACAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCGAGTGAGCCCAAATCTTCT GACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCGAGCACCTGAAGCCGCGGGTGCACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCGACACAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGGCGCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACTACAAGACCAAGCCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCTCT TCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGAGGGGAACGT CTTCTCATGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTCAGGAG GTGGGGGATCCCCCTTCAGAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGAAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCCTCCGGCTTCGACTTCGACAGC TATGCTATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCTGGAAGTGCCTGGAGTGGGTGTCCG CTATCTCCGGCAGGGGCGGAAGCACCTACTACGCTGACTCCGTCAAGGGCAGGTT CACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTC AGGGCTGAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACTACT CCGCTGGATGGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGG AGGGGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCC GATATTCAGATGACACAGTCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATCGGG TGACCATCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCCATCAGGAGCGCCCTGAAGTGGTACCA GCAGAAGCCTGGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAG AGCGGCGTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGAAGCGGAACAGACTTCACCTGA CCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGCCAGCAGACCTA TGGCTACCTGCACACCTTCGGCTGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGC	10 20 30
ALG.APV-208	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGGAGGCTTGGTACAGCTGGGGGGTCT CCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTTCTCAGGTTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGGTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCA TGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGG GGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGATCAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC	175 40

10

20

30

40

【表 10 - 7】

Construct	DNA SEQ	DNA SEQ ID
	TACAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACCTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAGAGCCCAAATCTCTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGTGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGAGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAATACAAGTGCAGCGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTCAGGAGGTGGGG GATCCCCCTTCAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGG CGGAAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCCTCCGGCTTACATTGAGCAGCTATGCT ATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCCTGAAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGCTATCT CCGGCAGCGGGCGGAAGCACCTACTACGCTGACTCCGTCAAGGGCAGGTTCACCAT CAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTCAGGGCT GAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACTACTCCGCCT GGATGGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGCGCGGAGGCGG CTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGTCCGATATT CAGATGACACAGTCCCTTAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATCGGGTGACCA TCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCCATCTCCAGCTATTAAACTGGTACCAGCAGAA GCCTGGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAGAGCGGC GTGCCTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGAAGCGGAACAGACTTCACCTGACCATCA GCTCCCTGCAGCCCAGGACTCCGCTACCTACTACTGCCAGCAGACCTATGGCTA CCTGCACACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGC	10
ALG.APV-209 ALG.APV-222	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTTCTCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT CCTGCGCCTCTCTGTGTCAGCCAGCGGATTACCTTTTCTCACGGTTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGGTTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCA TGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGG GGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGATCAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCAACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TACAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAGAGCCCAAATCTCTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGTGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGAGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAATACAAGTGCAGCGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG	171
	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTTCTCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT CCTGCGCCTCTCTGTGTCAGCCAGCGGATTACCTTTTCTCACGGTTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGGTTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCA TGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGG GGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGATCAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCAACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TACAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAGAGCCCAAATCTCTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGTGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGAGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAATACAAGTGCAGCGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG	30
	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTTCTCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGT CCTGCGCCTCTCTGTGTCAGCCAGCGGATTACCTTTTCTCACGGTTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGGTTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCA TGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGG GGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGATCAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCAACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TACAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAGAGCCCAAATCTCTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGTGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGAGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAATACAAGTGCAGCGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG	40

10

20

30

40

50

【表 10 - 8】

Construct	DNA SEQ	DNA SEQ ID
	GAGAACAACACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTCAGGAGGTGGGG GATCCCCCTTCAGAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGG CGGAAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACATTACAGCAGCTATGCT ATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCTGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGCTATCT CCGGCAGCGGGCGGAAGCACCTACTACGCTGACTCCGTCAAGGGCAGGTTACCAT CAGCCGGGACAAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTCAGGGCT GAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACTACTCCGCC GGATGGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGGGAGGCGG CTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGCGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCCGATATT CAGATGACACAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATCGGGTGACCA TCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCCATCTCCAGCTTCTTAAACTGGTACCAGCAGAA GCCTGGAAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCCCTTCAGCCTCCAGAGCGGC GTGCTTAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGAAGCGGAACAGACTTCACCTGACCATCA GCTCCCTGCAGCCGAGGACTCCGCTACCTACTACTGCCAGCAGACCTATGGCTA CCTGCACACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGC	10
ALG.APV-210 ALG.APV-223	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC CCTGCGCTCTCTCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTCTCAGGTTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTCTTCTG GTTCTGGTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCA TGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGG GGGTGGAGGTTCCGGAGGAGGCGGATCAGGTGGAGGCGGAAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGGCTCACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAGCGGGACAGATTTCACCTCACCATCAGCAGTC TACAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAGAGCCCAAATCTTCTGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGTGACCGTCAGTCT TCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGAGCTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAATACAAGTGCAGCGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACC TGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTCAGGAGGTGGGG GATCCCCCTTCAGAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGG CGGAAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCTGCCTCCGGCTTCACATTACAGCAGCTATGCT ATGAGCTGGGTGAGGCAAGCCCCTGAAAGTGCCTGGAGTGGGTGTCCGCTATCT CCGGCAGCGGGCGGAAGCACCTACTACGCTGACTCCGTCAAGGGCAGGTTACCAT CAGCCGGGACAAACAGCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTCAGGGCT GAAGACACCGCTGTGTACTACTGCGCCAGGTACTATGGCGGCTACTACTCCGCC GGATGGACTACTGGGGACAGGGCACACTGGTGACCGTGTCCAGCGGGGAGGCGG	173 20 30 40

10

20

30

40

【表 10 - 9】

Construct	DNA SEQ	DNA SEQ ID
	CTCCGGAGGCGGTGGCTCCGGAGGAGCGGAAGCGGAGGAGGAGGCTCCGATATT CAGATGACACAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCCAGCGTGGGAGATCGGGTGACCA TCACCTGCAGGGCCAGCCAGTCCATCTCCAGCTTCTTAAACTGGTACCAGCAGAA GCCTGGAAGGCTCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCTTCCAGCCTCCAGAGCGGC GTTCCTGAGCAGGTTCTCCGGCTCCGGAAGCGGAACAGACTTCACCTGACCATCA GCTCCCTGCAGCCGAGGACTCCGCTACCTACTACTGCCAGCAGACCTATGGCTA CCTGCACACCTTCGGCTGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGCGC	
ALG.APV-006	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTTC CCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTTCTTACGGTTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGGTTCTACATACTATGACAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCG TGACAATTCCAAGAACAGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGCGGCGGAGCGG CGGCGGCGGAGCGGCGGCGGAGGCTCCGGCGGCGGCGGAGCGGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCTCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTACCATCATT GCCGGGCAAGTCAGAGCATAGCAGCTATTTAAATGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCCTCGAGTGAGCCCAAATCT TCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACTGAAGCCGCGGGTGCAC CGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACATGCGTGTTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCCTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCGCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGG TGTAACCCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC CTGCTTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGAGCCGAGAGACAACCTACAAGACACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAG AGCTCTCCTCTCTCCGGGTTCGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTTCAG GAGGTGGGGGATCCCCTTCAGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGATTACCTTTAGC AGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT CAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG GTTACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACAGCTGTATCTGCAAATGAACAGC CTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTACTACGGTGGTTACT ACTCTGCTTGGATGGACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGG CGGTGGAGGACGCGTGGGGGTGGGTCTGGAGGCGGTGGCAGTGGCGGCGGAGGC TCTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACC GCGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTA TCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTG CAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGAAGCGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGAC TTACGGTTACCTGCACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCA	149
ALG.APV-010	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTTC CCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTTCTTACGGTTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG	151

10

20

30

40

50

【表 10 - 10】

Construct	DNA SEQ	DNA SEQ ID
	GTTCTGGTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCG TGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGCGGCGGCAGCGG CGGCGGCGGCAGCGCGCGGAGGCTCCGGCGGCGGCGGCAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCCTCGAGTGAGCCCAAATCT TCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGTGCAC CGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTGCAGCGTCTCACCCTCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCAGCGGTCTCCAACAAGCCCTCCCA GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTTCAGCCTGAC CTGCTTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGAGCCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACGCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGTTCCCGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTTCAG GAGTGGGGGATCCCTTTCAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAG CGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGC AGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCT ATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAG CGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACT TATTACTGTCAACAGACTTACGGTTACCTGCACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGC TGGAGATCAAAGGCGGTGGAGGCAGCGGTGGGGGTGGGTCTGGAGGCGGTGGCAG TGGCGGCGGAGGCTCTGAGGTGCAGCTGTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGCGCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTAGCAGCT ATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCAGC TATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGC GTGCCGAGGACACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTACTACGGTGGTTACTACTC TGCTTGGATGGACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA	10 20 30
ALG.APV-014	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGTACAGCTGGGGGGTTC CCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTTCTTACGGTCTATGTAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTCTTCTG GTTCTGGTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCG TGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGCGGCGGCAGCGG CGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGAGGCTCCGGCGGCGGCGGCAGCGACATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGCGTCACCATCACTT GCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCCTCGAGTGAGCCCAAATCT	153

10

20

30

40

【表 10 - 11】

Construct	DNA SEQ	DNA SEQ ID
	TCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACGACCTGAAGCCGCGGGTGCAC CGTCAGTCTTCCCTCTCCCCC AAAACCAAGGACACCCATCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCAGCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTTCCGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTCAAGAGGTGGGGGATCCCTTCAGAGGTGCAGCTGTGGAGAGCGGGGAGGCTTGGT ACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTAGC AGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGTGCCTGGAGTGGGTCT CAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG GTTACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGC CTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTACTACGGTGGTTACT ACTCTGCTTGGATGGACTATTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGG CGGTGGAGGCAGCGGTGGGGGTGGGTCTGGAGGCGGTGGCAGTGGCGGCGGAGGC TCTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACC GCGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTA TCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTG CAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAAGCGGGACAGATTTCACTC TCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGAC TTACGGTTACCTGCACACTTTTGCTGCGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCA	10
ALG.APV-018	ATGGAAGCACCAGCGCAGCTTCTCTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGATACCA CCGGTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCT CCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTCTTACGGTCTCATGTAC TGGTTCGCGCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGTCTCATCTATTTCTTCTG GTTCTGTTCTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCAACATCTCCCG TGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGAC ACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTCTTCTTACTACGGTTCTTACTACTCTATTG ACTATTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGCGGCGGCGGACAGCGG CGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGGAGGCTCCGGCGGCGGCGGCGGCGGAGCATCCAGATG ACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAGCGCATCTGTAGGAGACCGGCTCACCATCACTT GCCGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGG GAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA TCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAAGCGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC TGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTACTACGACAACCTGCC CACTTTTGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAATCCTCGAGTGAGCCCAATCT TCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACGACCTGAAGCCGCGGGTGCAC CGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCC AAAACCAAGGACACCCATCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCAGCGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA	155
		30
		40

10

20

30

40

【表 10-12】

Construct	DNA SEQ	DNA SEQ ID
	CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTTCGGGAGGTGGCGGTTCGGGAGGTGGCGGGTCAG GAGGTGGGGGATCCCCTTCAGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGAG CGCATCTGTAGGAGACCGCGTCAACATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGC AGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCTAAGCTCCTGATCT ATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGAAAG CGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGAACCT TATTACTGTCAACAGACTTACGGTTACCTGCACACTTTTGGCTGCGGGACCAAGC TGGAGATCAAAGCGGTGGAGGCAGCGGTGGGGGTGGGTCTGGAGGCGGTGGCAG TGGCGGGGAGGCTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAGAGCGGGGGAGGCTTGGTACAG CCTGGGGGGTCCCTGCGCCTCTCCTGTGCAGCCAGCGGATTACCTTTAGCAGCT ATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGTGCTGGAGTGGGTCTCAGC TATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGC GTGCCGAGGACACGGCTGTATATTATTGTGCGCGCTACTACGGTGGTTACTACTC TGCTTGGATGGACTATTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA	

10

表 11：抗 5 T 4 × 抗 4 - 1 B B 分子のアミノ酸配列の例

Construct：コンストラクト Sequence：配列

【表 11-1】

Construct	AA Sequence	AA SEQ ID
ALG.APV-178	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHGSMY WVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISHDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARSSYYGSYYSIDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYDNLPFTFGQGTKLEIKSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLEPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSPSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYCQQTYYGLHTFGQGTKLEIKR	136
ALG.APV-179	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHGSMY WVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISHDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSSYYGSYYSIDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYDNLPFTFGQGTKLEIKSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLEPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSPSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYCQQTYYGLHTFGQGTKLEIKR	138
ALG.APV-187	MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHGSMY WVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISHDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSSYYGSYYSIDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM	140

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

Construct	AA Sequence	AA SEQ ID
ALG.APV-191	TQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYYDNLPTFGQGTKEIKSSEPKSS DKHTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGSGGGSGGGSGGGSPSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKCLEWVSATISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGT LVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDSATYYCQQTGYLHTFGCGTKEIKR MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGS MY WVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARSSYYGSYYSIDYWGQGT LVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLHSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYYDNLPTFGQGTKEIKSSEPKSS DKHTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGSGGGSGGGSGGGSPSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKCLEWVSATISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGT LVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQTGYLHTFGCGTKEIKS	142
ALG.APV-196	MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGS MY WVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARSSYYGSYYSIDYWGQGT LVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYYDNLPTFGQGTKEIKSSEPKSS DKHTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGSGGGSGGGSGGGSPSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFES YAMSWVRQAPGKCLEWVSATISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGT LVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSALNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQTGYLHTFGCGTKEIKR	144
ALG.APV-198	MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHGSMY WVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARSSYYGSYYSIDYWGQGT LVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYYDNLPTFGQGTKEIKSSEPKSS DKHTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGSGGGSGGGSGGGSPSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFES YAMSWVRQAPGKCLEWVSATISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGT LVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSALNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQTGYLHTFGCGTKEIKR	146

10

20

30

40

【表 1 1 - 3】

Construct	AA Sequence	AA SEQ ID
ALG.APV-199	MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSMY WVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISHDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARSSYYGSYYSIDYWQOGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYDNLPFTFGQGTKLEIKSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKE NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAP PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL LSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSPSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDGDS YAMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWQOGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSALNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYYGLHTFGCGTKLEIKR	148
ALG.APV-208	MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSMY WVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISHDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARSSYYGSYYSIDYWQOGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYDNLPFTFGQGTKLEIKEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKENW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL LSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSPSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWQOGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSATYYCQQTYYGLHTFGCGTKLEIKR	176
ALG.APV-209 ALG.APV-222	MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSMY WVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISHDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARSSYYGSYYSIDYWQOGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYDNLPFTFGQGTKLEIKEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKENW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL LSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSPSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWQOGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSFLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSATYYCQQTYYGLHTFGCGTKLEIKR	172
ALG.APV-210 ALG.APV-223	MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGSMY WVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISHDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARSSYYGSYYSIDYWQOGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQM TQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYDNLPFTFGQGTKLEIKEPKSSDK THTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKENW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL LSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSPSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYA MSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA	174

10

20

30

40

【表 1 1 - 4】

Construct	AA Sequence	AA SEQ ID
	EDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSFLNWWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDSATYYCQQTGYLHTFGCGTKLEIKR	
ALG.APV-006	MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGS MYWVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSSYYGSYYSIDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYYDNLPFTFGQGTKEIKSSSEPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNYHTQK SLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSPSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWWYQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQTGYLHTFGCGTKLEIKS	150
ALG.APV-010	MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGS MYWVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSSYYGSYYSIDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYYDNLPFTFGQGTKEIKSSSEPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNYHTQK SLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSPSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYLNWWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFAT YYCQQTGYLHTFGCGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGLTVTVSS	152
ALG.APV-014	MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGS MYWVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSSYYGSYYSIDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYYDNLPFTFGQGTKEIKSSSEPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNYHTQK SLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSPSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGG SDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWWYQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQTGYLHTFGCGTKLEIKS	154
ALG.APV-018	MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGS MYWVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARSSYYGSYYSIDYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYYDNLPFTFGQGTKEIKSSSEPKS SDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN	156

【表 1 1 - 5】

Construct	AA Sequence	AA SEQ ID
	GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNYHTQK SLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSPSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYLNWWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFAT YYCQQTGYLHTFGCGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKCLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYYGGYYSAWMDYWGQGLTVTVSS	

ポリヌクレオチドおよびタンパク質発現法

本開示はまた、本開示のポリペプチド（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）または本明細書に記載のポリペプチドの1もしくは複数のポリペプチド鎖をコードする核酸（例えば、DNAまたはRNA）を包含する。本開示の核酸は、下記の、表1～10に列挙されたポリヌクレオチドと実質的に同一な領域を有する核酸を包含する。特定の実施形態では、本開示に係る核酸は、表1～10に列挙されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも80%、典型的には少なくとも約90%、より典型的には少なくとも約95%または少なくとも約98%の同一性を有し、当該核酸はs c F v - F c - s c F vフォーマット

10

10

20

20

の多特異性ポリペプチドであるポリペプチドをコードし、このコードされたポリペプチドは、（1）抗5 T 4 V_Lの99位のL C D R 1におけるYからFへの置換；（2）抗5 T 4 V_Lの148位のF R 3におけるFからSへの置換；（3）抗4-1 B B V_Hの150位のH C D R 1におけるYからHへの置換；および（4）抗4-1 B B V_Hの127位のF R 3におけるRからHへの置換、のうちの1または複数を含む。また、本開示の核酸は相補的核酸も包含する。ある場合では、これらの配列はアラインメント時に完全相補（ミスマッチなし）となる。他の場合で、配列に最大で20%程度のミスマッチが含まれることがある。本開示のいくつかの実施形態では、本開示の二重特異性タンパク質の第一ポリペプチド鎖および第二ポリペプチド鎖の両方をコードする核酸が提供される。本明細書において提供される核酸配列は、コドン最適化、縮重配列、サイレント変異、および特定の宿主における発現を最適化する他のDNA技術を用いて探索することができ、本開示はそのような配列改変も包含する。

【0225】

本開示は、本開示のポリペプチド（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）をコードする単離された核酸分子であって、配列番号109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、171、173、および175から選択されるヌクレオチド配列を含む、前記核酸分子に関する。

【0226】

目的のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子は、当該分子をベクター内に配置することにより伝搬される。ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターが使用され、例えばプラスミドが使用される。プラスミドの選択は、伝搬が望まれる細胞の種類、および伝搬の目的に依存する。目的DNA配列を大量に増幅および作製するのには、特定のベクターが有用である。他のベクターで、培養下の細胞での発現に好適なものもある。さらに他のベクターで、動物またはヒトの全身の細胞における、導入および発現に好適なものもある。適切なベクターの選択は十分に当業者の技能の範囲内である。このようなベクターの多くは市販されている。部分長または完全長のポリヌクレオチドは、通常はベクター内の切断した制限酵素部位へのDNAリガーゼの結合によって、ベクターに挿入される。あるいは、インビボにおける相同組換えによって、目的のヌクレオチド配列を挿入することもできる。これは通常、目的のヌクレオチド配列の両脇に、ベクターと相同な領域を結合することにより達成される。相同領域は、例えば、オリゴヌクレオチドのライゲーションによって、または、相同領域および目的ヌクレオチド配列の一部の両方を含むプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によって、追加される。

30

40

【0227】

発現には、発現カセットまたは発現系が用いられ得る。本明細書で開示されるポリペプチドをコードする核酸を発現させるため、当該ポリペプチドをコードする核酸分子が、発現ベクターにおける転写発現を制御する制御配列に機能的に連結され、これが宿主細胞に導入される。プロモーターおよびエンハンサーなどの転写制御配列に加え、発現ベクターは、翻訳制御配列、および当該発現ベクターを保有する細胞のセレクションに好適なマーカー遺伝子を含み得る。本開示のポリヌクレオチドにコードされる遺伝子産物は、好都合

50

なあらゆる発現系で発現され、例えば、細菌系、酵母系、昆虫系、両生類系、および哺乳類系が挙げられる。前記発現ベクターにおいて、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、目的の発現特性を得るために、必要に応じて制御配列に連結される。これらの制御配列には、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、オペレーター、リプレッサー、およびインデューサーが含まれ得る。プロモーターは、制御型（例えば、ステロイド誘導性 pIND ベクター（インビトロジェン社）由来のプロモーター）、または常時発現型（例えば、CMV、SV40、伸長因子、またはLTR 配列由来のプロモーター）であり得る。プロモーターは、ベクターへの連結のための上記の技術を用いて、目的ヌクレオチド配列に連結される。当該技術分野において公知のあらゆる技術を使用できる。従って、発現ベクターは、通常、誘導型または常時発現型であり得る転写／翻訳開始領域を提供し、ここに、前記転写開始領域の転写調節下でコード領域が機能的に連結され、さらに、当該発現ベクターは転写／翻訳終結領域を提供する。

10

【0228】

発現カセット（「発現ユニット」）は、種々のベクター、例えば、プラスミド、BAC、YAC、λ、P1、M13 などのバクテリオファージ、植物ウイルスベクターまたは動物ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスをベースとしたベクター、アデノウイルスベクター）など、に導入することができ、これらのベクターは通常、当該発現ベクターを含む細胞のセクションを可能にする能力によって特徴付けられる。これらのベクターは、染色体外での特にプラスミドもしくはウイルスとしての保持、または宿主染色体への組み込み、を実現し得る。染色体外の保持が望まれる場合、複製起点がプラスミドの複製用に与えられ、この複製起点は低コピー数であっても高コピー数であってもよい。種々様々なマーカーがセクションに利用でき、特に毒素から保護するマーカー、より詳細には抗生物質から保護するマーカーが利用できる。選択された特定のマーカーは、宿主の性質に基づいて選択されたものであり、栄養要求性の宿主には相補性を利用できる場合がある。DNA コンストラクトの導入には、好都合なあらゆる方法を用いることができ、例えば、複合体形成（conjugation）、細菌形質転換、DNA のカルシウム沈殿、エレクトロポレーション、融合、トランスフェクション、ウイルスベクター感染、微粒子銃などが挙げられる。本開示は、配列番号 109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、171、173、および 175 から選択されるヌクレオチド配列を含み得る核酸セグメントを含む発現ベクターに関する。

20

30

【0229】

従って、本開示において使用されるタンパク質は、従来技術による遺伝子改変宿主細胞で産生させることができる。好適な宿主細胞とは、外来性 DNA による形質転換またはトランスフェクションが可能であり培養液中で培養できる細胞型であり、例えば、細菌、真菌細胞、およびより高次の培養真核細胞（多細胞生物の培養細胞を含む）、特に培養哺乳類細胞が挙げられる。クローン化 DNA 分子を操作する法および種々の宿主細胞に外来性 DNA を導入する方法は、Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001)、および Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (4th ed., John Wiley & Sons, 1999) が開示している。

40

【0230】

例えば、本明細書に記載の 2 つの同一の結合ポリペプチドを含むホモ二量体結合タンパク質の組み換え発現の場合、発現ベクターには通常、前記結合ポリペプチドをコードする核酸セグメントが、プロモーターに機能的に連結された状態で含まれることとなる。相異なる第一ポリペプチド鎖および第二ポリペプチド鎖を含むヘテロ二量体結合タンパク質の組み換え発現の場合、当該ヘテロ二量体タンパク質全体の発現のために、前記第一ポリペプチド鎖および第二ポリペプチド鎖が、宿主細胞において、別々のベクターから共発現され得る。あるいは、ヘテロ二量体結合タンパク質の発現の場合、当該ヘテロ二量体タンパ

50

ク質全体の発現のために、第一ポリペプチド鎖および第二ポリペプチド鎖が、宿主細胞において、同一ベクター内の別々の発現ユニットから共発現される。発現ベクターは従来技術によって宿主細胞に導入され、次に、このトランスフェクト細胞が従来技術によって培養されることにより、コードされたポリペプチドが産生されて、対応する結合タンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）が生成される。

【0231】

組換えタンパク質を宿主細胞の分泌経路に向かわせるために、分泌シグナル配列（別名、リーダー配列）が発現ベクター内に与えられる。この分泌シグナル配列は、組換えタンパク質の天然型の分泌シグナル配列であってもよいし、別の分泌型タンパク質由来であってもよいし、新規に合成されてもよい。この分泌シグナル配列は、ポリペプチドをコードするDNA配列に機能的に連結され、すなわち、これらの2つの配列は、新規合成ポリペプチドを宿主細胞の分泌経路に向かわせるように、正しい読み取り枠で接続され、配置される。分泌シグナル配列は通常、目的ポリペプチドをコードするDNA配列の5'側に位置するが、ある特定のシグナル配列は目的DNA配列内のどこか他の場所に位置し得る（例えば、米国特許第5,037,743号および同第5,143,830号）。

【0232】

培養哺乳類細胞は、本開示の中で使用される、本開示の組換えポリペプチドおよび組換えタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）を産生させるのに好適な宿主である。哺乳類宿主細胞に外来性DNAを導入する方法としては、リン酸カルシウムを介したトランスフェクション（Wigler et al., Cell 14:725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham and Van der Eb, Virology 52:456, 1973）、エレクトロポレーション（Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982）、DEAE-デキストランを介したトランスフェクション（Ausubel et al., 上記）、およびリボソームを介したトランスフェクション（Hawley-Nelson et al., Focus 15:73, 1993; Ciccarone et al., Focus 15:80, 1993）が挙げられる。培養哺乳類細胞における組換えポリペプチドの生成は、例えば、米国特許第4,713,339号；同第4,784,950号；同第4,579,821号；および同第4,656,134号に開示されている。好適な哺乳類宿主細胞の例としては、アフリカミドリザル腎細胞（Vero; ATCC CRL 1587）、ヒト胎児由来腎臓細胞（293-HEK; ATCC CRL 1573）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314）、イヌ腎細胞（MDCK; ATCC CCL 34）、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO-K1; ATCC CCL 61; CHO DG44; CHO DXB11（ハイクローン社（Hyclone）、ユタ州ローガン）；例えば、Chasin et al., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555, 1986も参照）、ラット下垂体細胞（GH1; ATCC CCL 82）、HeLa S3細胞（ATCC CCL 2.2）、ラット肝癌細胞（H-4-II-E; ATCC CRL 1548）、SV40形質転換サル腎細胞（COS-1; ATCC CRL 1650）、およびマウス胎児性細胞（NIH-3T3; ATCC CRL 1658）が挙げられる。さらなる好適な細胞株として、当該技術分野において公知であり、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（バージニア州マナッサス）などの公的寄託機関から入手できるものがある。SV-40またはサイトメガロウイルス由来のプロモーターなどの、強力な転写プロモーターを使用できる。例えば、米国特許第4,956,288号を参照されたい。他の好適なプロモーターとして、メタロチオネイン遺伝子由来のプロモーター（米国特許第4,579,821号および同第4,601,978号）、およびアデノウイルス主要後期プロモーターが挙げられる。

【0233】

外来DNAがインサートされた培養哺乳類細胞をセレクションするために、薬剤によるセレクションが通常は利用される。そのような細胞は一般に「トランスフェクタント」と称される。セレクション用薬剤の存在下で培養され、目的遺伝子を子孫に遺伝することが

10

20

30

40

50

可能な細胞は、「安定なトランスフェクタント」と称される。選択マーカーの例としては、G-418などのネオマイシン型薬剤の存在下でのセレクトシヨンの実行を可能にする、抗生物質のネオマイシンに対する耐性をコードする遺伝子；ミコフェノール酸／キサンチンの存在下での宿主細胞の増殖を可能にする、キサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (xanthine-guanine phosphoribosyl transferase) の *gpt* 遺伝子；並びに、ゼオシン、ブレオマイシン、ブラストサイジン (blastocidin)、およびハイグロマイシンに対する耐性を与えるマーカー（例えば、Gatignol et al., Mol. Gen. Genet. 207:342, 1987; Drocourt et al., Nucl. Acids Res. 18:4009, 1990を参照）が挙げられる。セレクトシヨン系は、「増幅」と呼ばれる、目的遺伝子の発現レベルを増加させる工程にも使用できる。増幅は、トランスフェクタントを低レベルのセレクトシヨン用薬剤の存在下での培養した後、セレクトシヨン用薬剤の量を増加させることで、導入遺伝子産物を高レベルに産生する細胞をセレクトシヨンすることにより、実行される。増幅用選択マーカーの例として、メトトレキサートに対する耐性を付与するジヒドロ葉酸還元酵素がある。他の薬剤耐性遺伝子（例えば、ハイグロマイシン耐性、多剤耐性、ピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ）も使用できる。

【0234】

他のより高次の真核細胞も宿主として使用でき、例えば、昆虫細胞、植物細胞、および鳥類細胞が挙げられる。アグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) の植物細胞における遺伝子発現用のベクターとしての使用は、Sinkar et al., J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987でレビューされている。昆虫細胞の形質転換および当該形質転換細胞における外来ポリペプチドの産生が、米国特許第5,162,222号およびPCT国際公開第94/06463号で開示されている。

【0235】

昆虫細胞は、一般的にはオートグラファ・カリフォルニカ核多核体病ウイルス (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) (AcNPV) 由来の、組換えバキュロウイルスに感染させることができる。King and Possee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide (Chapman & Hall, London); O'Reilly et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual (Oxford University Press, New York 1994); および Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology (Richardson ed., Humana Press, Totowa, NJ, 1995) を参照されたい。組換えバキュロウイルスは、Luckow et al. (J. Virol. 67:4566-4579, 1993) により報告された、トランスポゾンベースの系を用いることでも、作製できる。この系は、導入ベクターを利用しており、キットの形態で市販されている (BAC-T-O-BACキット; ライフテクノロジーズ社、メリーランド州ゲイサースバーグ)。前記導入ベクター（例えば、PFAS-T-BAC1; ライフテクノロジーズ社）は、「バクミド」と呼ばれる大型プラスミドとして大腸菌 (*E. coli*) 内に維持されるバキュロウイルスゲノム内に、目的タンパク質をコードするDNAを移動させるためのTn7トランスポゾンを含む。Hill-Perkins and Possee, J. Gen. Virol. 71:971-976, 1990; Bonning et al., J. Gen. Virol. 75:1551-1556, 1994; および Chazenbalk and Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543-1549, 1995を参照されたい。さらに、導入ベクターは、上記で開示されたポリペプチド伸長物またはアフィニティータグをコードするDNAとのインフレーム融合物を含み得る。当該技術分野において公知の技術を用いて、タンパク質をコードするDNA配列を含む導入ベクターが大腸菌宿主細胞にトランスフォームされ、それらの細胞が、組換えバキュロウイルスを示唆する分断化された *lacZ* 遺伝子を含むバクミドについてスクリーニングされる。組換えバキュロウイルスゲノムを含むバクミドDNAが一般的な技術を用いて単離され、Sf9細胞などのヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞のトランスフェクションに使用される。目的タンパク質 (protein or interest) を発現する組換えウイルスがその後に産生される。当該技術分野において一般的に使用される方法により、組換えウイルスのストックが作製される。

【0236】

タンパク質産生について、前記組換えウイルスを用いて、宿主細胞、通常はツマジロクサヨトウ由来細胞株、ヨトウガ (*Spodoptera frugiperda*) 由来細胞株 (例えば、S f 9 細胞または S f 2 1 細胞) またはイラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) 由来細胞株 (例えば、HIGH FIVE (商標) 細胞; インビトロジェン社、カリフォルニア州カールズバッド) への感染が行われる。通例、Glick and Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA* (ASM Press, Washington, D.C., 1994) を参照されたい。また、米国特許第 5, 300, 435 号も参照されたい。細胞の増殖および維持には無血清培地が使用される。好適な培地配合物は当該技術分野において公知であり、商業的供給業者から入手できる。細胞を、およそ $2 \sim 5 \times 10^5$ 細胞の播種密度から $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞の密度まで増殖させ、この時点で、組換えウイルスのストックが、0.1~10、通常は 3 に近い感染効率 (MOI) で加えられる。使用される手順は、入手可能な実験手順書に通例記載されているものである (例えば、上記 King and Possee; 上記 O'Reilly et al.; 上記 Richardson 参照)。

【0237】

酵母細胞をはじめとする真菌細胞も、本開示のポリペプチド (例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および/またはその多特異的結合タンパク質) を産生させるために、本開示の中で使用できる。これに関連した酵母種としては、例えば、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、およびピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) が挙げられる。出芽酵母 (*S. cerevisiae*) 細胞を外来性 DNA で形質転換し、形質転換細胞から組換えポリペプチドを産生させる方法は、例えば、米国特許第 4, 599, 311 号; 同第 4, 931, 373 号; 同第 4, 870, 008 号; 同第 5, 037, 743 号; および同第 4, 845, 075 号で開示されている。形質転換細胞は、選択マーカーによって決定される表現型、一般的には薬剤耐性または特定の栄養分 (例えば、ロイシン) の非存在下での増殖能、によるセレクションを受ける。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) で使用されるベクター系の例としては、Kawasaki et al. (米国特許第 4, 931, 373 号) で開示された P O T 1 ベクター系があり、形質転換細胞の、グルコース含有培地中の増殖によるセレクションが可能である。酵母で使用される好適なプロモーターおよびターミネーターとしては、解糖酵素遺伝子由来のもの (例えば、米国特許第 4, 599, 311 号; 同第 4, 615, 974 号; および同第 4, 977, 092 号) およびアルコール脱水素酵素遺伝子由来のものが挙げられる。また、米国特許第 4, 990, 446 号; 同第 5, 063, 154 号; 同第 5, 139, 936 号; および同第 4, 661, 454 号も参照されたい。ハンセヌラ・ポリモルパ (*Hansenula polymorpha*)、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、クリベロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*)、クリベロマイセス・フラギリス (*Kluyveromyces fragilis*)、トウモロコシ黒穂病菌 (*Ustilago maydis*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)、ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*)、ピキア・グイリエルモンディ (*Pichia guilliermondii*)、およびカンジダ・マルトーサ (*Candida maltosa*) を含む、他の酵母用の形質転換系も、当該技術分野において公知である。例えば、Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* 132:3459-3465, 1986; 米国特許第 4, 882, 279 号; および Raymond et al., *Yeast* 14:11-23, 1998 を参照されたい。アスペルギルス属細胞を、McKnight et al.、米国特許第 4, 935, 349 号の方法に従って利用できる。アクレモニウム・クリソゲナム (*Acremonium chrysogenum*) を形質転換する方法が、Sumino et al.、米国特許第 5, 162, 228 号で開示されている。アカパンカビ属 (*Neurospora*) を形質転換する方法が、Lambowitz、米国特許第 4, 486, 533 号で開示されている。ピキア・メタノリカ (*Pichia methanolica*) における組換えタンパク質の産生が、米国特許第 5, 716, 808 号; 同第 5, 736, 383 号; 同第 5, 854, 039 号; および同第 5, 888, 768 号で開示されている。

【0238】

大腸菌 (*Escherichia coli*)、バチルス属細菌、および他の属の細菌の菌株を含む、原

10

20

30

40

50

核生物宿主細胞も、例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／または抗 5 T 4 × 抗 4-1 B B 分子を含むその多特異的結合タンパク質を産生させるために、本開示の中で有用な宿主細胞である。これらの宿主を形質転換し、クローニングされた外来 DNA 配列を発現させる技術は、当該技術分野において周知である（例えば、上記 Sambrook and Russell 参照）。大腸菌などの細菌において組換えタンパク質を発現させる場合、タンパク質は、通常は不溶性の顆粒として細胞質中に保持させるか、または、細菌性分泌配列により細胞膜周辺腔へと方向付けることができる。前者の場合、細胞は溶解されて、前記顆粒が回収され、例えば、グアニジンイソチオシアネートまたは尿素を用いて変性される。この変性されたタンパク質はその後、尿素、並びに還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンの組み合わせの溶液に対しての透析の後、緩衝生理食塩水に対しての透析などにより、前記変性剤を希釈することによって、リフォールディングおよび二量体化できる。あるいは、前記タンパク質は、可溶型で細胞質から回収し、変性剤を用いずに単離することができる。前記タンパク質は、リン酸緩衝生理食塩水などに含まれた水性の抽出物として前記細胞から回収される。目的のタンパク質を捕捉するために、前記抽出物が抗体固定カラムまたはヘパリンセファロースカラムなどのクロマトグラフ媒体に直接アプライされる。分泌タンパク質は、細胞を破壊して（例えば、超音波処理または浸透圧ショックにより）、細胞膜周辺腔の内容物を放出させ、当該タンパク質を回収することで、可溶性且つ機能的な形態で細胞膜周辺腔から回収することができ、これにより、変性およびリフォールディングの必要性をなくすることができる。細菌宿主細胞における、一本鎖抗体をはじめとした抗体の産生は、公知の方法に従って行うことができる。例えば、Bird et al., Science 242:423-426, 1988; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988; および Pantoliano et al., Biochem. 30:10117-10125, 1991 を参照されたい。

【0239】

本開示のポリペプチドおよびタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）を産生するように形質転換またはトランスフェクションされた宿主細胞は、栄養分および選択された宿主細胞の増殖に必要な他の成分を含有する培地中で、従来の手順に従って培養される。限定培地および複合培地を含む様々な好適な培地が、当該技術分野において公知であり、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミン、およびミネラルを通常含む。必要に応じて、培地は増殖因子または血清のような成分も含有できる。増殖培地は、通常、発現ベクターに保有された、または宿主細胞に同時トランスフェクションされた選択マーカーによって補完される、例えば、薬剤セクションまたは必須栄養素の欠乏によって、外来性 DNA を含有する細胞のセクションが行われる。

【0240】

本開示のタンパク質およびポリペプチド（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、従来のタンパク質精製法により、通常はクロマトグラフ法の組み合わせにより、精製できる。通例、Affinity Chromatography: Principles & Methods (ファルマシア・LKB・バイオテクノロジー社 (Pharmacia LKB Biotechnology)、ウプサラ、スウェーデン、1988年) ; Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (シュプリンガー・フェアラーク社 (Springer-Verlag)、ニューヨーク、1994年) を参照されたい。免疫グロブリン Fc 領域を含むタンパク質は、固定されたプロテイン A またはプロテイン G に対するアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。ゲル濾過など、追加の精製工程を用いて、目的の精製レベルを達成したり、あるいは脱塩、緩衝液交換などを実現することができる。

【0241】

組成物および使用法

本開示は、5 T 4 の発現を特徴とする障害を有する対象を治療するための方法を提供する。概して、このような方法は、そのような治療を必要としている対象に、本開示タンパ

ク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4 - 1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）を投与することを含む。いくつかの実施形態では、5 T 4 結合ポリペプチド、4 - 1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質（例えば、抗 5 T 4 × 抗 4 - 1 B B 分子）は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）活性および／または補体依存性細胞傷害（C D C）活性を誘導しないか、最小限にしか誘導しない。

【0242】

他の実施形態では、前記結合タンパク質（例えば、多特異的結合タンパク質）がエフェクター細胞と特異的に結合する（例えば、4 - 1 B B に特異的に結合する）第二の結合ドメインを含む場合、前記結合タンパク質および／または多特異的結合タンパク質は、対象における 5 T 4 発現細胞に対するエフェクター細胞の活性化の増強をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、前記結合タンパク質および／または多特異的結合タンパク質は、エフェクター細胞の増殖の増大、エフェクター細胞の 1 もしくは複数のサイトカイン（例えば、I F N γ 、T N F α 、I L - 6、I L - 8、I L - 12、I L - 1 α など）の産生の増加、または 1 もしくは複数の細胞表面活性化マーカー（例えば、C D 137、M H C - I I、または C D 69）の発現増加をもたらす。エフェクター細胞の活性化は、当該技術分野において公知の様々な手段により測定することができ、例えば、細胞表面マーカーの発現の変化を評価するためのフローサイトメトリー、免疫蛍光法、および免疫組織化学、サイトカインおよび他の因子の産生を評価するための E L I S A、増殖を評価するための細胞数、遺伝子発現の変化を評価するための q P C R などが挙げられる。

【0243】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の多特異性結合タンパク質は、異なる構造の第二の多特異性ポリペプチドと比較して、エフェクター細胞の活性化の増強を示す。例えば、いくつかの実施形態では、第一の多特異性ポリペプチドは、5 T 4 に特異的に結合する第一 s c F v ドメインおよび 4 - 1 B B に特異的に結合する第二 s c F v を、結合ドメインリンカーおよび免疫グロブリン F c ドメインと共に、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって以下の構成で含む：（i）第一 s c F v ドメイン、（i i）ヒンジ領域、（i i i）免疫グロブリン定常領域、（i v）結合ドメインリンカー、および（v）第二 s c F v ドメイン。この例では、第二の多特異的結合タンパク質は、抗 4 - 1 B B 抗体と抗 5 T 4 s c F v とを含む I g G - s c F v 構造を含む。いくつかの実施形態では、第一の多特異的結合タンパク質は、第二の多特異性ポリペプチドと比較して、エフェクター細胞の活性化の統計的に有意な増強を示す。例えば、いくつかの実施形態では、第一の多特異的結合タンパク質は、N F - κ B レポーター発現 J u r k a t 細胞アッセイにおいて、第二の多特異的結合タンパク質において確認された値よりも低値の E C ₅₀ を示す（例えば、実施例 10 を参照）。いくつかの実施形態では、第一の多特異的結合タンパク質の E C ₅₀ は、第二の多特異的結合タンパク質の E C ₅₀ と比較して、約 1 / 2 倍、約 1 / 3 倍、約 1 / 4 倍、約 1 / 5 倍、約 1 / 6 倍、約 1 / 7 倍、約 1 / 8 倍、約 1 / 9 倍、約 1 / 10 倍、またはそれ以下に減少する。E C ₅₀ 値は、非線形回帰分析および当該技術分野において公知の他の統計手法で求めることができる。

【0244】

いくつかの実施形態では、第一の多特異的結合タンパク質は、第二の多特異性ポリペプチドと比較して、エフェクター細胞の増殖の統計的に有意な増加を誘導する。例えば、いくつかの実施形態では、第一の多特異的結合タンパク質は、第二の多特異的結合タンパク質によって誘導される増殖と比較して、プライミングされたヒト C D 8 + T 細胞の増殖の統計的に有意な増加を誘導する（例えば、実施例 22 を参照）。いくつかの実施形態では、第一の多特異的結合タンパク質は、第二の多特異的結合タンパク質によって誘導されるエフェクター細胞の増殖と比較して約 2 倍、約 3 倍、約 4 倍、約 5 倍、約 6 倍、約 7 倍、約 8 倍、約 9 倍、約 10 倍、またはそれ以上のエフェクター細胞の増殖の増大を示す。

【0245】

本開示のタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4 - 1 B B 結合ポリペプチド

、および／またはその多特異的結合タンパク質）により対象を治療する前記方法の特定の変更形態では、前記障害はがんである。本開示のタンパク質による治療に適しているがんの例としては、例えば、乳がん（例えば、トリプルネガティブ乳がん（TNBC））、膵がん、卵巣がん、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、造血器腫瘍（例えば、慢性リンパ球性白血病（CLL）、マンツル細胞白血病（mantle cell leukemia）（MCL）または急性リンパ芽球白血病（ALL））、皮膚がん（例えば、扁平上皮癌またはメラノーマ）、副腎がん、膀胱がん、子宮頸がん、腎がん、胃がん、前立腺がん、甲状腺がん、肝臓がん、子宮がん、神経細胞または神経細胞鞘に形成される腫瘍（例えば、神経線維腫）、肉腫、癌腫、または頭頸部がんが挙げられる。TNBCは、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、およびHER2/neuの染色が生じない乳がんとして定義される。いくつかの実施形態では、対象における中皮腫を治療するために、本開示のタンパク質が前記対象に投与され得る。1つの実施形態では、対象における明細胞癌を治療するために、本開示のタンパク質が前記対象に投与され得る。1つの実施形態では、対象における横紋筋腫瘍を治療するために、本開示のタンパク質が前記対象に投与され得る。

【0246】

別の実施形態では、本開示は、5T4発現細胞に対するエフェクター細胞の活性化を増強するための方法であって、前記5T4発現細胞を本開示のタンパク質（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）と接触させることを含み、前記接触が前記5T4発現細胞に対するエフェクター細胞の活性化の増強が誘導される条件下で行われる、前記方法を包含する。いくつかの実施形態では、本開示は、5T4発現細胞に対するエフェクター細胞の活性化を増強するための方法であって、前記5T4発現細胞を、ヒト5T4のエピトープと特異的に結合する第一結合ドメインおよび4-1BBと特異的に結合する第二結合ドメイン（例えば、抗5T4×抗4-1BB分子）を含む本開示のタンパク質（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）と接触させることを含み、前記接触が前記5T4発現細胞に対するエフェクター細胞の活性化の増強が誘導される条件下で行われる、前記方法に関する。本開示は、5T4発現細胞のエフェクター細胞依存性溶解を誘導するための方法であって、前記5T4発現細胞を本開示のタンパク質（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）と接触させることを含み、第二の結合ドメインが4-1BBと特異的に結合し（例えば、抗5T4×抗4-1BB分子）；前記接触が、前記5T4発現細胞のエフェクター細胞の活性化の増強が誘導される条件下で行われ、その結果、前記5T4発現細胞の溶解がもたらされる、前記方法を包含する。いくつかの実施形態では、本開示は、5T4発現細胞のエフェクター細胞依存性溶解を誘導するための方法であって、前記5T4発現細胞を、ヒト5T4のエピトープと特異的に結合する第一結合ドメインおよび4-1BBと特異的に結合する第二結合ドメインを含む本開示のタンパク質（例えば、抗5T4×抗4-1BB分子）と接触させることを含み；前記接触が、前記5T4発現細胞のエフェクター細胞の活性化の増強が誘導される条件下で行われ、その結果、前記5T4発現細胞の溶解がもたらされる、前記方法に関する。

【0247】

本開示はまた、5T4の発現を特徴とする障害（例えば、がん）を治療するための医薬の製造のための、タンパク質およびポリペプチド（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）を包含する。1つの実施形態では、前記タンパク質またはポリペプチドは、抗5T4結合ドメインおよび抗4-1BB結合ドメインを含み（例えば、抗5T4×抗4-1BB分子）、エフェクター細胞の活性化を増強する活性を有する。1つの実施形態では、本開示は、5T4の発現を特徴とする障害（例えば、がん）の治療に使用される、タンパク質およびポリペプチド（例えば、抗5T4×抗4-1BB分子）を提供する。特定の実施形態では、本開示は、対象における5T4の発現を特徴とする障害を治療するための方法であって、前記対象に、治療有効量の、ヒト5T4のエピトープと特異的に結合する5T4結合ドメインを含

む本開示のタンパク質またはポリペプチド（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4 - 1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）を投与することを含む、前記方法に関する。

【0248】

いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者を治療する方法であって、前記患者に、本明細書に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド（例えば、配列番号136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、172、174、および176からなる群から選択されるアミノ酸配列）を投与することを含む、前記方法を提供する。別の実施形態では、前記ポリペプチドはFcを含む。例えば、いくつかの実施形態では、本開示は、がん患者を治療する方法であって、前記患者に5 T 4 結合ドメインおよびFcを含むポリペプチドを投与することを含み、前記ポリペプチドは配列番号136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、172、174、および176からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、前記方法を提供する。またさらなる実施形態では、本開示は、がん患者を治療する方法であって、前記患者に5 T 4 結合ドメインおよび4 - 1 B B 結合ドメインを含むポリペプチドを投与することを含み、前記ポリペプチドは配列番号136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、172、174、および176からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、前記方法を提供する。1つの実施形態では、本開示は、がん患者を治療する方法であって、前記患者に5 T 4 結合ドメインおよび4 - 1 B B 結合ドメインを含むポリペプチドを投与することを含み、前記ポリペプチドは配列番号172を含む、前記方法を提供する。1つの実施形態では、本開示は、がん患者を治療する方法であって、前記患者に5 T 4 結合ドメインおよび4 - 1 B B 結合ドメインを含むポリペプチドを投与することを含み、前記ポリペプチドは配列番号174を含む、前記方法を提供する。

【0249】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療法および使用においては、本明細書に記載のタンパク質またはポリペプチド（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4 - 1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）が、治療が求められる疾患または障害の管理に関連した従来法に合致する方法で送達される。本明細書の開示によれば、治療有効量の前記タンパク質またはポリペプチドが、そのような治療を必要としている対象に、疾患または障害の予防または治療に十分な時間、それに十分な条件下で、投与される。

【0250】

本開示のタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4 - 1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）の投与の対象には、5 T 4 発現を特徴とするある特定の障害を既に発症している患者だけでなく、そのような障害を発症するリスクが高い患者も包含される。通常、前記対象は、治療が求められる障害を有していると診断された対象である。さらに、対象は、治療中に、前記障害におけるあらゆる変化について（例えば、前記障害の臨床症状の増大または低減について）、モニタリングされ得る。また、いくつかの変形態では、前記対象は、5 T 4 発現細胞の標的化を含む治療を要する別の障害に罹患していない。

【0251】

予防的な適用では、本開示のタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4 - 1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）を含む医薬組成物または薬剤が、特定の障害に罹患しやすい、または特定の障害のリスクがある患者に、前記障害の除去、またはそのリスク低減、またはその発症の遅延に十分な量で、投与される。治療的な適用では、本開示のタンパク質を含む組成物または薬剤が、そのような障害に罹患している疑いがある、または既に罹患している患者に、障害およびその合併症の症状の治癒、またはその少なくとも部分的な進行阻止に十分な量で、投与される。これの達成に適した量を治療有効用量または治療有効量と称する。予防的なレジーム (regime) および

治療的なレジームの両方において、薬剤は通常、十分な応答（例えば、不適切な血管新生活性の阻害）が達成されるまで、数回の投薬において、投与される。通常、この応答はモニターされ、目的の応答が弱まり始めた場合、反復的な投薬が行われる。

【0252】

本開示の方法による治療の対象患者を特定するために（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）、特定の障害に関連する危険因子を決定するための、または、対象において確認された既存の障害の状態を決定するための、承認されたスクリーニング法が用いられ得る。このような方法は、例えば、個人に、特定の障害を持つと診断された親類がいるかどうかを確認することを含み得る。スクリーニング法は、例えば、遺伝的要素があることが知られている特定の障害について、家族の状態を確認するための、従来の精密検査も含み得る。例えば、種々のがんにも、特定の遺伝的要素があることが知られている。がんの遺伝的要素としては、例えば、がん化を起こしている複数の遺伝子における変異（例えば、R a s、R a f、E G F R、c M e t など）、特定の H L A およびキラー細胞抑制受容体（K I R）分子の有無、またはがん細胞による、N K 細胞およびT細胞のような細胞の免疫抑制の調節を可能にする、直接的または間接的な機構が挙げられる（例えば、Ljunggren and Malmberg, Nature Rev. Immunol. 7:329-339, 2007; Boyton and Altmann, Clin. Exp. Immunol. 149:1-8, 2007を参照されたい）。この目的に向けて、通例、ヌクレオチドプローブを用いて、目的の特定の障害に関連した遺伝子マーカーを保因する個人が特定され得る。さらに、特定の障害のマーカーを特定するのに有用な、種々様々な免疫学的方法が、当該技術分野において公知である。例えば、モノクローナル抗体プローブを用いて特定の腫瘍に関連した抗原を検出する、様々なE L I S A 免疫測定法が、利用可能であり、当該技術分野において周知である。既知の患者の症候、年齢因子、関連危険因子などで示される、スクリーニングが実行され得る。これらの方法は、臨床医が、本明細書に記載の治療法を必要としている患者をルーチンに選定することを可能にする。これらの方法によれば、病的な5 T 4 発現細胞の標的化が、独立した治療プログラムとして、または他の治療に対する追跡的、補助的、もしくは協調的な治療レジメンとして、実行され得る。

【0253】

投与のために、本開示のタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は医薬組成物として製剤化され得る。医薬組成物は、(i) 5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質（例えば、抗5 T 4 × 抗4-1 B B 分子）；並びに(ii) 薬剤的に許容できる担体、希釈剤、または賦形剤、を含み得る。5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質（例えば、抗5 T 4 × 抗4-1 B B 分子）を含む医薬組成物が、薬剤として有用な組成物を調製するための既知の方法に従って製剤化されることにより、当該治療用分子が、混合物中で、薬剤的に許容できる担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせられ得る。担体は、その投与が受容者である患者に忍容され得る場合に、「薬剤的に許容できる担体」とされる。無菌リン酸緩衝生理食塩水は薬剤的に許容できる担体の一例である。他の好適な担体、希釈剤、または賦形剤が当業者に周知である（例えば、Gennaro（編）、Remington's Pharmaceutical Sciences（Mack出版社、第19版、1995年）を参照）。製剤化は、1または複数の賦形剤、保存剤、溶解補助剤、緩衝剤、バイアル表面上でのタンパク質の損失を防ぐためのアルブミンなどをさらに含み得る。特定の実施形態では、医薬組成物は、ホモ二量体またはヘテロ二量体である、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質（例えば、抗5 T 4 × 抗4-1 B B 分子）を含む。「ホモ二量体」は、2つの同一のポリペプチド（例えば、本明細書に記載の抗5 T 4 × 抗4-1 B B 分子）から形成される二量体であり得る。

【0254】

本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質を含む医薬組成物は、経口投与用単位

剤形、静脈内投与用単位剤形、鼻腔内投与用単位剤形、坐剤用単位剤形、皮内投与用単位剤形、筋肉内投与用単位剤形、腹腔内投与用単位剤形、皮下投与用単位剤形、硬膜外投与用単位剤形、舌下投与用単位剤形、および脳内投与用単位剤形からなる群から選択される剤形に製剤化され得る。前記経口投与用単位剤形は、錠剤、丸剤、ペレット剤、カプセル剤、散剤、菓子錠剤、粒剤、水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤、徐放性製剤、エアゾール剤、および噴霧剤からなる群から選択され得る。

【0255】

本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）を含む医薬組成物は、治療有効量で対象に投与され得る。本開示の方法によれば、本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、例えば、筋肉内投与経路、皮下投与経路、静脈内投与経路、心房内投与経路、関節内投与経路、非経口投与経路、鼻腔内投与経路、肺内投与経路、経皮投与経路、胸膜内投与経路、くも膜下腔内投与経路、および経口投与経路を含む、種々の投与方法で対象に投与され得る。予防目的および治療目的で、作動薬（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）は、長期に亘っての持続的な送達（例えば、持続的な経皮送達）を介した単回ボラス送達で、または、反復投与プロトコル（例えば、毎時間、毎日、毎週、または毎月）で、対象に投与され得る。

【0256】

これに関連して、有効量の決定は、通常、動物モデル試験と、追跡的なヒト臨床試験をベースとして、モデル対象における対象障害の発生率または重症度を有意に低減する有効薬量および投与プロトコルの決定に基づいて行われる。本開示の組成物の有効量は、組成物それ自体の固有の活性と、個体において目的の応答を引き出す組成物の能力のほか、投与手段、標的部位、患者の生理状態、患者がヒトであるか動物であるか、他の投与薬剤、予防的処置か治療的処置かをはじめとする、多くの様々な要素に依存して異なる。通常、患者はヒトであるが、いくつかの疾患では、患者はヒト以外の哺乳動物であり得る。通例、投与計画は、最適な治療反応をもたらすように、すなわち、安全性および有効性を最適化するように、調整される。従って、治療有効量は、本明細書に記載の5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質（例えば、抗5 T 4 × 抗4-1 B B 分子）の投与の有益な効果が好ましくないあらゆる副次効果を上回る量ともされる。本明細書に記載のタンパク質またはポリペプチドの投与について、投与量は、対象の体重1 kg 当たり、約0.1 μg ~ 100 mg / kg または1 μg / kg ~ 約50 mg / kg の範囲であり、通常は10 μg ~ 5 mg / kg の範囲であり得る。より具体的な実施形態では、有効量の前記薬剤は、約1 μg / kg ~ 約20 mg / kg、約10 μg / kg ~ 約10 mg / kg、または約0.1 mg / kg ~ 約5 mg / kg である。この範囲内の投与量は、単回投与でも反復投与でも達成することができ、例えば、1日に複数回の投与、または1日1回の投与、週1回の投与、2週間に1回の投与、もしくは月1回の投与が挙げられる。例えば、特定の変態形態では、投与計画は、初回投与と、1週間間隔または2週間間隔の複数回のそれ以降の投与と、からなる。別の投与計画は、初回投与と、1か月間隔または2か月間隔の複数回のそれ以降の投与と、からなる。あるいは、障害の臨床症状のモニタリングによって必要が示された場合、投与は不定期であってもよい。

【0257】

本明細書に記載のポリペプチドまたはタンパク質（例えば、5 T 4 結合ポリペプチド、4-1 B B 結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）を含む医薬組成物の投与量は、標的部位における目的濃度を維持するために、担当臨床医による変更が可能である。例えば、静脈内送達様式が選択された場合、前記薬剤の標的組織における局所血中濃度は、約0.01 ~ 50 nM / L の前記組成物であり、場合により、対象の状態および予測される応答測定値に依存して、約1.0 nM / L から10、15、または2

5 nM/Lまでであり得る。送達様式によって、より高濃度またはより低い濃度が選択され得る（例えば、経皮送達と粘膜表面送達を比較）。投与製剤の放出速度によっても、投与量は調整されるべきである（例えば、鼻噴霧と、粉末、徐放性の経口用または注射用粒子、経皮製剤などを比較）。同じ血清中濃度レベルを達成するために、例えば、放出速度が5 nM（標準条件下）の徐放性粒子は、放出速度が10 nMの粒子の投与量の約2倍で投与される。

【0258】

また、本明細書に記載のタンパク質およびポリペプチド（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／またはその多特異的結合タンパク質）（例えば、抗5T4×抗4-1BB分子）は、約0.001～約10ミリグラム（mg）／キログラム（mpk）体重の1日投与量で投与され、好ましくは単回一日量として、または1日に2～6回程度の分割量で与えられ得る。ヒト成人患者に対しての投与の場合、治療有効量が、1回0.2mg、1回0.5mg、1回1mg、1回5mg、1回10mg、1回25mg、1回100mg、1回200mg、および1回400mgを含むがこれらに限定はされない、1回0.2mg～800mgの範囲内の用量で投与され、一連の治療において、複数回の、通常は連続的な一日量が投与され得る。本明細書に記載のタンパク質およびポリペプチド（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／または抗5T4×抗4-1BB分子などのその多特異的結合タンパク質）は、様々な時間に投与することができる。1つの実施形態では、最適治療量が夜に投与され得る。別の実施形態では、最適治療量が朝に投与され得る。本明細書に記載のタンパク質およびポリペプチドの総1日投与量は、従って、1つの実施形態では約1mg～約2gの範囲をとり得るが、約100mg～約1.5gの範囲をとる場合が多く、約200mg～約1200mgの範囲をとる場合が最も多い。典型的な70kgの成人の場合、抗5T4治療薬の総一日量は、約2mg～約1200mgの範囲をとり得るが、多くの場合、上記で言及したように、約0.2mg～約800mgの範囲をとることとなる。

【0259】

特に固形腫瘍の治療に関して、エンドポイントおよび抗腫瘍活性を評価するためのプロトコルが当該技術分野において周知である。各プロトコルにより規定される腫瘍反応評価は異なり得るが、RECIST（Response evaluation Criteria in solid tumors）（固形がんの治療効果判定のためのガイドライン）評価基準が、現在、国立がん研究所により、腫瘍反応を評価するための推奨のガイドラインとみなされている（Therasse et al., J. Natl. Cancer Inst. 92:205-216, 2000参照）。RECIST評価基準によれば、腫瘍反応とは、全ての測定可能な病変または転移の低減または除去を意味する。疾患は一般に、医療用写真もしくはX線、コンピューター体軸断層撮影法（CT）、磁気共鳴画像法（MRI）、または臨床検査（病変が表層にある場合）により、少なくとも1つの寸法において、従来技術を用いた場合で20mm以上、または、周縁部が明確に規定される特殊なCTスキャンを用いた場合で10mm以上と、正確な測定が可能である病変を含む場合に、測定可能とみなされる。測定不可の疾患とは、疾患が、従来技術を用いた場合で20mm未満、または特殊なCTスキャンを用いた場合で10mm未満の病変と、真に測定不可な病変（小さすぎて正確に測定できない）とから構成されることを意味する。測定不可の疾患としては、胸水、腹水、および間接的な証拠によって実証される疾患が挙げられる。

【0260】

客観的な状態の評価基準が固形腫瘍反応を評価するためのプロトコルに必要とされる。代表的な評価基準としては以下が挙げられる：（1）全ての測定可能な疾患の完全消失；新規病変なし；疾患に関連した症状なし；測定不可な疾患の証拠なしと定義される、完全奏功（CR）；（2）標的病変の最長直径の合計の30%減少と定義される、部分奏功（PR）；（3）標的病変の最長直径の合計の20%増加またはあらゆる新規病変の出現と定義される、進行性疾患（PD）；（4）CRにも、PRにも、進行性疾患にも資しないと定義される、安定または反応なし（上記Therasse et al.参照）。

【0261】

腫瘍学分野の中で認められている追加のエンドポイントとして、全生存（OS）、無病生存期間（DFS）、奏効率（ORR）、腫瘍増殖停止時間（TTP）、および無増悪生存期間（PFS）が挙げられる（以下を参照：Guidance for Industry: Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs and Biologics, April 2005、FDA医薬品評価研究センター、メリーランド州ロックヴィル）。

【0262】

本明細書に記載のタンパク質およびポリペプチド（例えば、5T4結合ポリペプチド、4-1BB結合ポリペプチド、および／または5T4×抗4-1BB分子などのその多特異的結合タンパク質）を含む医薬組成物は、本明細書に記載の医薬組成物を含む容器を含むキットとして供給され得る。医薬組成物は、例えば、単回投与用もしくは反復投与用の注射剤の形態で、または注射前に再構成されることとなる無菌の粉末として、提供され得る。あるいは、そのようなキットは、医薬組成物の投与のための、乾燥粉末用ディスペンサー、液体エアゾール発生器、または噴霧器を含み得る。そのようなキットは、医薬組成物の適応症および用法に関する書面情報をさらに含み得る。

【0263】

以下、実施例により本開示をさらに明らかにするが、これらの実施例は、本開示の単なる例示であり、限定する意図は全くない。

【実施例】

【0264】

実施例1：「1618」型抗CD137モノクローナル抗体のscFvフォーマットへの変換、およびADAPTIR（商標）フォーマット（scFv-Fc-scFv）の二重特異性抗CD137×抗5T4分子の作製

1618型scFvをコードするヌクレオチド配列を作製するために、例えば、限定はされないが、PCT国際公開第2007/146968号、同第2010/040105号、および同第2010/003108号；米国特許出願公開第2006/0051844号；並びに米国特許第7,166,707号に記載される、標準的な分子生物学的手法を用いて、1618型抗4-1BBモノクローナル抗体の重鎖可変ドメイン（V_H）および軽鎖可変ドメイン（V_L）（それぞれ、配列番号28および配列番号16）をコードするヌクレオチド配列を、既存のプラスミドDNAから合成および／または増幅し、（Gly）₄ Serベースのリンカーで連結した。次に、この1618型scFvのヌクレオチド配列を、点変異を含ませてFc領域のエフェクター機能活性を除去した改変型ヒトIgG1 Fc領域配列に融合させた。同様に、1210型抗5T4モノクローナル抗体のV_Hドメインをコードするヌクレオチド配列およびV_Lドメインをコードするヌクレオチド配列（それぞれ、配列番号38および68）を、追加の（Gly）₄ Serベースのリンカーで連結した。得られた二重特異性分子を、HEK-293細胞またはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞の一過性トランスフェクションにより発現させ、培養上清から、プロテインAアフィニティー精製（ProA）および分子ふるいクロマトグラフィー（SEC）を用いて精製した。プロテインA精製工程およびSEC精製工程がそれぞれ完了した後、分析用SECによりタンパク質純度を求めた。製造業者の使用説明書（instruction）に従ってEndosafe PTS装置を用いてエンドトキシンレベルを測定し、これらのインビトロ活性測定の結果が、エンドトキシンの存在と交絡しないことを確かめた。各タンパク質バッチを、SEC精製法の一部としてPBSに緩衝液交換し、1mg/mLに濃縮し、滅菌濾過し、必要となるまで4℃で保存した。理論吸光係数を用いて、280nmの吸光度からタンパク質濃度を求めた。

【0265】

場合により、前記二重特異性分子は、2個のscFvと1個のFcドメインとから構成され（scFv-Fc-scFv）、N末端からC末端に向かって1618型scFv-Fc-1210型scFvの構造を有した。加えて、1618型scFvをコンストラクトのC末端に配置し、1210型scFvをN末端に配置した（すなわち、1210型scFv-Fc-1618型scFv）、二重特異性分子を作製した。しかしながら、この

別配向を有する分子は、1618型 $scFv-Fc-1210$ 型の $scFv-Fc-scFv$ 分子との比較で評価した場合に、目的の特性が小さかった。

【0266】

HEK-293細胞に一過性トランスフェクションされた場合に、全てではないが大部分の1618- $Fc-1210$ 型 $scFv-Fc-scFv$ ADAPTIR (商標) 分子 (例えば、ALG.APV-006、ALG.APV-010、ALG.APV-014、およびALG.APV-018) が、Morrisonフォーマット (すなわちALG.APV-004) との比較で、発現レベルの有意な向上を示した。表12は、Morrison型二重特異性コンストラクト (ALG.APV-004) と比較した場合の、ADAPTIR (商標) 型二重特異性分子 (例えば、ALG.APV-006、ALG.APV-010、ALG.APV-014、およびALG.APV-018) の発現レベルの向上を示す代表的なデータを含む。1618型可変ドメインおよび1210型可変ドメインのアミノ酸配列はこの向上を達成するための改変がなされていなかったため、これは予期しない結果であった。これらの結果は、ADAPTIR (商標) 型二重特異性分子が治療用タンパク質薬剤の製造に有益であり得ることを示しており、というのも、高い発現レベルは、商品原価を引き下げ、他にも、市場の要求を満たすのに必要なプロダクションランが少なくなるなどの製造プロセスにおける効率をもたらす得るため、治療用タンパク質薬剤の製造に一般に有益と見なされるためである。

【0267】

HEK-293における明らかな発現向上の他に、表12に示されるように、培養上清から得られた二重特異性分子のプロテインA精製後に定量された凝集体レベルが、Morrisonフォーマット二重特異性分子 (ALG.APV-004) と比較した場合に、ADAPTIR (商標) 型二重特異性分子 (ALG.APV-006、ALG.APV-010、ALG.APV-014、およびALG.APV-018) において有意に改善された。

【表12】

表12: HEK-293における一過性発現レベルおよびプロテインA後の純度についての、ADAPTIR (商標) 型二重特異性分子およびMorrison型二重特異性分子の比較

コンストラクト	コンストラクトの特徴	二重特異性フォーマット	発現レベル($\mu\text{g/mL}$)	%純度 分析用SEC
ALG.APV-004	1618 mAb-1210 V_HV_L 、安定化用ジスルフィド有り	Morrison	13.0	81.7
ALG.APV-006	1618 V_HV_L -Fc-1210 V_HV_L	ADAPTIR(商標)	25.5	94.4
ALG.APV-010	1618 V_HV_L -Fc-1210 V_LV_H	ADAPTIR(商標)	55.9	94.3
ALG.APV-014	1618 V_HV_L -Fc-1210 V_HV_L 、安定化用ジスルフィド有り	ADAPTIR(商標)	18.9	89.2
ALG.APV-018	1618 V_HV_L -Fc-1210 V_LV_H 、安定化用ジスルフィド有り	ADAPTIR(商標)	25.8	89.1

【0268】

また、 V_H ドメインおよび V_L ドメインの順番 (V_H-V_L または V_L-V_H) について、1210型 $scFv$ および1618型 $scFv$ の両方を用いて評価を行ったところ、 V_L-V_H 配向を用いた場合に $scFv-Fc-scFv$ 分子の発現レベルが著しく低下したことから、1618型 $scFv$ の好ましい配向は V_H-V_L であることが確認された。表13に示されるように、1210型 $scFv$ の好ましい配向は V_H-V_L であり、 V_L-V_H フォーマットの1210型 $scFv$ から構成される二重特異性分子と比較して、5T4発現細胞への結合性の向上と、CD137レポーターアッセイにおけるインビトロ活性の向上が示された。

10

20

30

40

50

【表 13】

表 13：1210型 s c F v が V_H-V_L 配向または V_L-V_H 配向のいずれかである場合の、細胞結合性 (EC_{50}) および CD137 レポーターアッセイにおけるインビトロ活性の比較

コンストラクト	コンストラクトの特徴	ヒト 5T4 発現細胞に対する親和性、 EC_{50} (nM)、フローサイトメトリー測定	CD137 レポーターアッセイ EC_{50} (nM)
ALG.APV-006	1618 V_HV_L -Fc-1210 V_HV_L	15.7	0.23
ALG.APV-010	1618 V_HV_L -Fc-1210 V_LV_H	50.9	2.60

【0269】

1618型 s c F v および 1210型 s c F v の、 V_H ドメインと V_L ドメインとの間のリンカーの長さについても、評価も行った。 V_H と V_L とを接続するリンカー長の変化は、Gly4Ser リンカーを 4 回リピートさせた場合も 3 回リピートさせた場合も、活性や安定性に有意差を生じていないように思われたため（データ未記載）、特に記載がない限り、通常は 4 回リピートを採用した。

【0270】

実施例 2：1618型の抗 CD137 s c F v および抗 5T4 s c F v の結合ドメインの最適化

初期特性評価を終えて、ADAPTIR（商標）型二重特異性分子（ALG.APV-006）は、1）各 s c F v の結合ドメインのそれぞれの標的への結合親和性；2）生物物理学的な安定性；および 3）インビトロ活性の増加を好ましくも示した。これらのパラメーターの向上は、商品原価の改善と、製造の容易さと、臨床における投薬量の減少に繋がると期待される。結合ドメインの最適化のために、誤りがちな PCR 法を用いて、1618型 s c F v および 1210型 s c F v の両方の、ランダム変異誘発ファージライブラリーを作製した。簡潔に説明すると、市販の変異誘発キット（GeneMorph II Random Mutagenesis Kit、アジレント・テクノロジー社）を製造業者のプロトコルに従って用いて、各 s c F v を誤りがちな PCR 反応における鑄型として用いた。その e p PCR 産物を消化し、ファージミド s c F v ベクターにライゲーションし、大腸菌 SS320/M13K07 コンピテント細胞に形質転換して、ファージライブラリーを作製した。バイオチン化された、4-1BB または 5T4 の細胞外ドメイン（ECD）を抗原として用いて（それぞれ、1618型または 1210型の結合ドメインの場合）、各ライブラリーに対し 5 回のパニングを行った。抗原濃度を減少させ、洗浄時間を延長することにより、1 回毎に、パニングのストリンジェンシーを増加させていった。最終回のパニングの後、ファージアウトプットを播種し、作製された ADAPTIR（商標）発現ベクターへの s c F v プールの大量クローニング用に準備した。およそ 400 個のコロニーを個別にピックし、ファージミドを単離および配列決定し、精製した DNA をハイスループット小規模 293-過性トランスフェクション（約 0.6 mL の培養液量）に用いた。5 日目の清澄上清を、フローサイトメトリーおよび SPR により、結合性について測定した。その後、最も成績が良かったバリエーションを、細胞結合性、インビトロ活性、および種々の安定性実験を含む一連の試験へと進めた。これらの二重特異性 ADAPTIR（商標）バリエーションは、1210型 s c F v または 1618型 s c F v のいずれかに変化を有し、他方の s c F v は未改変の親配列を維持するように、作製された。これにより、データの解釈が単純化され、これらの単一の変化の結合性、活性、および安定性に対する影響の評価が可能となった。安定性、親和性、または生理活性に対する改善に基づいて、有益な点変異を特定した。次に、これらを組み合わせて、追加の一連の ADAPTIR DNA コンストラクトを作製した。これらのコンストラクトでは、1210型 s c F v および／または 1618型 s c F v に複数の変化が組み入れられていた。各コンストラクトを、250 mL の培養液量の一過性トランスフェクションを介して HEK-293 細胞に発現させ、ProA 工程および SEC 工程を用いて精製した。最終的なタンパク質純度を分析用 SEC で確認し、製造業者の使用説明書（instruct）に従って Endosafe P T S 装置を用いてエンドトキシンレベルを測定し、これらのインビトロ活性測定の結果が、エンドトキシンの存在と交絡しないことを確かめた。得られたタンパク質を、SEC 精

製法の一部としてPBSに緩衝液交換し、1mg/mLに濃縮し、滅菌濾過し、必要となるまで4℃で保存した。理論吸光係数を用いて、280nmの吸光度からタンパク質濃度を求めた。

【0271】

実施例3：ファージ由来最適化バリエーションの評価

ファージパニングの試みの一環として、親ALG・APV-006コンストラクトと比較した場合の、1210型scFvおよび1618型scFvに対する数種類の有益なアミノ酸変化が特定された。タンパク質コロイド安定性の1つの尺度として、硫酸アンモニウムを最終濃度約1Mまで添加した場合に溶液から沈殿するタンパク質量の検査がある。これらの条件下では、親コンストラクトALG・APV-006は、溶液中のタンパク質の89%近くを失った(表14)。比較すると、ALG・APV-099、ALG・APV-127、ALG・APV-148、およびALG・APV-150によって示された変化は全て、これらの条件下でタンパク質損失の減少を示しており、このことは、これらのコンストラクトでなされた個々のアミノ酸変化が、ADAPTIR(商標)型二重特異性分子のコロイド安定性を向上させたことを示唆している。タンパク質安定性の別の尺度として、タンパク質試料に剪断力を加えることの影響を調べ、二重特異性分子の沈殿または可溶性凝集形態の形成による損失についてその試料を検査することが挙げられる。タンパク質溶液を96ウェルプレートに添加し、2,000RPMで2時間振盪する剪断アッセイで評価した場合、ALG・APV-127変異体はタンパク質損失量を顕著に減少させたが、一方、その他のバリエーションは、最小限の影響しか示していないか、または損失がわずかに悪化している(表14)。別の尺度である熱安定性は、示差走査熱量測定法(DSC)または示差走査型蛍光定量法法(DSF)を用いて、融解曲線の間接点温度(別名T_m)を求めることにより、決定することができる。1618型バリエーションおよび1210型バリエーションのT_mを求めたところ、ALG・APV-127バリエーションおよびALG・APV-150バリエーションが、ALG・APV-006親配列と比較して、1618型scFvのT_mを3~4℃上昇させたことが分かった(表14)。T_m値の上昇は、そのタンパク質が熱によるアンフォールディング/変性に対してより抵抗性となることを意味しているため、概して折り畳みタンパク質の安定性の向上と見なすことができる。ALG・APV-148は、ALG・APV-006に用いられた親1210型配列と比較してT_mが3℃近く上昇したことから、1210型scFvの熱安定性を増加させた。

【0272】

変異の組み合わせが、ADAPTIR(商標)型二重特異性コンストラクトの生物物理学的安定性に相加的な利点をもたらすかどうかを確認するために、ALG・APV-099、ALG・APV-127、ALG・APV-148、およびALG・APV-150の変異の様々な組み合わせを評価した。これらは、個々の点変異と同じ方法を用いて発現および精製を行い、同じアッセイで評価を行った。表14の結果は、ALG・APV-178およびALG・APV-179に含まれる変異の組み合わせが、代表例として、個々の変化から得られるものにおよそ相当するかそれよりも良好な、安定性の増加をもたらしたことを示している。

【表 1 4】

表 1 4：未最適化型および最適化型の ADAPTIR (商標) 型二重特異性コンストラクトの生物物理学的評価データ

コンストラクト	改変型ドメイン	1M 硫酸アンモニウム中の溶解性 %タンパク質損失	ずり応力 %タンパク質損失	T _m (°C) 1618型scFv	T _m (°C) 1210型scFv
ALG.APV-006	親配列 of 1210 and 1618	89	64	56.1	70.5
ALG.APV-099	1210	67	80	57	70.5
ALG.APV-127	1618	55	32	60.4	71.0
ALG.APV-148	1210	24	76	56.9	73.0
ALG.APV-150	1618	56	71	58.9	70.8
ALG.APV-178	1210および1618	18.7	24.5	61.7	72.3
ALG.APV-179	1210および1618	28.9	26.5	61.7	72.3

【0 2 7 3】

安定性評価の実施に加えて、ALG. APV-006 およびファージ由来バリエーションの結合親和性を、ヒト 5 T 4 およびヒト CD 1 3 7 の組換え細胞外ドメインを用いて、B i a c o r e T-200 を用いた表面プラズモン共鳴 (SPR) により、測定した。ALG. APV-127 および ALG. APV-150 の改変は、CD 1 3 7 に対する結合親和性を顕著により堅固なものにした (表 1 5)。同様に、ALG. APV-099 が、ALG. APV-006 よりも顕著により堅固な結合を示すことが確認された (それぞれ、13 nM と 149 nM)。

【表 1 5】

表 1 5：未最適化型および最適化型の ADAPTIR (商標) 型二重特異性コンストラクトの結合性評価および活性評価のまとめ

コンストラクト	改変型ドメイン	SPRによるヒト CD137に対する親和性 KD(nM)	SPRによるヒト 5T4に対する親和性 KD(nM)	インビトロ活性 EC ₅₀ (nM)
ALG.APV-006	親配列s	128	149	0.23
ALG.APV-099	1210	N/A	13	0.09
ALG.APV-127	1618	58	N/A	0.03
ALG.APV-148	1210	N/A	198	0.05
ALG.APV-150	1618	97	N/A	0.03

【0 2 7 4】

ALG. APV-099、ALG. APV-127、ALG. APV-148、および ALG. APV-150 バリエーションの、細胞表面上に発現された CD 1 3 7 および 5 T 4 に対する結合性を、ALG. APV-006 の結合性と比較した。これらの変異のいくつかは可溶性の CD 1 3 7 または 5 T 4 に対し親和性の向上を示したが、細胞表面上の結合性実験においては特記すべき差異は確認されなかった (データ未記載)。CD 1 3 7 の標的依存活性化の誘導における、ファージディスプレイ由来バリエーションの有効性を比較するため、CD 1 3 7 レポーターアッセイでバリエーションを比較した。

【0 2 7 5】

CD 1 3 7 レポーターアッセイ：

NF-κB プロモーターの制御下にあるルシフェラーゼレポーター遺伝子を保有する Jurkat / CD 1 3 7 トランスフェクタント (プロメガ社) を、製造業者のプロトコルに従って培養した。NF-κB レポーター発現 Jurkat 細胞を、ヒト 5 T 4 をトランスフェクションされた CHO-K1 細胞と共に、30,000 個の標的細胞に対しておよそ 15,000 個のレポーター細胞で、96 ウェルプレート内で培養した。最終濃度が 10 nM ~ 0.002 nM の範囲をとる各濃度の二重特異性分子を加えた。細胞を、1% ウシ胎児血清、ビルビン酸ナトリウム、抗生物質、および可欠アミノ酸を添加した、総体積

100 μ LのRPMI 1640培地中で培養した。プレートを37℃、5%CO₂の加湿恒温器内で5～6時間インキュベートした。100 μ LのBio-Glowバッファー（プロメガ社）を各ウェルに添加し、5～10分間インキュベートした後、蛍光を測定した。MicroBeta² 2450 Microplate Counter（パーキンエルマー社）で発光を測定した。GraphPad Prism 6（登録商標）グラフ描画および統計ソフトウェアにおいて、EC₅₀値を求めるための非線形回帰分析を実施した。【0276】

図1は、全てのコンストラクトが5T4（+）細胞の存在下で作動薬的な働きを示したことを示しているが；5T4（+）細胞の非存在下ではレポーター活性は認められなかった（図示せず）。ALG-APV-099コンストラクト、ALG-APV-127コンストラクト、ALG-APV-148コンストラクト、およびALG-APV-150コンストラクトは、元のALG-APV-006コンストラクトよりも良好な作動薬的な働き（より低いEC₅₀値）を示した。曲線上の全ての点は2連ウェルの平均を表す。Morrisonフォーマット分子のALG-APV-004は比較用に含まれた。Y軸は、最大蛍光のパーセントとして表される、相対蛍光単位（RLU）の値を示す。

【0277】

単一点突然変異により向上が達成されることが、ALG-APV-099、ALG-APV-127、ALG-APV-148、およびALG-APV-150によって示されたため、個々の特性が同一タンパク質内に含まれた場合に相加的な利点を示すかどうかを確認するために、これらを様々に組み合わせた。これらのユニークな変異の評価を、ALG-APV-178、ALG-APV-179、ALG-APV-187、ALG-APV-191、ALG-APV-196、ALG-APV-198、およびALG-APV-199などの、特性が顕著に改善された1618型scFvバリエーションおよび1210型scFvバリエーションを派生させる組み合わせにおいて、実施した。ALG-APV-191コンストラクト、ALG-APV-196コンストラクト、ALG-APV-198コンストラクト、およびALG-APV-199コンストラクトを作製するために、これらの単一点突然変異を、PCT国際出願番号PCT/EP2017/059656の実施例22および実施例23に記載されるLO1変異、LO2変異、およびLO11変異とさらに組み合わせた。さらに、不安定性の要因になり得る領域を特定するため、1618型scFvおよび1210型scFvの各領域を解析後、標的化されたファージライブラリーを作製した。しかし、これらのライブラリーをパニングしても、特性が向上されたscFvは得られなかった（データ未記載）。

【0278】

実施例4：ジスルフィド結合の安定化の評価

1618型scFvおよび1210型scFvの両方のV_HドメインおよびV_Lドメインに、追加のシステイン残基を組み入れる点変異を行った。これらの二重特異性分子が発現されたとき、これらのシステインが反応してジスルフィド結合を形成し、scFvの安定性を増加させ、これらの製品の製造および貯蔵を改善する有益な特性を与える働きをする可能性がある。1210型scFvに安定化用のジスルフィドを有する最適化二重特異性分子を、4℃もしくは25℃で1週間保存するか、または-80℃～室温の凍結融解サイクルを3回行った場合に、当該ジスルフィドを有さない二重特異性分子よりも良好な純度を維持するか、を示す実験を行った。代表的なデータを表16に示す。安定化用ジスルフィド結合を1618型scFvに追加した場合の評価も行った。このジスルフィドは安定性の恩恵を与えるように思われたが、Biacoreによる結合性データからは、非定型的な結合速度論をもたらす不均一性が試料中に存在することが示された（データ未記載）。

10

20

30

40

50

【表 1 6】

表 1 6 : 1 2 1 0 型 s c F v に安定化用ジスルフィド結合を含有する二重特異性分子における保存安定性および凍結融解安定性の改善

コンストラクト	1210型scFv内の安定化用ジスルフィドの有無	4℃で7日目の%純度の減少	25℃で7日目の%純度の減少	−80℃から室温の凍結融解サイクルを3回行った後の%純度の変化
ALG.APV-178	無	2.4	1.9	4
ALG.APV-179	無	1.5	1.7	4
ALG.APV-187	有	0.1	0.1	1
ALG.APV-191	有	0.0	0.0	2
ALG.APV-196	有	0.0	0.1	2
ALG.APV-198	有	0.1	0.1	2
ALG.APV-199	有	0.0	0.1	1

10

【0 2 7 9】

その後 4 0℃で実施された評価においても、1 2 1 0 型 s c F v に安定化用ジスルフィド結合を含ませることによる二重特異性分子の安定性の改善は明らかであった。2 種類のコンストラクト、A L G . A P V − 2 0 9 および A L G . A P V − 2 1 0 は、A L G . A P V − 2 1 0 の 1 2 1 0 型 s c F v に安定化用ジスルフィドが追加されていることだけ異なる。この高温で 1 週間経過後、A L G . A P V − 2 1 0 が形成した凝集物は著しく少なかった（表 1 7）。

20

【表 1 7】

表 1 7 : 1 2 1 0 型 s c F v に安定化用ジスルフィド結合を有する二重特異性分子の 4 0℃安定性改善に関するデータ

コンストラクト	1210型scFv内の安定化用ジスルフィドの有無	40℃で7日目の%純度の減少
ALG.APV-209	無	2.6
ALG.APV-210	有	0.2

30

【0 2 8 0】

1 2 1 0 にジスルフィド結合を含ませることは保存安定性に大きな恩恵を与えたが、評価が行われたもう一方の安定性パラメーターについては、2 つのコンストラクトの間に有意差が認められなかった（表 1 8）。親二重特異性分子 A L G − 0 0 6 と比較した場合、両方のコンストラクトが、これらのアッセイで顕著により良好な成績を示した（表 1 4）。

40

【表 18】

表 18 : ALG. APV-209 および ALG. APV-210 の安定性比較データ

コンストラクト	1210型scFv内の安定化用ジスルフィドの有無	改変型ドメイン	1M硫酸アンモニウム中の溶解性、%タンパク質損失	ずり応力、%タンパク質損失	T _m (°C) 1618型scFv	T _m (°C) 1210型scFv
ALG.APV-209	無	1210および1618	16.2	22.1	61.2	72.7
ALG.APV-210	有	1210および1618	13.1	23.1	61.5	73.2

10

【0281】

実施例 5 : 二重特異性 s c F v 2 F c タンパク質のヒト 5 T 4 および ヒト C D 1 3 7 に対する結合親和性の評価

方法

組換え型のヒト 5 T 4 および ヒト C D 1 3 7 の細胞外ドメイン (E C D) の発現および精製 :

標準的な分子生物学手法を用い、5 T 4 タンパク質および C D 1 3 7 タンパク質の完全長配列をコードするベクターから開始して、ヒト 5 T 4 および ヒト C D 1 3 7 の細胞外領域を増幅するようにヌクレオチドプライマーを設計した。未変性タンパク質において膜に進入すると予測される位置の、E C D の C 末端に、さらなるペプチド配列を付加した。このペプチドには、アフィニティ精製の目的に利用できる認識配列を含ませた。この発現ベクターの、H E K - 2 9 3 細胞への一過性トランスフェクションを実施した。固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (I M A C) および分子ふるいクロマトグラフィーを用いて、組換え E C D を培養上清から精製した。分析用 S E C でタンパク質純度を確認した。

20

【0282】

組換え型の C D 1 3 7 および 5 T 4 の外部ドメインに対する二重特異性タンパク質の表面プラズモン共鳴法 (S P R) 親和性解析 :

30

組換え型単量体 5 T 4 外部ドメイン (E C D) および組換え型単量体 C D 1 3 7 外部ドメインに対しての、二重特異性抗 5 T 4 × 抗 C D 1 3 7 タンパク質の S P R 結合親和性試験を、25°C、H B S - E P + 緩衝液中、B i a c o r e T 2 0 0 システム上で実施した。10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5) 中 20 μg/mL のヤギ抗ヒト I g G F (a b ') 2 フラグメント (ジャクソン・イムノリサーチ社 (Jackson ImmunoResearch)) を、2000 レスポンスユニット (response unit) (R U) の密度で、C M 5 研究グレードセンサーチップ (G E 社) のフローセル上に、標準的なアミン結合化学作用により、固定化した。H B S - E P + 緩衝液中 200 nM の各二重特異性バリエーションの捕捉を、抗ヒト I g G が固定化された前記フローセル内で、50 μL/分の流速で 60 秒間行って、約 500 R U の反応を達成させ、1つのフローセル表面はリファレンスとして未処理のままとした。30 秒間の安定化期間の後、4つの異なる濃度の各 E C D (0、20、60、および 180 nM) を、50 μL/分で、120 秒間注入した後に 240 秒間の解離期間を置くか (5 T 4 の場合)、または、90 秒間注入した後に 180 秒間の解離期間を置いた (4-1 B B の場合)。再生は、10 mM グリシン (pH 1.5) を 50 μL/分の流速で 30 秒間二重注入した後、H B S - E P + 緩衝液で 1 分間安定化させることにより、達成した。

40

【0283】

カイネティクス S P R 測定から得られたセンサーグラムを、二重減算法 (double subtraction method) により解析した。リファレンスフローセルから得られたシグナルを、リ

50

ガンドが固定または捕捉されたフローセルから得られたアナライト結合反応から、減算した。次に、複数回の注入から緩衝液リファレンス反応の平均を取った。次に、この平均した緩衝液リファレンス反応を、アナライト結合反応から減算し、この二重リファレンスを行ったデータを、Biacore T200 Evaluationソフトウェア（2.0、GE社）で解析し、データのグローバルフィッティングを行って、カインेटクスパラメーターを導いた。センサーグラムは全て、シンプルな1対1結合モデルを用いてフィッティングを行った。

【0284】

結果

表19は、CD137および5T4に結合するADAPTIR（商標）型二重特異性分子の、SPRによって測定された結合パラメーターを示している。なお、二重特異性分子をチップ上に捕捉させ、組換え型単量体のCD137または5T4のECDを注入する、この方式での親和性測定の実施は、アビディティー作用と交絡しない真の親和性の値が得られるはずである。表19が示す通り、ランダム化ファージライブラリーを慎重にスクリーニングすることによって、抗CD137 s c F vおよび／または抗5T4 s c F vの結合親和性の著しい向上をもたらした結合ドメインバリエーションを単離することができた。非最適化親コンストラクトのALG. APV-006と比較して、最適化ADAPTIR（商標）型二重特異性分子であるALG. APV-178、ALG. APV-179、ALG. APV-187、ALG. APV-209、およびALG. APV-210を用いた場合に、ヒトCD137 KD値における大幅な減少が達成された。同様に、ALG. APV-179、ALG. APV-187、ALG. APV-209、およびALG. APV-210が、非最適化ALG. APV-006と比較して、ヒト5T4に対する親和性値の向上を示した。

【表19】

表19：二重特異性分子の組換えヒトCD137または組換えヒト5T4に対する結合における、結合親和性（ K_D ）、解離定数、および結合定数

コンストラクト	SPRによるヒトCD137に対する親和性			SPRによるヒト5T4に対する親和性		
	KD(nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
ALG.APV-006	210	2.8E+05	5.9E-02	109	2.4E+04	2.6E-03
ALG.APV-178	70	3.9E+05	2.7E-02	106	2.3E+04	2.5E-03
ALG.APV-179	71	3.9E+05	2.8E-02	29	2.2E+04	6.2E-04
ALG.APV-187	73	3.7E+05	2.7E-02	35	2.1E+04	7.2E-04
ALG.APV-209	59	5.6E+05	3.3E-02	66	1.4E+04	9.4E-04
ALG.APV-210	59	5.5E+05	3.3E-02	79	1.5E+04	1.2E-03

【0285】

実施例6：ヒト5T4およびヒトCD137に対する二重特異性 s c F v - F c - s c F v タンパク質の熱安定性の評価

示差走査熱量測定法（DSC）および示差走査型蛍光定量法（DSF）は、組換えタンパク質の構造的安定性を測定、評価するために通例使用される手段である。タンパク質試料の温度を上昇させるために必要なエネルギーを測定することにより、個々のタンパク質ドメインの融解温度中心点（ T_m ）を求めることができる。一般的な理解では、 T_m 値が高いタンパク質ドメインほど、より安定と見なされる。一連の最適化二重特異性ADAPTIR（商標）型二重特異性タンパク質（ALG. APV-178、ALG. APV-179、およびALG. APV-187）を用いてDSF解析を実施し、非最適化ADAPTIR（商標）型二重特異性分子バージョン（ALG. APV-006）と比較した（表20）。上述のランダム変異誘発ファージディスプレイ法により特定された有益な変異を組み込んだ後、1618型抗CD137および1210型抗5T4の T_m に著しい上昇が認められた。

10

20

30

40

50

【表 20】

表 20：最適化 ADAPTIR（商標）型二重特異性分子および非最適化コンストラクトの、融解温度中心点（T_m）の比較

最適化の有無	コンストラクト	T _m 、抗CD137 scFv、℃	T _m 、抗5T4 scFv、℃
なし	ALG.APV-006	56.5	70.2
あり	ALG.APV-178	60.7	73.0
あり	ALG.APV-179	61.1	73.0
あり	ALG.APV-187	61.1	73.5

10

【0286】

実施例 7：二重特異性 scFv-Fc-scFv タンパク質分子のヒトおよび非ヒト霊長類の CD137（+）細胞株に対する結合性

細胞表面上の CD137 に対する結合性が可変ドメインの scFv 変換後にも変異導入後にも失われないことを確認するため、フローサイトメトリーを用いて、構築された二重特異性 CD137×5T4 結合 ADAPTIR（商標）型分子のヒトまたはカニクイザル（*cynomolgus macaque*）の CD137 を発現する細胞株に対する結合性を定量化した。

【0287】

CD137 を発現する CHO-K1 細胞株に対する結合性試験を、標準的なフローサイトメトリーベースの染色法により実施した。CHO-K1 細胞（アリゲーター社（Alligator）製）に、ヒト CD137 またはカニクイザル（*cynomolgus macaque*）CD137 をトランスフェクションした。通例の実験では、96 ウェルプレート内で、1 ウェル当たりおよそ 100,000 個の細胞を、2% BSA および 2mM EDTA を含有する 50 μL の生理食塩水緩衝液中、100 nM～0.05 nM の一連の結合性分子により、氷上で 30 分間標識した後、洗浄し、PE 標識二次抗体であるヤギ抗ヒト IgG Fcγ（ジャクソン研究所）と共に氷上で 20 分間インキュベートした。結合した分子からのシグナルを LSRII（商標）または Symphony A3 フローサイトメーター（BD バイオサイエンス社）を用いて検出し、FlowJo フローサイトメトリー解析ソフトウェアで解析した。ダブレット細胞の除去後、生細胞上に結合した分子の蛍光強度中央値（MFI—median）を求めた。GraphPad Prism 6（登録商標）グラフ描画および統計ソフトウェアにおいて、EC₅₀ 値を求めるための非線形回帰分析を実施した。

20

30

【0288】

図 2 は、7 種類の ADAPTIR（商標）型分子（ALG.APV-006、ALG.APV-178、ALG.APV-179、ALG.APV-187、ALG.APV-191、ALG.APV-196、および ALG.APV-198）の、ヒト CD137 発現 CHO-K1 細胞株に対する結合曲線を示している。全ての分子が同様の結合レベル（EC₅₀ 値）および飽和レベルを示した。図 3 は、同じ 7 種類のコンストラクトのカニクイザル CD137 発現 CHO-K1 細胞株に対する結合曲線を示している。7 種類のコンストラクト全てに、カニクイザル標的に対する同様の結合レベルおよび飽和レベルが確認された。図 12 は、6 種類の ADAPTIR（商標）型分子（ALG.APV-178、ALG.APV-179、ALG.APV-187、ALG.APV-208、ALG.APV-209、および ALG.APV-210）および Morrison 型対照 ALG.APV-004 の、ヒト CD137 発現 CHO-K1 細胞株に対する結合曲線を示している。全ての分子が、0.3～0.6 nM の範囲の同様の EC₅₀ 値、および同様の飽和レベルで結合した。

40

【0289】

実施例 8：二重特異性 scFv-Fc-scFv タンパク質のヒトおよび非ヒト霊長類の 5T4（+）細胞株に対する結合性

50

s c F vドメインに変化を導入した後のがん細胞表面上の5 T 4の結合性を比較するため、フローサイトメトリーを用いて、構築された二重特異性C D 1 3 7 × 5 T 4 結合A D A P T I R (商標) 型分子の5 T 4を発現する細胞株に対する結合性を定量化した。

【0290】

二重特異性C D 1 3 7 × 5 T 4 分子の5 T 4 (+) 細胞株に対する結合性：

二重特異性A D A P T I R (商標) 型分子 (A L G . A P V - 1 7 8、A L G . A P V - 1 7 9、A L G . A P V - 1 8 7、A L G . A P V - 1 9 6、A L G . A P V - 2 0 8、A L G . A P V - 2 0 9、およびA L G . A P V - 2 1 0) の結合特性を比較した。標準的なフローサイトメトリーベースの染色法によって、5 T 4を発現する2種類の細胞株、すなわち、ヒト5 T 4またはカニクイザル (cynomolgus macaque) 5 T 4を導入されたC H O - K 1細胞 (アリゲーター社から入手)、および (ヒト) 5 T 4を発現するS K O V - 3ヒト卵巣腺癌細胞に対し、結合試験を実施した。標識および洗浄は全て、U字底96ウェルプレート内の、0.1% B S Aおよび2 mM E D T Aを含有する生理食塩水緩衝液中で行った。細胞をおよそ100,000細胞/ウェルで播種し、50 μ L体積/ウェルの100 nM ~ 0.05 nMの濃度範囲の被験分子と共に、氷上で30分間インキュベートした。細胞を3回洗浄した後、蛍光標識ポリクローナル二次抗体のF (a b ')²ヤギ抗ヒトI g G (ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ社 (Jackson ImmunoResearch Laboratories)) と共にさらに30分間氷上でインキュベートした。その後、細胞を2回洗浄し、B D L S R I IまたはS y m p h o n y A 3フローサイトメーターで試料を取得した。F l o w J oソフトウェアを用いて試料ファイルを解析した。すなわち、生細胞に対するゲーティング (前方散乱ゲーティング対側方散乱ゲーティング) の後、各ウェル内の生細胞集団の平均蛍光強度 (M F I - m e a n) または蛍光強度中央値 (M F I - m e d i a n) を算出した。G r a p h P a d P r i s m 6 (登録商標) グラフ描画および統計ソフトウェアにおいて、E C 5 0値を求めるための非線形回帰分析を実施した。

【0291】

図4は、7種類のA D A P T I R (商標) 型分子 (A L G . A P V - 0 0 6、A L G . A P V - 1 7 8、A L G . A P V - 1 7 9、A L G . A P V - 1 8 7、A L G . A P V - 1 9 1、A L G . A P V - 1 9 6、およびA L G . A P V - 1 9 8) のヒト5 T 4発現C H O - K 1細胞株に対する結合曲線を示している。コンストラクトA L G . A P V - 0 0 6は10 nMより大きいE C 5 0値で結合したが、残りのA D A P T I R (商標) 型コンストラクト (A L G . A P V - 1 7 8、A L G . A P V - 1 7 9、A L G . A P V - 1 8 7、A L G . A P V - 1 9 1、A L G . A P V - 1 9 6、およびA L G . A P V - 1 9 8) は3 ~ 10 nMの範囲のE C 5 0値で結合した。結合アッセイをS K O V - 3細胞に対し実施した場合、コンストラクト間のE C 5 0値の差異はより明白となった。S K O V - 3細胞は、ヒト5 T 4発現C H O - K 1トランスフェクタントのおよそ1/10倍の低レベルのヒト5 T 4を発現する (図5)。図6は、A L G . A P V - 0 0 6コンストラクト、A L G . A P V - 1 7 8コンストラクト、A L G . A P V - 1 7 9コンストラクト、A L G . A P V - 1 8 7コンストラクト、A L G . A P V - 1 9 6コンストラクト、およびA L G . A P V - 1 9 8コンストラクトの、S K O V - 3細胞に対する結合曲線を示している。A L G . A P V - 0 0 6コンストラクト、A L G . A P V - 0 7 8コンストラクト、A L G . A P V - 1 7 9コンストラクト、およびA L G . A P V - 1 8 7コンストラクトは、A L G . A P V - 1 9 6コンストラクトおよびA L G . A P V - 1 9 8コンストラクトよりも、わずかに低い親和性 (高いE C 5 0値) および高い最大結合レベルで結合した。図7は、A L G . A P V - 0 0 6、A L G . A P V - 1 7 8、A L G . A P V - 1 7 9、A L G . A P V - 1 8 7、A L G . A P V - 1 9 1、A L G . A P V - 1 9 6、およびA L G . A P V - 1 9 8の、カニクイザル5 T 4トランスフェクトC H O - K 1に対する結合曲線を示している。ヒト5 T 4 (+) 細胞に対しての結合プロファイルと同様に、A L G . A P V - 0 0 6コンストラクト、A L G . A P V - 1 7 8コンストラクト、A L G . A P V - 1 7 9コンストラクト、A L G . A P V - 1 8 7コンストラクト、A L G .

APV-191コンストラクト、ALG-APV-196コンストラクト、およびALG-APV-198コンストラクトは、ALG-APV-196コンストラクトおよびALG-APV-198コンストラクトよりも低い親和性および高い最大結合レベルを示した。
【0292】

図13は、6種類のADAPTIR（商標）型分子（ALG-APV-178、ALG-APV-179、ALG-APV-187、ALG-APV-208、ALG-APV-209、およびALG-APV-210）およびMorrison型対照ALG-APV-004の、ヒト5T4を発現するマウスCT26細胞（ATCC）に対する結合曲線を示している。これらの細胞は、SKOV-3細胞上で認められるレベルと同等のレベルのヒト5T4を発現する（図5）。全てのコンストラクトが1~3 nMの範囲のEC₅₀値で結合した。ALG-APV-179コンストラクト、ALG-APV-187コンストラクト、ALG-APV-209コンストラクト、およびALG-APV-210コンストラクトは、ALG-APV-178およびALG-APV-208よりも高い最大結合レベルを示した。Morrison型対照分子であるALG-APV-004は、最も低い最大結合レベルを示した。図14は、ALG-APV-004、ALG-APV-178、ALG-APV-179、ALG-APV-187、ALG-APV-208、ALG-APV-209、およびALG-APV-210の、カニクイザル5T4トランスフェクトCHO-K1に対する結合曲線を示している。全ての分子が、6~10 nMの範囲の同様のEC₅₀値、および同様の飽和レベルで結合した。図15は、ALG-APV-004、ALG-APV-178、ALG-APV-179、ALG-APV-187、ALG-APV-208、ALG-APV-209、およびALG-APV-210の、CD137も5T4もどちらも発現しないヒト細胞株（MOLM13細胞、ATCC）に対する結合曲線を示している。いかなる濃度のいずれの分子も結合性を示さなかった。

【0293】

実施例9：5T4-CD137二重特異性抗体の5T4発現細胞株に対する結合性

様々な受容体密度で細胞上に発現されたヒト5T4に対するALG-APV-210の結合性を測定するための実験を行った。ALG-APV-210の標的結合性について、内在性レベルの5T4を有するヒト癌化細胞株および5T4を産生するようトランスフェクションされた細胞の両方を評価した。

【0294】

材料および方法

ビオチン化：

5T4発現細胞株に結合しているALG-APV-210を検出するために、まず、ALG-APV-210をビオチン化した。このビオチン化タンパク質の品質およびその標的への結合性に対する影響を、ELISAで評価した。

【0295】

5T4発現細胞株のFACS染色およびFACS解析：

FACS染色に先立ち、受容体密度キット（Quantum Simply Cellular、抗ヒトIgG、バングス・ラボラトリーズ社（Bangs Laboratories, Inc.））を用いて、5T4発現レベルについて、全ての細胞株のキャラクタライゼーションを行った。使用した細胞株に関する情報およびそれら各々の5T4発現密度を表21に示す。接着細胞株を供給業者の説明書に従って培養し、トリプシン／EDTAを用いて細胞培養フラスコから回収し、ビルケル計算盤でR10培地中で計数し、FACS用緩衝液（PBS+0.5% BSA、0.05% NaN₃）で4×10⁶細胞/mLの濃度に希釈した。50 μL（0.20×10⁶）の細胞溶液を、96ウェルFACS染色用プレート（ファルコン社、製品番号351190）に添加した。細胞を、50 μLのビオチン化ALG-APV-210（2×最終濃度）と共に4℃で20分間インキュベートした。20 μg/mLから開始して、12段階の1/2希釈で0.010 μg/mLまで漸減させる連続希釈を行った抗体を添加した。FACS用緩衝液で2回洗浄を行った後、細胞を、100 μLの二次抗体（ストレプトアビジン-PE、BD社、製品番号554061、1/500希釈

10

20

30

40

50

）と共に4℃で30分間インキュベートした。FACS用緩衝液を用いた2回の洗浄工程の後、細胞を200μLの細胞固定（BD CellFix 10×、BD社、製品番号340181、MQ H₂Oで希釈）に再懸濁させた。細胞のALG-APV-210結合性を、単一細胞に対するゲーティングにより、フローサイトメトリー（FACSVerse）を用いて解析した。2つの独立した実験のうち1つのMFI値（二次抗体のみを減算）、並びに2つの実験より得られたプールデータの正規化データおよびEC₅₀値を、GraphPad Prism 7の非線形回帰log（アゴニスト）vs. 正規化反応-可変傾斜を用いて求めて、プロットした。

【表21】

表21：5T4発現細胞株および受容体密度／細胞

細胞	がん型	5T4密度／細胞	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間
HCT-116	ヒト結腸癌	62,000	16	15-17
HT-29	ヒト結腸癌	30,000	12	11-14
JAR	ヒト 絨毛癌s	69,000	9	5-17
JEG	ヒト 絨毛癌s	66,000	8	5-12
SKOV-3	ヒト 卵巣がん	60,000	15	12-18
BxPC-3	膵がん	150,000	20	18-22
B16-ヒト5T4	トランスフェクトマウスのメラノーマ	320,000	14	9-19
CHO-ヒト5T4	トランスフェクト	4,100,000	23	18-28
CT26-ヒト5T4 ^{high}	トランスフェクトマウスの結腸癌	1,000,000	20	16-27
CT26-ヒト5T4 ^{int}	トランスフェクトマウスの結腸癌	200,000	12	11-13
CT26-ヒト5T4 ^{low}	トランスフェクトマウスの結腸癌	50,000	11	8-15

【0296】

結果および結論

ELISAを用いて、ビオチン化ALG-APV-210の5T4に対する結合性を測定したところ、非ビオチン化ALG-APV-210のそれと同様であった（データ未記載）。

【0297】

ヒト腫瘍細胞上または5T4を発現するようにトランスフェクションされた細胞上の内在性レベルで細胞上に発現された5T4に対するビオチン化ALG-APV-210の結合性（EC₅₀）を評価した。MFIを用いている図39に示されるように、ALG-APV-210は、内在性レベルの5T4を発現しているヒト腫瘍細胞、およびトランスフェクト細胞株の両方に、用量依存的に結合する。

【0298】

上記の表21は、図40に示される用量反応曲線にプロットされた、2つのプールされた実験からの、正規化MFI値（バックグラウンドを減算）から求めた、5T4陽性ヒト癌化細胞株および5T4トランスフェクト細胞に対するALG-APV-210の結合性（EC₅₀）を示している。平均EC₅₀値は各種5T4陽性細胞株で8～23nMの範囲をとった。結論として、ALG-APV-210は8～23nMの範囲のEC₅₀で5T4発現細胞に結合する。

【0299】

実施例10：レポーターアッセイにおける二重特異性scFv-Fc-scFvタンパク

質の作動薬的な働き

CD137の標的依存活性化の誘導における、種々の二重特異性CD137結合性分子の有効性を比較するため、7種類の異なる二重特異性抗CD137×抗5T4分子を、実施例3に記載した通りのCD137レポーターアッセイで比較した。

【0300】

CD137レポーターアッセイ

NF-κBプロモーターの制御下にあるルシフェラーゼレポーター遺伝子を保有するJurkat/CD137トランスフェクタント（プロメガ社）を、製造業者のプロトコルに従って培養した。NF-κBレポーター発現Jurkat細胞を、ヒト5T4を発現するヒト初代乳管癌細胞HCC1143（ATCC）と共に、30,000個の標的細胞に対しておよそ15,000個のレポーター細胞で、96ウェルプレート内で培養した。最終濃度が10nM～0.002nMの範囲をとる各濃度の二重特異性分子を加えた。細胞の培養は、10%ウシ胎児血清、ピルビン酸ナトリウム、抗生物質、および可欠アミノ酸を添加した、総体積100μLのRPMI1640培地中で行った。プレートを加湿恒温器内、37℃、5%CO₂で5～6時間インキュベートした。100μLのBio-Glowバッファー（プロメガ社）を各ウェルに添加し、5～10分間インキュベートした後、蛍光を測定した。MicroBeta² 2450 Microplate Counter（パーキンエルマー社）で発光を測定した。GraphPad Prism 6（登録商標）グラフ描画および統計ソフトウェアにおいて、EC₅₀値を求めるための非線形回帰分析を実施した。

【0301】

結果

図8では、全てのコンストラクトが5T4（+）細胞の存在下で作動薬的な働きを示しているが；5T4（+）細胞の非存在下ではレポーター活性は認められなかった（データ未記載）。ALG.APV-178コンストラクト、ALG.APV-179コンストラクト、ALG.APV-187コンストラクト、ALG.APV-191コンストラクト、ALG.APV-196コンストラクト、およびALG.APV-198コンストラクトは、最適化されていないADAPTIR（商標）型コンストラクトのALG.APV-006、およびMorrison型対照のALG.APV-004と比べて、より良好な作動薬的な働き（1/6倍以下のより低いEC₅₀値）を示した。曲線上の全ての点は2連ウェルの平均を表す。Y軸は相対蛍光単位（RLU）の値を示す。図16は、5T4（+）細胞（HCC1143）または5T4（-）細胞（MOLM13）の存在下で5時間インキュベートした後の、NF-κBレポーター発現Jurkat細胞における、二重特異性コンストラクトの活性を示している。ALG.APV-178コンストラクト、ALG.APV-179コンストラクト、ALG.APV-187コンストラクト、ALG.APV-208コンストラクト、ALG.APV-209コンストラクト、およびALG.APV-210コンストラクトは、Morrison型対照のALG.APV-004と比べて、より良好な作動薬的な働き（1/10倍のより低いEC₅₀値）を示した。5T4（-）細胞（MOLM13）の存在下ではレポーター活性は確認されなかった。曲線上の全ての点は2連ウェルの平均を表す。Y軸は相対蛍光単位（RLU）の値を示す。

【0302】

実施例11：初代T細胞アッセイにおける二重特異性scFv-Fc-scFvタンパク質の作動薬的な働き

CD137の標的依存活性化の誘導における、種々の抗CD137×抗5T4二重特異性分子の作動薬的な働きを、末梢血単核球（PBMC）の培養物において試験した。抗CD137二重特異性コンストラクトの機能を調べるため、初代PBMCを抗CD3抗体で刺激することにより、休止T細胞上には発現されないCD137の発現を増加させた。TCRおよびCD137による初代T細胞の同時刺激は、T細胞のサイトカインインターフェロンγ（IFN-γ）分泌を増強する。

【0303】

10

20

30

40

50

P B M C の C D 1 3 7 刺激：

標準的なフィコール勾配法を用いて、末梢血単核球（P B M C）をヒト血液から単離した。この単離細胞を生理食塩水緩衝液で洗浄した。P B M Cを、ヒト5 T 4 発現C H O - K 1細胞と共に、3 0 , 0 0 0 個の5 T 4 (+) 細胞に対しおよそ1 2 0 , 0 0 0 個のP B M Cで、9 6 ウェルプレート内で培養した。抗C D 3 抗体O K T 3（イーバイオサイエンス社（eBioscience））を全てのウェルに0 . 1 μ g / m L の濃度で添加した。細胞を、1 % ウシ胎児血清、ピルビン酸ナトリウム、抗生物質、および可欠アミノ酸を添加した、総体積2 0 0 μ L のR P M I 1 6 4 0 培地中で培養した。プレートを3 7 $^{\circ}$ C、5 % C O ₂ の加湿恒温器内で7 2 時間インキュベートした。7 2 時間の時点で、1 0 0 μ L の培地を収集した。M i l l i p l e x（登録商標）キット（ミリポア社）を製造業者の取扱説明書に従って用いて、上清中のI F N - γ レベルを測定した。B i o - P l e x R e a d e r 2 0 0 S y s t e m（バイオラド社）でデータ収集を行った。G r a p h P a d P r i s m 6（登録商標）グラフ描画および統計ソフトウェアにおいて、E C 5 0 値を求めるための非線形回帰分析を実施した。

【0 3 0 4】

図9は、A L G . A P V - 0 0 6、A L G . A P V - 1 7 8、A L G . A P V - 1 7 9、A L G . A P V - 1 8 7、A L G . A P V - 1 9 6、A L G . A P V - 1 9 8、およびM o r r i s o n 型対照A L G . A P V - 0 0 4 によって誘導されたI F N - γ のレベルを示している。全てのコンストラクトが抗C D 3 単独よりも高いレベルのI F N - γ を用量依存的に誘導した。曲線上の全ての点は2 連ウェルの平均を表す。図1 7 は、ヒト5 T 4 発現C H O - K 1細胞の存在下、A L G . A P V - 1 7 8、A L G . A P V - 1 7 9、A L G . A P V - 1 8 7、A L G . A P V - 2 0 8、A L G . A P V - 2 0 9、A L G . A P V - 2 1 0、およびM o r r i s o n 型対照コンストラクトのA L G . A P V - 0 0 4 により、7 2 の時点で初代P B M C 培養物において誘導された、I F N - γ のレベルを示している。全てのコンストラクトが抗C D 3 単独よりも高いレベルのI F N - γ を用量依存的に誘導した。曲線上の全ての点は2 連ウェルの平均を表す。

【0 3 0 5】

また、5 T 4 - F c コンストラクトおよび抗C D 3 抗体をコートしたマイクロタイタープレート内で細胞を培養するC D 8 + T 細胞アッセイで、抗5 T 4 $\times$ 抗C D 1 3 7 二重特異性コンストラクトの機能活性を評価した。

【0 3 0 6】

精製したT細胞の5 T 4 刺激：

P B M Cを、F i c o l l - P a q u e (ρ : 1 . 0 7 7 g / m L)（GEヘルスケア社、製品番号1 7 - 1 4 4 0 - 0 2）を用いる密度勾配遠心により、健常ドナーから得られた白血球濃厚液（leukocyte concentrate）（臨床免疫学および輸血医学（Clinical Immunology and Transfusion Medicine）、ラボラトリメディシン・リージョンスコネ（Labmedicin Region Skane）、ルンド、スウェーデン）から、単離した。C D 8 + T細胞を、C D 8 + T細胞単離キット（ミルテニー社（Miltenyi）、1 3 0 - 0 9 6 - 4 9 5）を用いたネガティブセレクションにより、濃縮した。プレートを、3 μ g / m L の抗C D 3 O K T 3 クローン（アフィメトリクス・イーバイオサイエンス社（Affymetrix eBioscience）、製品番号1 6 - 0 0 3 7 - 8 5）で4 $^{\circ}$ Cで一晩コーティングし、洗浄し、5 μ g / m L の5 T 4 - F cで3 7 $^{\circ}$ Cで2 時間コーティングした。5 T 4 - F c のコーティング後、プレートを洗浄し、1 0 % F C S（熱不活化、ギブコ社、製品番号1 0 2 7 0 - 1 0 6、ロット番号4 1 Q 9 2 4 8 K）および1 0 m M H e p e s（ギブコ社、製品番号1 5 6 3 0 0 5 6）を含有するR P M I（ギブコ社、製品番号6 1 8 7 0 0 1 0）で最低3 0 分間ブロッキングした。二重特異性コンストラクトを、1 0 % F C Sおよび1 0 m M H e p e sを含有するR P M Iで希釈して、プレートに添加し、3 0 分後、C D 8 + T細胞（0 . 0 7 $\times$ 1 0 ⁶ 細胞 / ウェル）を添加した。アッセイプレートを3 7 $^{\circ}$ Cで7 2 時間インキュベートした後、培養上清を回収した。上清中のI F N - γ レベルをE L I S A（B D O p t i E I A、製品番号5 5 5 1 4 2）で測定した。この実験を、合計

3人のドナー用いて2回繰り返した。最初の実験の結果を図11Aに示す。5T4-Fcでコーティングされていないプレート内で細胞および二重特異性コンストラクトが培養された対照試料の結果を、図11Bに示す。

【0307】

図11Aは、5T4存在下における培養上清中のIFN- γ レベルの増加によって示される、Morrisonフォーマット二重特異性コンストラクト (ALG. APV-004) と比較した場合の、ADAPTIR (商標) フォーマット抗5T4 $\times$ 抗CD137二重特異性コンストラクト (ALG. APV-178、ALG. APV-179、ALG. APV-196、およびALG. APV-198) の機能活性の増大を示している。実際には、ADAPTIR (商標) フォーマットコンストラクトは、Morrisonフォーマットコンストラクトによって誘導されたものよりも2~4.5倍高いIFN- γ レベルを誘導した (図11A)。

10

【0308】

実施例12：インビボにおける5T4陽性腫瘍内の二重特異性抗体の抗原依存的局在

5T4および4-1BBを標的とする二重特異性コンストラクトの5T4陽性B16-5T4腫瘍への抗原依存的局在を、野生型C57BL/6マウスにおいて評価した。

【0309】

材料および方法

マウス：

実験には、フランスのジャンヴィエ社 (Janvier) から入手した8週齢雌C57BL/6マウスを用いた。全ての実験は、マルメ/ルンド自治体の倫理委員会の承認の下で実施した。

20

【0310】

二重特異性コンストラクト：

2種類の最適化された、5T4およびCD137を標的とするADAPTIR (商標) フォーマット二重特異性コンストラクト、ALG. APV-209およびALG. APV-210を使用した。Morrisonフォーマットの二重特異性コンストラクトであるALG. APV-004を、陽性対照として用いた。溶剤投与を陰性対照として用いた。

【0311】

細胞：

B16.F10 WT (B16) 細胞をATCCから入手して、推奨に従って培養した。ヒト5T4を発現するB16細胞 (以下、B16-5T4) をPeter Stern教授から入手して、1.2mg/mLのG418セクション用培地下で増殖させた。

30

【0312】

方法：

二重特異性コンストラクトの抗原依存的局在においては、各マウスの後側腹部/背部の両脇に1種類の5T4陰性腫瘍および1種類の5T4陽性腫瘍がそれぞれ移植された、B16メラノーマ双腫瘍モデルを用いた。0日目、対数増殖期にあるこの癌化細胞株を皮下注射した (100 μ L中 1×10^5 個の細胞)。6日目および13日目にコンストラクト (100 μ g) を腹腔内処置し、14日目 (最後の処置の24時間後) にマウスを殺した。

40

【0313】

FACS解析：

フローサイトメトリー解析用の腫瘍を、機械的消化、並びにLiberase TLおよびデオキシリボヌクレアーゼI (ロシュ社) を用いる酵素的消化にかけ、70 μ mストレーナーに通した。得られた単細胞浮遊液をFACS解析用に染色した。簡潔に説明すると、マウスIgGまたはFcのブロックングにより、前記コンストラクトの非特異的結合をブロックした。Fixable Viability Stain 450 (モレキュラープロブス社) を製造業者の取扱説明書に従って用いて、死細胞を除去した。前記2種類のADAPTIR (商標) 型二重特異性コンストラクトまたは前記対照用コンストラク

50

トの腫瘍細胞への結合を、ヤギ抗ヒトFc-PE二次抗体（ジャクソン・イムノリサーチ社）を用いて分析した。あるいは、ビオチン化4-1BB抗原に続いてストレプトアビジン-PE/PerCP-Cy5.5を用いることにより、二重特異性コンストラクトの検出を行った。試料の分析はBD FACSVerseで行い、データ解析にはFlowJoソフトウェアを用いた。統計解析はマンホイットニーのノンパラメトリック両側t検定およびGraphPad prismプログラムを用いて行った。

【0314】

免疫組織化学：

免疫組織化学用の腫瘍を、ドライアイス上のイソプロパノール中で急速凍結した。凍結切片（8mm）を、ウサギ抗ヒト5T4（アブカム社）またはウサギ抗ヒトFc（ジャクソン・イムノリサーチ社）に続いて抗ウサギBrightvision-HRP（イムノロジック社（Immunologic））を用いて5T4発現について染色し、DAPI染色した。免疫組織化学染色の評価は以下の通りに行った；陰性（0）、弱い染色（1+）、中程度の染色（2+）、または強い染色（3+）。

【0315】

結果

ADAPTIR（商標）フォーマットの二重特異性コンストラクト、ALG.APV-209およびALG.APV-210の両方、並びに陽性対照のALG.APV-004が、5T4発現B16腫瘍に局在化した。5T4陰性腫瘍（B16.F10）には局在化しなかった。このことは、フローサイトメトリー（図18Aおよび図18B）および免疫組織化学（図19Aおよび図19B）の両方によって示された。

【0316】

フローサイトメトリーで測定したところ、二重特異性コンストラクト（ALG.APV-209、ALG.APV-210）および陽性対照（ALG.APV-004）の両方が、溶剤陰性対照と比較して、統計的に有意な、抗原陽性腫瘍に対する5T4依存的局在を示した（図18A）。検出用のビオチン化4-1BBを用いた場合にも、5T4発現腫瘍に対する結合を検出することができ（図18B）、これにより、二重特異性分子がインタクトであることが確認された。

【0317】

免疫組織化学により、局在のさらなる証明を行った（図19Aおよび図19B、並びに表22）。これらの二重特異性抗体は5T4陽性腫瘍に強く結合したが（B16-5T4、図19A）、5T4陰性腫瘍には結合しなかった（B16.F10、図19B）。

【表22】

表22：二重特異性コンストラクトおよび溶剤対照のインビボ局在

治療	5T4陰性腫瘍	5T4陽性腫瘍
ALG.APV-209	—	+++
ALG.APV-210	—	+++
ALG.APV-004	—	+++
溶剤	—	—

【0318】

実施例13：ヒトCD8⁺T細胞および5T4-CT26腫瘍細胞を用いたIFN γ 放出アッセイにおける5T4-CD137二重特異性抗体のインビトロ活性

ビーズ上にコーティングされたCD3抗体で刺激したCD8⁺T細胞を様々なレベルの5T4を発現するCT26腫瘍細胞とプレート内で共培養するCD8⁺T細胞アッセイにおいて、5T4-CD137二重特異性抗体ALG.APV-210の機能活性を評価した。

【0319】

10

20

30

40

50

マウス結腸癌細胞株のCT26腫瘍細胞（ATCC（登録商標）CRL-2638）を、ヒト5T4を発現するように予めトランスフェクトしておき、フローサイトメトリーを用いてシングルセルソーティングを行って、高レベルまたは低レベルのヒト5T4を発現する単一細胞クローンを作製した（受容体密度については、表23を参照）。5T4-CT26腫瘍細胞または未トランスフェクトの野生型細胞（野生型CT26）に、UVB Cross linker（アナリティクイエナ社、ランプ：254nm）を用いてUV照射した。プレートの照射後、細胞を培地で1回洗浄し、新しい増殖培地R10（10%熱不活化FBS（ハイクロン社、製品番号SV30160、ロット番号RB35944）および10mM HEPES（ギブコ社、製品番号15630056）を含有するRPMI（ギブコ社、製品番号61870010））に、 4×10^6 細胞/mLの濃度に再懸濁した。50 μ L（ 2×10^5 細胞/ウェル）の、UV照射された、ヒト5T4高発現CT26細胞（CT26-h5T4^{high} cell）、ヒト5T4低発現CT26細胞（CT26-h5T4^{low} cell）、または野生型CT26細胞（CT26 wt cell）を、TC処理アッセイプレート（エッペンドルフ社（Eppendorf）、製品番号0030 730. 119）に播種し、37℃で一晩インキュベートした。

10

【表23】

表23：ヒト5T4をトランスフェクトされシングルセルソーティングされたCT26細胞上の5T4受容体密度

CT26 細胞クローン	5T4受容体密度/細胞
CT26-h5T4 ^{high}	$1 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$
CT26-h5T4 ^{low}	$5 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$
CT26 野生型	0

20

【0320】

CT26細胞に紫外線照射した翌日、ヒトPBMCを、Ficoll-Paque（GEヘルスケア社、製品番号17-1440-02）を用いる密度勾配遠心により、健常ドナーから得られた白血球濃厚液（臨床免疫学および輸血医学（Clinical Immunology and Transfusion Medicine）、ラボラトリメディシン・リージョンスコネ（Labmedicin Region Skane）、ルンド、スウェーデン）から、単離した。CD8+細胞を、CD8+T細胞単離キット（ミルテニー社、130-096-495）を用いたネガティブセレクションにより、濃縮した。

30

【0321】

二重特異性抗体ALG. APV-210をR10培地で連続希釈し、50 μ Lをアッセイプレートの各ウェルに添加し、37℃で30分間インキュベートした後、CD8+T細胞とビーズの比が1：1となるように、50 μ Lの抗CD3ビーズ（ 4×10^8 /mLの抗CD3抗体クローン：OKT-3、アフィメトリクス・イーバイオサイエンス社、製品番号16-0037-85、ビーズ上にコーティング、 2×10^6 /mLに希釈）を添加し、その後、50 μ Lのエフェクター細胞（濃縮CD8+細胞、 2×10^6 /mLまたは 1×10^5 /ウェル）を添加した。アッセイプレートを37℃で72時間インキュベートし、培養上清を回収した。上清中のIFN γ レベルをELISA（BD OptiEIA、製品番号555142）で測定した。GraphPad Prism 7を用いて、非線形回帰log（アゴニスト）vs. 正規化反応（可変傾斜）により、EC50を求めた。培養上清中のIFN γ 産生の2つの最高値の平均を算出することにより、TOP値（最大機能効果）を求めた。合計12人のドナーを含んで、実験は5回行った。

40

【0322】

様々なレベルの5T4を発現するCT26細胞とプレート内で共培養されたヒトCD8T細胞（エフェクター細胞）を用いて、CD137-5T4二重特異性抗体ALG. APV-210の機能効果（5T4への結合を介したCD137の架橋について）を試験した。図20に示されるように、二重特異性CD137-5T4抗体ALG. APV-210

50

は、高レベルの5T4を発現するCT26細胞（CT26-h5T4^{high}）または低レベルの5T4を発現するCT26細胞（CT26-h5T4^{low}）の存在下で、用量依存的に、強力なT細胞活性化を誘導することが、IFN γ 放出により測定された。IFN γ 放出はALG・APV-210の正規化データとして図20に示されており；5つのプールされた実験からの12人のドナーの平均値が示されている。

【0323】

表24は、ヒト5T4発現CT26細胞の存在下でのCD8⁺T細胞アッセイにおける、ALG・APV-210のEC₅₀を示している。5つのプールされた実験からの12人のドナーの、Log（アゴニスト）vs. 正規化反応（可変傾斜）平均値および95%信頼区間が、表24に示されている。図21Aおよび図21Bから分かるように、ALG・APV-210の最大機能効果がCT26細胞上の5T4の発現レベルに依存的であることが、CT26-h5T4^{high}細胞との共培養と比較して、CT26-h5T4^{low}細胞との共培養において、最大IFN γ 放出がわずかにより少ない分泌となったこと（CT26-h5T4^{low}の最大効果はCT26-h5T4^{high}の82%であった）から示された。CT26-wt細胞を用いた場合、5T4誘導性の架橋が起こらないため、T細胞の活性はゼロであるか非常に低い（CT26-h5T4^{high}の最大効果の7%）。最大IFN γ 放出を、図21に、絶対値（ng/mL）として（図21A）、またはCT26-h5T4^{high}に対しての正規化値として（図21B）、表す。5つのプールされた実験からの12人のドナーの平均およびSEM値を示す。

【表24】

表24：ヒト5T4+CT26細胞の存在下におけるALG・APV-210の結合性（EC₅₀）

	ALG.APV-210-h5T4 ^{high}	ALG.APV-210-h5T4 ^{low}
EC ₅₀ (nM)	0.41	0.24
95%信頼区間	0.36~0.46	0.20~0.28

【0324】

実施例14：CD3刺激したヒトおよびカニクイザルの初代CD8⁺T細胞上のCD137に対する5T4-CD137二重特異性抗体の結合性

活性化初代CD8⁺T細胞（CD3刺激PBMCからゲーティング）上に発現したヒトCD137およびカニクイザルCD137に対するALG・APV-210の相対的な結合性を比較するための試験を行った。

【0325】

材料および方法

初代ヒト細胞および初代カニクイザル細胞に結合しているALG・APV-210をFACSで検出するために、まず、ALG・APV-210をビオチン化した。このビオチン化タンパク質の品質をHPLCで評価し、その標的への結合性に対する影響をELISAで評価した。ALG・APV-210と同じフレームワーク（生殖細胞系列のCDR）を有するADAPTIRフォーマットの抗体であるANC017を、陰性対照として用い、またビオチン化も行った。

【0326】

ヒトPBMCの単離および刺激：

ヒトPBMCを、Ficoll-Paque（GEヘルスケア社、製品番号17-1440-02）を用いる密度勾配遠心により、3人の健康ドナーから得られた白血球濃厚液（臨床免疫学および輸血医学（Clinical Immunology and Transfusion Medicine）、ラボラトリメディシン・リージョンスコネ（Labmedicin Region Skane）、ルンド、スウェーデン）から、単離した。非組織処理（non-tissue treated）96ウェルプレート（ヌンク社、製品番号268200）を、10 μ g/mLの抗CD3、OKT3クローン（アフィメトリクス・イーバイオサイエンス社、製品番号16-0037-85）で、4

℃で一晩プレコーティングした。翌日、プレートをPBSで洗浄し、R10（10%熱不活化FBS（ハイクローン社、製品番号SV30160、ロット番号RB35944）および10mMのHepes（ギブコ社、製品番号15630056）を含有するRPMI（ギブコ社、製品番号61870010））で希釈したヒトPBMCを、 0.2×10^6 細胞／ウェルの濃度に加え、CD3刺激有りまたは無しのウェル内で37℃で48時間インキュベートした。

【0327】

カニクイザルPBMCの単離および刺激：

カニクイザルPBMCを、フランスのシラベ社（Silabe）から入手した3匹の異なるドナー由来の、20mLのカニクイザル血液から、Lympholyte-Mammal（セダレーン・ラボラトリーズ社（Cedarlane labs））を製造業者の説明書に従って用いる密度勾配遠心によって、単離した。非組織処理（non-tissue treated）96ウェルプレートを、 $3 \mu\text{g}/\text{mL}$ の抗サルCD3、FN-18クローン（インビトロジェン社、製品番号APS0301）で、4℃で一晩プレコーティングした。その後、カニクイザルPBMCを上述のヒトPBMCと同様に刺激した。

【0328】

CD8 T細胞のFACS染色およびFACS解析：

CD3有りまたは無しで48時間インキュベートした後、ヒトPBMCおよびカニクイザルPBMCを回収し、プールし、再度計数し、FACS用緩衝液（PBS+0.5%BSA、0.05%NaN₃）で 5×10^6 細胞／mLの濃度に希釈した。 $50 \mu\text{L}$ （ 0.25×10^6 個の細胞）の細胞液を、96ウェルFACS染色用プレート（ファルコン社、製品番号351190）に添加した。Beriglobin（ヒトIgG、 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）を用いたFcブロックを室温で10分間行った後、細胞をFACS用緩衝液で洗浄し、 $100 \mu\text{L}$ のビオチン化ALG-APV-210または陰性対照と共に4℃で1時間インキュベートした。 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ から開始して12段階の1/3希釈で $0.0003 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで漸減させる希釈系列（実験1）、または $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ から開始して12段階の1/2希釈で $0.0005 \mu\text{g}/\text{mL}$ まで漸減させる希釈系列（実験2）で、抗体を添加した。FACS用緩衝液で2回洗浄した後、細胞を、 $50 \mu\text{L}$ の二次抗体（ストレプトアビジン-APC、BD社、製品番号554067）、および $50 \mu\text{L}$ の、種々のT細胞表面マーカーに対する蛍光結合抗体（CD4-FITC、製品番号550628、CD3-PECy7、製品番号557749、およびCD8-APC-H7、製品番号5601797、BD社）と一緒に、4℃で30分間インキュベートした。PBSで洗浄後、細胞を、 $50 \mu\text{L}$ のFixable Viability Stain BV510（非生細胞をゲーティングにより除去するため）で4℃で15分間染色し、再度洗浄した後、 $130 \mu\text{L}$ の細胞固定液（BD CellFIX 10x、BD社、製品番号340181、MQ H2Oで希釈）で再懸濁した。CD3およびCD8を発現している単一生細胞に対するゲーティングによるフローサイトメトリーを用いて、細胞のALG-APV-210結合性を解析した。2つの独立した実験からのMFI値（FMO減算）、並びに2つの実験からの正規化されたプールデータおよびEC₅₀値を、GraphPad Prism 7の、非線形回帰log（アゴニスト）vs. 正規化反応-可変傾斜（n=6ドナー／群）を用いて求めて、プロットした。

【0329】

結果

ELISA試験において、ビオチン化ALG-APV-210のCD137に対する結合性は、非ビオチン化ALG-APV-210のそれと同様であった（ 0.6 nM と 0.7 nM ）。ビオチン化ALG-APV-210の、CD3刺激PBMC由来の活性化初代ヒトCD8 T細胞および活性化初代カニクイザルCD8 T細胞上に発現されたその免疫調節性標的CD137に対する結合性（EC₅₀）を評価し、非刺激細胞との比較に加え、2種間の比較も行った。図22A、図22B、および図22C、並びに表25において全てのCD3+CD8+細胞のMFIを用いて示されているように、ALG-APV-2

10

20

30

40

50

10は、ヒトCD8 T細胞およびカニクイザルCD8 T細胞の両方に用量依存的に結合するが、非刺激細胞には結合しない。CD3で刺激された、または未刺激のヒトPBMC細胞またはカニクイザルPBMC細胞において、陰性対照ANC107に対する結合は、低／検出不可であった。CD3刺激カニクイザルPBMCに結合したALG. APV-210の最大量(MFI)が、ヒトPBMCと比較して高かったが、これは、最も可能性が高いのは、CD137を発現するCD3刺激カニクイザルPBMCの割合が高いためであり、あるいは、カニクイザルCD8 T細胞上のCD137発現が通常高いためである。カニクイザル細胞がヒト細胞と比較してCD3刺激に対しより感受性であり、それ故にCD137をより多く発現増加したのかどうかは、これらの細胞が抗CD3試薬の種間交差反応性の欠如により異なる抗CD3クローンで刺激されたため、不明である。

10

【表25】

表25：ヒトCD8 T細胞およびカニクイザルCD8 T細胞に対するALG. APV-210の結合性(EC₅₀)

ALG.APV-210の結合性 (nM)	ヒトCD8 T細胞 (CD3刺激PBMCからゲーティング)	カニクイザルCD8 T細胞 (CD3刺激PBMCからゲーティング)
EC ₅₀ (nM)	0.235	0.236
95%信頼区間 (nM)	0.21~0.26	0.22~0.25

【0330】

20

また、ALG. APV-210の結合性を、ALG. APV-210が結合しているCD8 T細胞の割合を調べることで評価した。ヒトCD8 T細胞と比較して、ALG. APV-210が結合しているカニクイザルCD8 T細胞の割合はより大きかった(カニクイザル細胞の場合は71~96%、ヒト細胞の場合は65~76%、図23A、図23B、および図23Cを参照)。また、CD137陽性細胞のMFIに基づいて結合性EC₅₀値を算出した結果、ヒトCD137への結合の場合のEC₅₀は0.17nMであり、カニクイザルCD137への結合の場合のEC₅₀は0.20nMであった。

【0331】

まとめると、本試験の結果から、ALG. APV-210が、ヒトおよびカニクイザルのCD3刺激初代CD8 T細胞に同様のEC₅₀(0.2nM)で結合するが、非刺激細胞には結合しないことが示された。

30

【0332】

実施例15：5T4存在下でヒトCD8 T細胞またはカニクイザルCD8 T細胞を用いるIFNγ放出アッセイにおける5T4-CD137二重特異性抗体のインビトロ活性
プレートに固定された5T4の存在下でヒトまたはカニクイザルのCD8 T細胞を用いるアゴニストアッセイ(agonist assay)において、ALG. APV-210の機能活性を比較し、ALG. APV-210のEC₅₀を求めるための試験を行った。

【0333】

材料および方法

CD8 T細胞に、プレート固定CD3抗体による準最適刺激を与え、プレート固定5T4-FcへのALG. APV-210結合を介したCD137の架橋により活性化させた。細胞培養上清中のIFNγ放出を求めることにより、CD8 T細胞の活性化を測定した。

40

【0334】

ヒトCD8 T細胞の単離およびアッセイ設定：

ヒトPBMCを、Ficoll-Paque(GEヘルスケア社、製品番号17-1440-02)を用いる密度勾配遠心により、健常ドナーから得られた白血球濃厚液(臨床免疫学および輸血医学(Clinical Immunology and Transfusion Medicine)、ラボトリメディシン・リージョンスコネ(Labmedicin Region Skane)、ルンド、スウェーデン)から、単離した。CD8+細胞を、CD8+T細胞単離キット(ミルテニー社、

50

製品番号130-096-495)を用いたネガティブセレクションにより、濃縮した。非組織処理(non-tissue treated)96ウェルアッセイプレート(3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗CD3抗体(OKT-3クローン、アフィメトリクス・イーバイオサイエンス社、製品番号16-0037-85)で、4℃で一晩コーティングした。翌日、プレートをPBSで洗浄し、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5T4-Fcで37℃で2時間コーティングした。5T4-Fcの固定後、アッセイプレートをPBSで洗浄し、R10(10%熱不活化FBS(ハイクローン社、製品番号SV30160、ロット番号RB35944)および10mM HEPES(ギブコ社、製品番号15630056)を含有するRPMI(ギブコ社、製品番号61870010))で最低30分間ブロッキングした。ALG-APV-210をR10で連続希釈し、50 μL をアッセイプレートに3連で添加して、30分後、50 μL のエフェクター細胞(濃縮CD8⁺T細胞、 1.4×10^6 細胞/ mL または 0.07×10^5 細胞/ウェル)を添加した。アッセイプレートを37℃で72時間インキュベートし、培養上清を回収した。上清中のIFN γ レベルをELISA(BD OptiEIA、製品番号555142)で測定した。合計8人のドナーを含んで、実験は4回行った。

【0335】

カニクイザルCD8⁺T細胞の単離およびアッセイ設定：

フランスのシラベ社から入手したカニクイザル(カニクイザル(*Macaca fascicularis*))、成体雄、3~15歳齢)の全血を用いた。製造業者のプロトコルに従って赤血球溶解(BD Pharmalysse、BDバイオサイエンス社、製品番号555899)させることにより、赤血球を除去した。CD8⁺細胞を、CD8 MicroBeadキット(ミルテニーバイオテック社、製品番号130-091-112)を用いたポジティブセレクションにより、濃縮した。プレートを、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗サルCD3 FN-18クローン(インビトロジェン社、製品番号AP50301)で4℃で一晩コーティングし、洗浄し、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5T4-Fcで37℃で2時間コーティングした。5T4-Fcコーティングの後、プレートを洗浄し、R10で最低30分間ブロッキングした。ALG-APV-210をR10で希釈し、50 μL をプレートに3連で添加して、30分後、50 μL のCD8⁺T細胞(0.07×10^6 細胞/ウェル)を添加した。アッセイプレートを37℃で72時間インキュベートし、培養上清を回収した。上清中のIFN γ レベルを、ELISA(Monkey IFN γ ELISA development kit、マブテック社(MABTECH)、製品番号3421M-1H-20)によって測定した。合計8人のドナーを含んで、実験は3回行った。ヒトドナーおよびカニクイザルドナーのそれぞれから得られたIFN γ レベルを正規化し、平均値を算出した。8人(匹)全てのヒトドナーまたはカニクイザルドナーから得られた正規化されたIFN γ レベルの平均値をプールし、GraphPad7を用いた非線形回帰(logアゴニストvs正規化反応、可変傾斜)によりEC₅₀を求めた。

【0336】

結果

図24および表26に示されるように、ヒトCD8⁺T細胞アッセイにおいて、二重特異性CD137-5T4抗体ALG-APV-210は、0.2 nMのEC₅₀という高い機能活性を有した。4つの実験および合計8人のドナーから正規化されたIFN γ レベルをプールし、GraphPad7を用いた非線形回帰によりEC₅₀を求めた。平均値およびSEMを図24に示す。1つの代表的実験の2人のドナーから得られた絶対平均IFN γ 値を図25Aおよび図25Bに示す。抗CD3試薬の最高値は、バックグラウンドのIFN γ レベルと同様、1つの実験の中ではドナーによって異なる。ドナー間でばらつきが認められたため、データを正規化した後に、プールされたデータセットの解析を行った。ALG-APV-210のCD8⁺T細胞活性化を、5T4-Fcの存在下および非存在下の両方で評価し、5T4架橋依存性を検証した。その結果、二重特異性CD137-5T4抗体ALG-APV-210が、5T4による架橋結合が生じる場合に、IFN γ 放出により測定される強力なT細胞活性化を誘導するが；5T4の非存在下ではT細胞活性は生じないことが示された(図25Aおよび図25B)。

【0337】

カニクイザルCD8⁺ T細胞を用いた場合のCD137-5T4二重特異性抗体ALG・APV-210の機能効果の評価も行った。3つの実験および合計8匹のドナーからプールされたデータに基づいて、カニクイザルCD8⁺ T細胞アッセイにおけるALG・APV-210のEC₅₀を求めたところ、0.4 nMであった（図26および表26）。また、1つの代表的実験の3人のドナーから得られた絶対平均値を図27A、図27B、および図27Cに示す。ヒトを背景とする場合と同様、絶対値（最高値およびバックグラウンドIFN γ レベルを含む）は1つの実験の中の個々のカニクイザルドナー間でも異なる。従って、データを正規化し、その後にプールされたデータセットのEC₅₀解析を行った。ALG・APV-210のCD8⁺ T細胞活性化を、5T4-Fcの存在下および非存在下の両方で評価し、5T4誘導性CD137架橋の依存性を検証した。図27A～図27Cに示されるように、ALG・APV-210の作動薬的な作用は、ヒト背景における所見と同様、カニクイザルCD8⁺ T細胞アッセイにおいても5T4依存的である。図27A、図27B、および図27Cはそれぞれ、1つの代表的実験から得られた3匹の個々のドナーのIFN γ の絶対平均値およびSEM値を示している。陰性対照として、5T4無しのウェルを含ませた。

【表26】

表26：ヒトおよびカニクイザルCD8⁺ T細胞アッセイにおけるALG・APV-210の結合性

ALG.APV-210の結合性 (nM)	ヒトCD8 ⁺ T細胞	カニクイザルCD8 ⁺ T細胞
EC ₅₀	0.2	0.4
95%信頼区間	0.17～0.21	0.37～0.44
HillSlope	2.3	3.4

【0338】

本試験から、機能的CD8⁺ T細胞活性化アッセイにおけるCD137-5T4二重特異性抗体ALG・APV-210のEC₅₀は、ヒト（0.2 nM）およびカニクイザル（0.4 nM）の間で同等であることが示された。ヒトCD8⁺ T細胞アッセイおよびカニクイザルCD8⁺ T細胞アッセイの両方で、T細胞活性化は、5T4に依存的なCD137の架橋を介してもたらされた。

【0339】

実施例16：T細胞IFN- γ 分泌アッセイおよびT細胞増殖アッセイにおける5T4-CD137二重特異性抗体ALG・APV-210のインビトロ活性

CD137の標的依存活性化の誘導における5T4-CD137二重特異性分子ALG・APV-210の作動薬的な働きを、未分離の末梢血単核球（PBMC）を用いたT細胞IFN- γ 分泌アッセイおよびT細胞増殖アッセイで評価した。抗CD137二重特異性コンストラクトの機能を調べるため、初代PBMCを抗CD3抗体で刺激することにより、休止T細胞上には発現されないか低レベルにしか発現されないCD137の発現を増加させた。TCRおよびCD137による初代T細胞の同時刺激は、T細胞のサイトカインインターフェロン γ （IFN- γ ）分泌を増強する。

【0340】

方法

IFN- γ 分泌アッセイ：

標準的なフィコール勾配法を用いて、末梢血単核球（PBMC）を健常ヒト血液から単離した。この単離細胞を生理食塩水緩衝液で洗浄して血小板を除去した。PBMCを、ヒト5T4または空ベクターをトランスフェクションされたCHO-K1細胞と共に、およそ120,000個のPBMC対30,000個のCHO-K1細胞の比で、96ウェルプレート内で培養した。抗CD3抗体OKT3（イーバイオサイエンス社）を全てのウェルに1 μ g/mLの濃度で添加した。細胞を、10%ウシ胎児血清、ピルビン酸ナトリウ

ム、抗生物質、および可欠アミノ酸を添加した、総体積200μLのRPMI1640培地中で培養した。プレートを37℃、5%CO₂の加湿恒温器内で72時間インキュベートした。CD137の発現上昇を誘導するために準最適濃度の抗CD3抗体によるプライミングでPBMC培養物を刺激した72時間後に、100μLの培地を回収した。Milliplex（登録商標）キット（ミリポア社）を製造業者の取扱説明書に従って用いて、上清中のIFN-γレベルを測定した。Bio-Plex Reader 200 System（バイオラド社）でデータ収集を行った。GraphPad Prism 6（登録商標）グラフ描画および統計ソフトウェアにおいて、EC50値を求めるための非線形回帰分析を実施した。

【0341】

T細胞増殖アッセイ：

標準的なフィコール勾配法を用いて、PBMCを健常ヒト血液から単離した。単離後、細胞を生理食塩水緩衝液で洗浄して血小板を除去した。PBMCをCellTrace（商標）Violet（サーモフィッシャー社）で標識し、洗浄し、ヒト5T4をトランスフェクションされた被照射CHO-K1細胞と共に、およそ120,000個のPBMC対30,000個のCHO-K1細胞の比で、96ウェルプレート内で培養した。CHO-K1細胞は、照射し（X線照射装置Cell Rad、ファキシトロン・バイオプティクス社（Faxitron Bioptics, LLC））、培地で洗浄した後に、PBMCと播種した。抗CD3抗体OKT3（イーバイオサイエンス社）を全てのウェルに5ng/mLの濃度で添加した。細胞を、10%ヒト血清（シグマ社）、ピルビン酸ナトリウム、抗生物質、および可欠アミノ酸を添加した、総体積200μLのRPMI1640培地（ギブコ社）中で培養した。プレートを37℃、5%CO₂の加湿恒温器内で96時間インキュベートした。

【0342】

上清を除去し、細胞を、同一アッセイプレート内で、2%BSAおよび2mMEDTAを含有するPBS緩衝液中の抗CD4抗体、抗CD8抗体、および抗CD5抗体で、氷上で30分間、標識した。7AAD（シグマ社）の添加により、分析内での死細胞の除外を可能とした。洗浄後、細胞を120μL/ウェルに再懸濁し、70μL/ウェル体積を各ウェルから回収し、フローサイトメーター（LSRII（商標）、BDバイオサイエンス社）で解析した。データ解析を、Flowjoソフトウェアを用いて、少なくとも1回の細胞分裂を経たCD8+生T細胞イベント（CD4-CD8+CD5+、7AAD-）の%算出、または、CD8+生T細胞イベント（CD4-CD8+CD5+、7AAD-）の計数による、2つの方法で実施した。両方の場合で、FSCパラメーターおよびSSCパラメーターを用いたリンパ球に対するゲーティングの後に、解析を実施した。各条件をデュープリケートで試験し、それぞれのデュープリケートセットの平均を、GraphPad Prism 6（登録商標）グラフ描画および統計用ソフトウェアを用いてグラフ化した。

【0343】

結果および結論

IFN-γ分泌実験の結果を図32に示す。グラフ上の全てのデータ点は2連ウェルの平均を表す。二重特異性抗体無しの、抗CD3単独の添加は、非常に低いレベルのIFN-γしか誘導しなかった。ALG.APV-210二重特異性分子の添加は、IFN-γの分泌を用量依存的に増加させた。抗CD3抗体により誘導されるIFN-γのベースラインレベルも、ALG.APV-210により誘導されるIFN-γ分泌の総量と同様、PBMCドナーによってばらつきがあった（図32Aおよび図32B）。IFN-γの分泌増強は、5T4発現CHO-K1細胞の存在下では認められたが、空ベクター対照でトランスフェクトされたCHO-K1細胞の存在下では認められなかった。すなわち、二重特異性分子ALG.APV-210は、IFN-γ分泌で測定されるCD137機能を刺激するために、5T4の結合を必要とする。

【0344】

T細胞増殖実験の結果を図33に示す。グラフ上の全てのデータ点は2連ウェルの平均

10

20

30

40

50

を表す。準最適濃度の抗CD3抗体によるプライミング刺激の96時間後に、CD8+T細胞の多クローン性増殖を評価した。二重特異性抗体無しの、抗CD3単独の添加は、低レベルのCD8+T細胞増殖しか誘導しなかった。ALG・APV-210の添加は、CD8+T細胞の増殖を用量依存的に増加させた（図33Aおよび図33B）。ウェル毎に収集された、細胞分裂を経た細胞の割合（上段パネル）および総細胞数（下段パネル）は共に、一貫して、ロバストな細胞分裂を起こし、分裂後のCD8+T細胞をウェル内に蓄積させた。結果は複数のドナーの間で一貫性があった。

【0345】

実施例17：一連のタンパク質密度で5T4を発現する各種ヒト腫瘍株の存在下におけるALG・APV-210の機能的レポーター活性

細胞表面上に一連の密度で5T4を発現する複数のヒト癌化細胞株にわたって、ALG・APV-210コンストラクトが結合性および機能的レポーター活性を有するかどうかを確認するための実験を行った。ALG・APV-210の最大結合能は、細胞の5T4腫瘍抗原の発現レベルによって変わる。従って、5T4（CHO/5T4）で安定トランスフェクトされたCHO-K1細胞のほか、一連の密度で5T4を天然に発現する3種類の腫瘍細胞株（MDA-MB-231、H1975、およびTF-1）に対して、ALG・APV-210の結合を試験した。

【0346】

材料および方法

5T4結合アッセイ：

3倍に漸増させるALG・APV-210コンストラクト（100nM～0.14nMの範囲）を、ヒト5T4発現細胞株と共に、40分間、4℃のFACS用緩衝液中でインキュベートし、3回洗浄し、PE標識ヤギ抗ヒトFc二次抗体（ジャクソン・イムノリサーチ社）で検出した。ALG・APV-210の結合をフローサイトメトリーで検出した。全ての試料はデュープリケートで実行した。GraphPad Prism 6（登録商標）グラフ描画および統計ソフトウェアにおいて、EC₅₀値を求めるための非線形回帰分析を実施した。

【0347】

5T4タンパク質密度：

各細胞株上に存在する5T4の表面タンパク質密度を、Quantibrite（商標）Beads（BDファーマーゲン社）を用いて調べた。ALG・APV-210との結合曲線用の細胞を得るために使用された、全く同じ血球計算器設定を用いて、Quantibrite（商標）Beadsを得た。各ピークにおいて、4つのビーズ集団をゲーティングし、幾何平均蛍光を求めた。式 $y = mx + c$ （式中、 $y = \log_{10}$ （蛍光）、 $x = \log_{10}$ （ビーズ当たりのPE分子））を用いて、線形回帰 $\log_{10}$ （ビーズ当たりのPE分子）を、 $\log_{10}$ （蛍光）に対してプロットした。それから、細胞当たりのPE分子（5T4）の数を算出することができた。この特定のアッセイでは、前記式は $y = 1.036x - 1.478$ となった。全ての蛍光平均値は、製造業者のプロトコルによって示される、試料の幾何平均を用いて算出した。

【0348】

CD137レポーターアッセイ：

NF-κBプロモーターの制御下のルシフェラーゼレポーター遺伝子を保有するJurkat/CD137トランスフェクタント（プロメガ社）を、H1975腫瘍細胞、TF-1腫瘍細胞、MDA-MB-231腫瘍細胞、またはCHO/5T4腫瘍細胞と共に、30,000このレポーター細胞対60,000個の標的細胞の比で、96ウェルプレート内で培養した。最終濃度が10nM～0.0006nMの範囲をとる、5倍ずつの濃度の、ALG・APV-210分子を、添加した。細胞を、1%ウシ胎児血清、ビルビン酸ナトリウム、抗生物質、および可欠アミノ酸を添加した、総体積100μLのRPMI1640培地中で培養した。プレートを37℃、5%CO₂の加湿恒温器内で5時間インキュベートした。100μLのBio-Glowバッファー（プロメガ社）を各ウェルに添

10

20

30

40

50

加し、混合し、10分間インキュベートした後、発光を測定した。MicroBeta² 2450 Microplate Counter（パーキンエルマー社）で発光を測定した。全てのデータ点はデュプリケート試料を表す。GraphPad Prism 6（登録商標）グラフ描画および統計ソフトウェアにおいて、EC₅₀値を求めるための非線形回帰分析を実施した。曲線上の全ての点は2連ウェルの平均を表す。Y軸は相対蛍光単位（RLU）の値を示す。

【0349】

結果および結論

試験された癌化細胞株は、Quantibrite（商標）Beadsを用いて測定される細胞表面上に発現されている5T4タンパク質の量が各々異なっていた。従って、ALG. APV-210が、一連の5T4発現と、結合し機能的に活性となる能力を調べることができた。

【0350】

ALG. APV-210は、一連の5T4細胞表面発現癌化細胞株に結合した。図34に示されるように、5T4発現CHOは、5T4内因性発現癌化細胞株よりも10倍多い5T4発現を有する。3種類の未トランスフェクト癌化細胞株のうち、H1975は最も高い5T4発現を示し、TF-1細胞は最も低い5T4タンパク質密度を示した。MDA-MB-231細胞は中間の5T4発現を示した。表面5T4タンパク質密度を結合曲線から算出したところ、17,000から250,000超の範囲の分子／細胞を示している。表27は、結合曲線から求められた、5T4細胞表面タンパク質密度および結合性EC₅₀値を示している。癌化細胞株上の5T4発現の密度は蛍光性標準を用いて算出した。

【表27】

表27：5T4密度およびEC₅₀（ALG. APV-210）のまとめ

腫瘍株	5T4分子/細胞	EC ₅₀ (nM)
CHO/5T4	278000	10
H1975	43000	20
MDA.MB-231	33000	21
TF-1	18000	71

【0351】

図35は、機能的CD137レポーターアッセイの結果を示している。図から分かる通り、ALG. APV-210は、細胞表面5T4発現が17,000から250,000超という範囲をとるのにもかかわらず、CHO／ヒト5T4、H1975、MDA.MB.231、またはTF-1腫瘍株への結合を介してCD137を架橋結合する場合に、NF-κBシグナル伝達を十分に誘導することができた。表面5T4タンパク質密度は最大機能活性（最大RLU）に影響を与え、ヒト5T4発現CHO細胞は最も高いRLU値を示した。しかし、3種類の癌化細胞株は口バストなレポーター機能を誘導した。これらの結果は、ALG. APV-210が一連の密度の5T4を発現する5T4陽性細胞の存在下で作動薬として機能することを示している。表28は、種々のヒト5T4発現腫瘍株の存在下でのCD137レポーターアッセイにおいてALG. APV-210により誘導された、EC₅₀および最大RLUを示している。

10

20

30

40

50

【表 28】

表 28：ALG. APV-210 の EC_{50} および最大RLUのまとめ

腫瘍株	EC_{50} (nM)	最大RLU
CHO/5T4	0.0092	3092200
H1975	0.037	2743132
MDA.MB-231	0.054	2243297
TF-1	0.063	2751522

【0352】

10

実施例 18：ヒト CD8⁺ T 細胞およびヒト HCT116 腫瘍細胞を用いた IFN γ 放出アッセイにおける 5T4-CD137 二重特異性抗体のインビトロ活性

ビーズ上にコーティングされた抗 CD3 抗体で刺激した CD8⁺ T 細胞を内在性レベルの 5T4 を発現するヒト HCT116 腫瘍細胞とプレート内で共培養する CD8⁺ T 細胞アッセイにおいて、5T4-CD137 二重特異性抗体 ALG. APV-210 の機能活性を評価した。

【0353】

材料および方法

HCT116 細胞のマイトマイシン C 処理：

内在性レベルのヒト 5T4（受容体密度 = 6.2×10^4 / 細胞、表 21）を発現するヒト結腸癌細胞株の HCT116 腫瘍細胞（ATCC（登録商標）CCL-247（商標））を、濃度 $50 \mu\text{g} / \text{mL}$ のマイトマイシン C（ $0.5 \text{ mg} / \text{mL}$ 、シグマ・アルドリッチ社）で前処理し、腫瘍細胞の過増殖を阻害した。37℃で45分間のマイトマイシン C とのインキュベーションの後、細胞を R10 培地（10% 熱不活化 FBS（ハイクローン社、製品番号 SV30160、ロット番号 RB35944）および 10mM HEPES（ギブコ社、製品番号 15630056）を含有する RPMI（ギブコ社、製品番号 61870010））で 3 回洗浄し、その後、新しい R10 培地で 10×10^6 細胞 / mL の濃度に再懸濁した。50 μL （ 5×10^5 細胞 / ウェル）の、マイトマイシン C 処理された、HCT116 細胞を、TC 処理アッセイプレート（エッペンドルフ社、製品番号 0030730.119）に播種し、37℃で一晩インキュベートした。

20

30

【0354】

CD8⁺ T 細胞アッセイの設定：

翌日、ヒト PBMC を、Ficoll-Paque（GEヘルスケア社、製品番号 17-1440-02）を用いる密度勾配遠心により、健常ドナーから得られた白血球濃厚液（臨床免疫学および輸血医学（Clinical Immunology and Transfusion Medicine）、ラボトリメディシン・リージョンズコーネ（Labmedicin Region Skane）、ルンド、スウェーデン）から、単離した。CD8⁺ 細胞を、CD8⁺ T 細胞単離キット（ミルテニ-社、130-096-495）を用いたネガティブセレクションにより、濃縮した。二重特異性抗体 ALG. APV-210、または Adaptir フォーマットのアイソタイプ対照 ANC017（ANC017 の重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列は下記の表 29A および表 29B に示す）を R10 培地で連続希釈し、50 μL をアッセイプレートの各ウェルに添加し、37℃で30分間インキュベートし、その後、50 μL の抗 CD3 ビーズ（ 4×10^8 / mL の抗 CD3 抗体 OKT-3 クローン、アフィメトリクス・イバイオサイエンス社、製品番号 16-0037-85、をビーズにコーティングし、 2×10^6 / mL に希釈）を、CD8⁺ T 細胞およびビーズの比が 1 : 1 となるように添加し、その後、50 μL のエフェクター細胞（濃縮された CD8⁺ 細胞、 2×10^6 / mL または 1×10^5 / ウェル）を添加した。アッセイプレートを 37℃で72時間インキュベートし、培養上清を回収した。上清中の IFN γ レベルを ELISA（BD OptiEIA、製品番号 555142）で測定し、正規化データ（平均値および SD 値）として図 36 に示す。GraphPad Prism 7 を用いて、非線形回帰 log（アゴニ

40

50

スト) v s . 正規化反応 (可変傾斜) により、 EC_{50} 値を求めた。培養上清中の $IFN\gamma$ 産生の 2 つの最高値の平均を算出することにより、TOP 値 (最大機能効果) を求めた。合計 12 人のドナーを含んで、実験は 4 回行った。

【表 29 A】

表 29 A : ACN017 可変領域配列

	重鎖		軽鎖	
	アミノ酸配列	配列番号	アミノ酸配列	配列番号
CDR1	GFTFSSYA	30	QSISSY	8
CDR2	ISGSGGST	32	AAS	10
CDR3	AKGSGSYFDL	177	QQYSGYPYT	178
VH/VL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGSGSY FDLWGQGTLLTVSS	179	DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYSGY PYTFGQGTKLEIK	180

10

【表 29 B】

表 29 B : 完全長 ACN017 配列

完全長 ACN017 配列 (VH-Fc-VL)	配列番号
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGSGSYFDLWGQGTLLTVSSGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPYTFGQGTKLEIKSSE PKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGSGGGSGGGSGGG GSPSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSGSGSYFDLWGQGTLLTVSS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPG KAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSGYPYTFGQGTKL EIKRS	181

20

【0355】

結果および結論

CD137-5T4 二重特異性抗体 ALG . APV-210 の機能効果を、プレート内で HCT116 細胞と共培養したヒト CD8+T 細胞 (エフェクター細胞) を用いて決定した。図 36 に示されるように、二重特異性 CD137-5T4 抗体 ALG . APV-210 は、5T4 の内在性レベルを発現する HCT116 細胞の存在下で、用量依存的に、 $IFN\gamma$ 放出で測定される強力な T 細胞活性化を誘導した。 EC_{50} の決定については、4 つのプール実験からの 12 人のドナーの平均値および 95% 信頼区間を示している表 30 を参照されたい。ALG . APV-210 処置後の 6 人の個々のドナーの $IFN\gamma$ レベルをアイソタイプ対照 (ANC017) と比較している図 37 に示されるように、HCT116 細胞によって発現される 5T4 の内在性レベルは、ALG . APV-210 の高い作動薬的機能効果を誘導するのに十分である。また、有効性 (最大 $IFN\gamma$ 応答) も図 38 に示されている (アイソタイプ対照と比較した変化倍率、12 人のドナーの平均値および SD) 。

30

【表 30】

表 30 : ヒト 5T4 発現 HCT116 細胞の存在下での CD8+T 細胞

アッセイにおける、ALG . APV-210 の EC_{50}

ALG.APV-210 の効力	HCT116 T細胞アッセイ
EC_{50} (nM)	0.17
95% 信頼区間	0.14~0.21

40

【0356】

50

実施例 19：5 T 4 陽性異種移植片腫瘍である H C T - 1 1 6 の S C I D ベージュマウスモデルにおける、二重特異性抗体のインビボ抗腫瘍活性

A L G . A P V - 2 1 0 のインビボにおける抗腫瘍活性を評価するための試験を実施した。

【0357】

材料および方法

デンマークのタコニック社 (Taconic) から入手した雌 S C I D ベージュマウス (6 ~ 8 週齢) を実験に用いた。全ての動物処置は、動物の権利および保護に関するスウェーデンの法律に従って実施され、ルンド自治体 / マルメの動物実験倫理委員会による承認を受けた (倫理申請番号 (ethical application number) : M 1 5 1 - 1 3) 。P B M C を、4 人の健常ドナーから得られた白血球濃厚液 (臨床免疫学および輸血医学 (Clinical Immunology and Transfusion Medicine) 、ラボラトリメディシン・リージョンスコネ (Labmedicin Region Skane) 、ルンド自治体、スウェーデン) から、製造業者の説明書に従って F i c o l l - P a q u e (G E ヘルスケア社、製品番号 1 7 - 1 4 4 0 - 0 2) を用いた密度勾配遠心によって単離した。腫瘍関連抗原 5 T 4 陽性である、ヒト結腸癌細胞株の H C T - 1 1 6 細胞株を、A T C C から購入し (A T C C (登録商標) C C L - 2 4 7 (商標) 、ロット番号 6 2 7 6 5 6 6 8) 、推奨に従って培養した。

【0358】

0 日目、対数増殖中の H C T - 1 1 6 腫瘍細胞を、マウスの右後側腹部に皮下接種した ($110 \mu\text{L}$ の P B S 中 3×10^6 個)。翌日 (1 日目)、 $100 \mu\text{L}$ の P B S 中の、4 人のドナーから得られた 7×10^6 個のヒト P B M C を腹腔内注射した。6 日目から、溶剤 (P B S) 、A L G . A P V - 2 1 0 ($10 \mu\text{g}$ / マウス) 、または A L G . A P V - 2 1 0 ($100 \mu\text{g}$ / マウス) による腹腔内抗体処置 (P B S 中 $100 \mu\text{L}$) を、週 2 回、合計 5 回の注射となるように、行った ($n = 5$ 匹のマウス / 処置 / ドナー)。腫瘍成長を観察し、週 2 回ノギスで幅、長さ、および高さを測定し、腫瘍体積を算出した ($w / 2 \times l / 2 \times h / 2 \times p i \times (4 / 3)$) 。実験のエンドポイントは、 2 cm^3 以上の腫瘍体積、負傷、またはマウスの健康障害とした。腫瘍成長について、種々の時点 (9 日目、13 日目、16 日目、20 日目、および 23 日目) で、GraphPad Prism 7 を用いて、マンホイットニーのノンパラメトリック両側 t 検定を用いた統計解析を行った。

【0359】

結果

図 28 に示されるように、 $10 \mu\text{g}$ / マウスまたは $100 \mu\text{g}$ / マウスのいずれの用量の A L G . A P V - 2 1 0 も、13 日目から 23 日目まで、溶剤群と比較して統計的に有意な抗腫瘍活性 (例えば、腫瘍体積抑制) を示した (4 人のドナーからのプールデータ、統計解析および p 値については表 31 を参照) 。

【表 31】

表 31 : H C T - 1 1 6 異種移植片腫瘍モデルにおける A L G . A P V - 2 1 0 処置後の抗腫瘍活性の統計解析

腫瘍接種後日数	治療間の腫瘍体積の有意差 ($p < 0.05$) 、マンホイットニーのノンパラメトリックな両側 t 検定	
	ALG.APV-210 $10 \mu\text{g}$ 対 溶剤	ALG.APV-210 $100 \mu\text{g}$ 対 溶剤
9 日目	なし	なし
13 日目	有り * $p = 0.0109$	有り * $p = 0.0262$
16 日目	有り *** $p = 0.0008$	有り ** $p = 0.0010$
20 日目	有り *** $p < 0.0001$	有り * $p = 0.0009$
23 日目	有り ** $p = 0.0016$	有り * $p = 0.0225$

【0360】

結論としては、本試験により、ALG・APV-210が5T4陽性ヒト結腸癌異種移植片腫瘍モデルにおいて抗腫瘍特性を有することが示された。

【0361】

実施例20：BALB/cマウスにおけるALG・APV-209の薬物動態特性

マウスにおけるALG・APV-209およびALG・APV-210の薬物動態（PK）特性を評価するための試験を実施した。正常BALB/c雌マウスに、時点0に、単回投与として200 μgのALG・APV-209またはALG・APV-210を静脈内（IV）注射し、各時点に1～3匹のマウスから採血した。t＝注射の15分後、並びに2、6、24、48、72、96、168、336、および504時間後に、麻酔下のマウスを心穿刺により瀉血させて血清を採取した。血清中のALG・APV-209およびALG・APV-210の濃度を、インタクトタンパク質のみを検出するように開発されたELISA法で、抗CD137 BDを捕捉するためにヒトCD137 ECD-AFH（ALG027）を用い、抗5T4 BDを検出するためにビオチン化5T4 ECD-mFc（ALG029）を用いて、測定した。Phoenix 64ソフトウェア（v6.4 WinNonlin（商標）ライセンス）を用いたノンコンパートメント解析（NCA）から推定された薬物動態パラメーターを表32に列挙し、半減期の推定値をフィット統計量（fit statistics）と共に図29に示す。スパースサンプリングおよび均一な重み付けによるコンパイル済みIV投与モデルをNCAの際に用いた。

【0362】

ボラス用量200 μgのALG・APV-209またはALG・APV-210をIV注射された正常雌BALB/cマウスにおいて、NCAを用いて求められた見かけの終末相消失半減期は、それぞれ142時間および215時間であった（ADAによる影響を受けた可能性がある試料は除外）。コンパートメント解析（IV投与で2-コンパートメント）を用いて求められた半減期のパラメーター推定値は、ALG・APV-209およびALG・APV-210においては同様であった。NCAにより推定された、ALG・APV-209およびALG・APV-210のクリアランスおよび体積は、それぞれ、0.263 mL/時間/kgおよび0.204 mL/時間/kg、54 mL/kgおよび63 mL/kgであった。両方の解析法で、ALG・APV-210は最も長い終末相消失半減期およびわずかにより良好なクリアランス値を示した。マウスにALG・APV-210を投与した場合、後期の時点で、抗薬物抗体（ADA）の示唆となる急激な血清中濃度減少が認められたが、薬剤が試料中に存在し続けていることから、ELISA法ではADAの存在を確認できず、これは、ADAの急速なクリアランスという結果を生じる可能性もある。

10

20

30

40

50

【表 3 2】

表 3 2 : NCAで推定された、ALG. APV-209およびALG. APV-210の動態パラメーター

PKパラメーター	単位	ALG.APV-209	ALG.APV-210	ADAおよび血清を除いたALG.APV-210
Rsq		0.82	0.900	0.966
HL λ_z	hr	142.0	134.6	215.3
T _{max}	hr	0.25	0.25	0.25
C _{max}	μg/mL	254.04	252.34	252.34
SE C _{max}	μg/mL	N/A	14.6	14.6
C _{max} /D	kg*μg/mL/mg	0.025	0.025	0.025
C ₀	μg/mL	262.2	263.6	263.6
AUClast	hr*μg/mL	34858	33054	38705
AUCINF_obs	hr*μg/mL	38043	36317	49124
AUCINF/D_obs	hr*kg*μg/mL/mg	3.804	3.632	4.912
V_obs	mL/kg	53.84	53.46	63.22
CL_obs	mL/hr/kg	0.263	0.275	0.204
Vss/OBS	mL/kg	51.1	51.5	62.7
MRTlast	hr	147.4	136.7	171.9
MRTINF_obs	Hr	194.4	187.2	308.2

Rsq : 終末相消失期の適合度統計値

HL λ_z : 見かけの終末相消失半減期

T_{max} : 最高濃度到達時間

C_{max} : T_{max} 時点の最高到達濃度

SE C_{max} : T_{max} (最高平均濃度の時間) 時点のデータの標準誤差

C_{max}/D : 用量で割った最高到達濃度

C₀ : 0時間における外挿初期濃度

__obs : 到達濃度に基づく

AUClast : 投与時点から最終測定濃度までの曲線下面積

AUCINF : 投与時点から無限大時間まで外挿された曲線下面積

AUCINF/D : 用量で割ったAUCINF

V : 終末相に基づく分布容積

CL : 血清クリアランス

Vss : 定常状態時の分布容積の推定値

MRTlast : 最終測定濃度までの平均滞留時間

MRTINF : 無限大時間まで外挿された平均滞留時間

【0363】

実施例 21 : ALG. APV-210のFc部分はFcγ受容体と相互作用しない

ALG. APV-210は、FcγRを介したT細胞の活性化またはADCC、ADCP、CDCなどに繋がる可能性がある、Fcγ受容体 (FcγR) との相互作用を防ぐために導入された変異を含有する。そのため、以下のFcγRを安定発現するCHO細胞トランスフェクタントに対するALG. APV-210の結合性を調べた: FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32a His131)、FcγRIIb (CD32b)、FcγRIIIa (CD16a Val158およびCD16a Phe158)、およびFcγRIIIb (CD16b)。未トランスフェクトCHO細胞を陰性対照として用いた。対照ヒトIgG1分子を陽性対照として用いた。種々の濃度のALG. APV-210または対照IgG1を、FcγR発現細胞株と共にインキュベートし、洗浄し、二次抗ヒトIgG試薬で標識した。ALG. APV-210および対照IgG1の結合をフローサイトメトリーで検出した。

【0364】

結果を図30Aおよび図30Bに示す。図30Bは、対照IgG1が、試験されたFcγR発現細胞株の全て (FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32a His131)、FcγRIIb (CD32b)、FcγRIIIa (CD16a Val158およびCD16a Phe158)、およびFcγRIIIb (CD16b)) に結合したが、未トランスフェクトCHO細胞 (陰性対照) には結合しなかったことを示している。FcγR発現細胞株のいくつかに対する対照IgG1の顕著な結合が、4 nMもの低濃度においても確認された。図30Aは、ALG. APV-210コンストラクトでは、

試験されたFcγR (FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32a His131)、FcγRIIb (CD32b)、FcγRIIIa (CD16a Val158およびCD16a Phe158)、およびFcγRIIIb (CD16b)) に対し、検出可能な結合が確認されなかったことを示している。

【0365】

実施例22：ヒトPBMCおよびCHO-5T4細胞を用いたT細胞増殖アッセイにおける5T4-CD137二重特異性抗体のインビトロ活性

5T4-CD137二重特異性分子であるALG-APV-209およびALG-APV-210の機能活性を、PBMCを用いたT細胞増殖アッセイで評価した。標準的なフィコール勾配法を用いて、PBMCを健常ヒト血液から単離した。単離後、細胞を生理食塩水緩衝液で洗浄して血小板を除去した。PBMCを、照射されたヒト5T4発現CHO-K1細胞と共に、およそ120,000個のPBMC対30,000個の5T4(+)細胞の比で、96ウェルプレート内で培養した。5T4発現CHO-K1細胞は、照射し(X線照射装置Cell Rad、ファキシトン・バイオプティクス社)、培地で洗浄した後に、PBMCと播種した。抗CD3抗体OKT3(イーバイオサイエンス社)を全てのウェルに1ng/mLの濃度で添加した。細胞を、10%ウシ胎児血清(シグマ社)、ピルビン酸ナトリウム、抗生物質、および可欠アミノ酸を添加した、総体積200μLのRPMI1640培地(ギブコ社)中で培養した。プレートを37℃、5%CO₂の加湿恒温器内で72時間インキュベートした。上清を除去し、細胞を、同一アッセイプレート内で、2%BSAおよび2mMEDTAを含有するPBS緩衝液中の抗CD4抗体、抗CD8抗体、および抗CD5抗体で、氷上で30分間標識し、死細胞を除去するために7AADを添加した。洗浄後、細胞を120μL/ウェルに再懸濁し、フローサイトメーター(LSR-II(商標)、BDバイオサイエンス社)において、70μL/ウェル体積を各ウェルから回収した。細胞解析はFlowjoソフトウェアを用いて実施し、FSCパラメーターおよびSSCパラメーターを用いたリンパ球に対するゲーティング後に、CD4+またはCD8+生T細胞イベント(CD4+CD8-CD5+、7AAD-またはCD4-CD8+CD5+7AAD-)の数をカウントすることにより解析した。各条件をデュープリケートで試験し、それぞれのデュープリケートセットの平均を、GraphPad Prism6(登録商標)グラフ描画および統計用ソフトウェアを用いてグラフ化した。

【0366】

試験結果を図31Aおよび図31Bに示す。T細胞を低濃度の抗CD3抗体でプライミング刺激した72時間後に、CD8+T細胞の抗原特異的増殖を評価した。抗CD3刺激はCD137の発現上昇を誘導する。二重特異性抗体無しの、抗CD3単独の添加は、CD8+T細胞増殖およびCD4+T細胞増殖をある程度誘導した。ALG-APV-209またはALG-APV-210の添加は、CD8+T細胞の増殖を増加させた(図31A)。対照的に、CD8+T細胞上のCD137の優先的発現から予想されるように、二重特異性抗体は、CD4+T細胞の抗CD3誘導性増殖に対しては限定的な影響しか示さなかった(図31B)。結果は複数の実験の間で一貫性があった。Morrison型対照分子(ALG-APV-004)は比較用に含まれた。

【0367】

まとめると、これらの結果から、ALG-APV-209およびALG-APV-210の両方が、CD8+T細胞の増殖を増強することが示された。ALG-APV-209およびALG-APV-210は、MorrisonフォーマットコンストラクトALG-APV-004よりも多量の細胞増殖を誘導した。

【0368】

実施例23：正常組織および腫瘍組織における5T4発現の免疫組織化学的評価

正常ヒト組織および一連の種々の腫瘍型における腫瘍抗原5T4の発現を免疫組織化学(IHC)によって評価した。

【0369】

染色法の開発：

対照細胞および被験ヒト組織の凍結切片およびホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）切片において、5種類の市販の抗5T4抗体および2種類の自家製の抗5T4抗体の5T4結合性を評価した。アイソタイプ対照染色も含まれた。マウスモノクローナル抗体（MAB4975クローン、R&Dシステムズ社）を、凍結切片およびFFPE切片の両方で特異性および機能性が高かったため、最もパフォーマンスの良い抗体として選択した。抗原回復法および抗体価をこの抗体用に最適化した。

【0370】

組織および組織マイクロアレイ：

ヒト胎盤組織、およびヒト5T4を発現するようにトランスフェクトされたマウス結腸癌細胞株CT26（ATCC（登録商標）、CRL-2638）を陽性対照として用いた。ヒト大脳細胞、ヒト肝臓細胞、および未トランスフェクトCT26細胞を陰性対照として用いた。陽性対照および陰性対照用に用いたヒト組織はチャールス・リバー・ラボラトリーズ社の保管所から入手した。FFPE組織マイクロアレイ（TMA）はUSバイオマックス社（US Biomax Inc.）から得られた。全ての染色物は、チャールス・リバー・ラボラトリーズ社のPAIの病理責任者によって評価された。

【0371】

正常ヒト組織マイクロアレイのIHC染色：

3人のドナー由来の24種類の組織を含む正常ヒト組織パネル（FDA808j-1）において、5T4発現はいずれの主要器官にも見られなかった。

【0372】

ヒト腫瘍組織種のIHC染色：

5T4発現を、腫瘍ごとに単一のコアで表される72の腫瘍症例の多臓器がん組織アレイ（multiple organ cancer tissue array）（FDA808j-2）においてスクリーニングした。5T4発現は、膵臓、甲状腺、乳房、肝臓、子宮、子宮頸部、横紋筋、皮膚（扁平上皮癌）、神経（神経線維腫）、および膀胱の腫瘍で検出された。

【0373】

5T4発現を、2連または3連のコアで表される、表33に示される選択された適応症のそれぞれについて、10～50の腫瘍症例を含むTMAで評価した。膀胱がん、頭頸部がん（H&N）、非小細胞肺癌（NSCLC）、および中皮腫において、試験された腫瘍の50～56%が5T4陽性であった。かなりの数の膵腫瘍も5T4陽性であった（36%）。試験された明細胞癌腫瘍の50%が5T4陽性であった。

【表33】

表33：7種類の選択された腫瘍適応症における5T4発現

	TMA ID	ドナー総数	5T4陽性ドナー(総数)	5T4陽性ドナー(%)
膀胱がん	BL721	18	10	56
頭頸部がん	HN811	19	10	53
非小細胞肺癌	LC10011a	40	20	50
中皮腫	MS481c	20	10	50
膵がん	PA721a	22	8	36
腎がん	T072b	10	2	20
卵巣がん	T112c	10	1	10

参照による援用

【0374】

本明細書で引用された全ての参考文献、記事、刊行物、特許、特許公報、および特許出願は、あらゆる目的でその全体が参照により本明細書に援用される。しかしながら、本明細書で引用されたいずれの参考文献、記事、刊行物、特許、特許公報、および特許出願の言及も、それらが有効な先行技術を構成すること、または、それらが世界中のあらゆる国の共通一般知識の一部を形成していること、の承認でもいかなる形の示唆でもなく、また

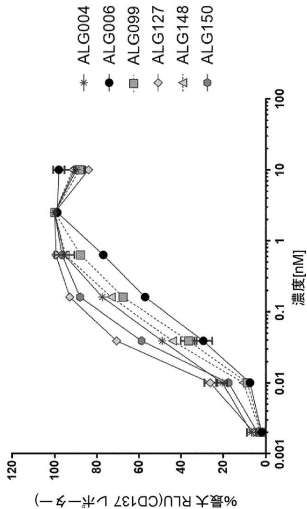
それと解釈されるべきでもない。

【図面】

【図 1】

図 1

レポーターアッセイにおける各バリエアントの活性

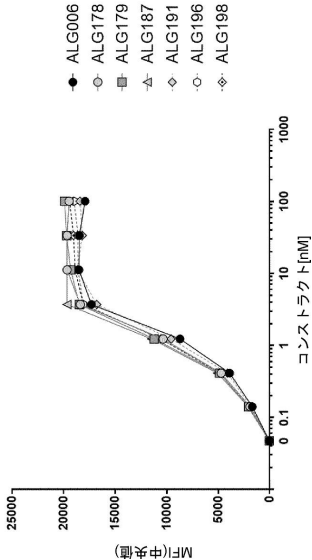


コンストラクト	EC ₅₀ 値(pM)
ALG.APV-004	41
ALG.APV-006	119
ALG.APV-099	63
ALG.APV-127	20
ALG.APV-148	49
ALG.APV-150	29

【図 2】

図 2

ヒト CD137 発現 CHO-K1 細胞に対する抗 CD137 × 抗 5T4 二重特異性コンストラクトの結合



コンストラクト	EC ₅₀ 値(nM)
ALG.APV-006	1.2
ALG.APV-178	1.0
ALG.APV-179	0.9
ALG.APV-187	0.9
ALG.APV-191	1.1
ALG.APV-196	0.9
ALG.APV-198	1.0

10

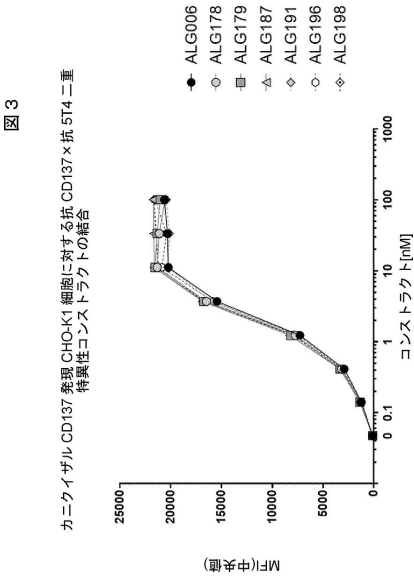
20

30

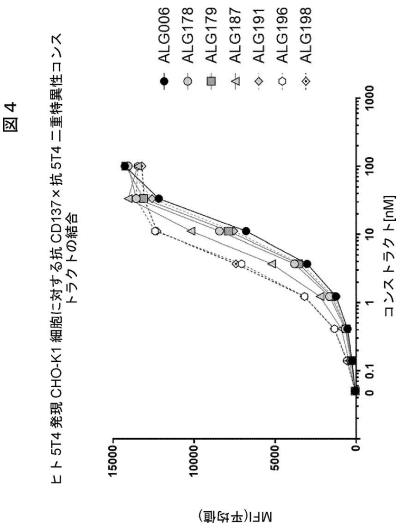
40

50

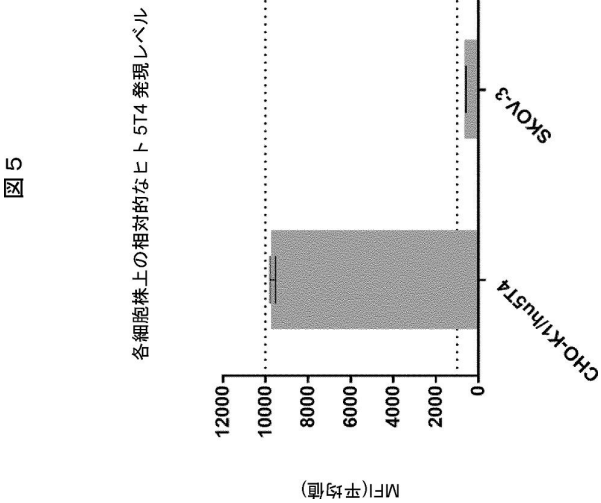
【図 3】



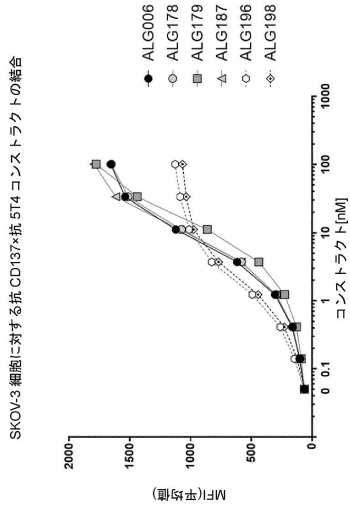
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

20

30

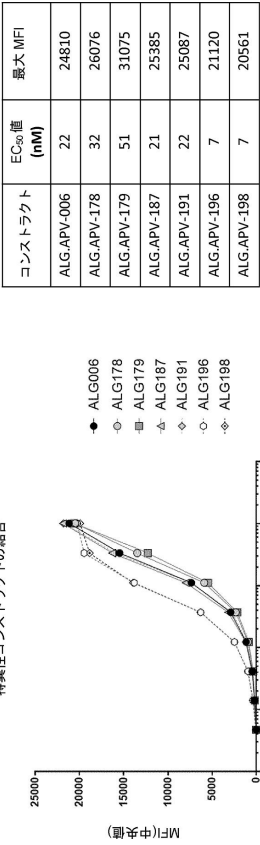
40

50

【図 7】

図 7

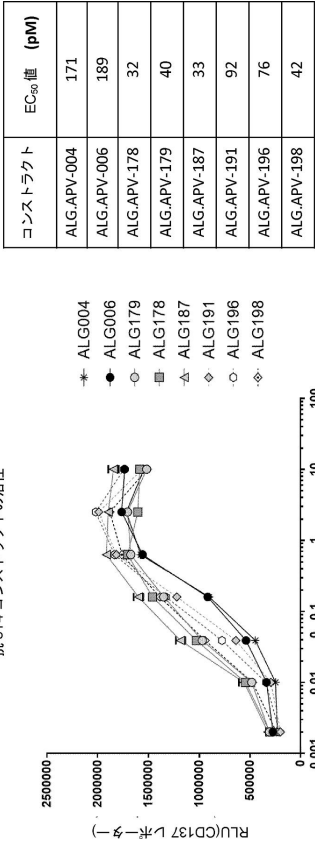
カニクイザル 5T4 発現 CHO-K1 細胞に対する抗 CD137×抗 5T4 二重
特異性コンストラクトの結合



【図 8】

図 8

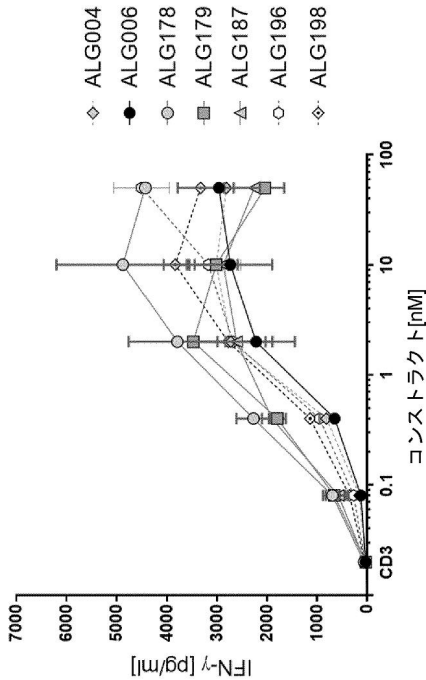
HCC1143 標的細胞を用いた CD137 レポーターアッセイにおける抗 CD137×
抗 5T4 コンストラクトの活性



【図 9】

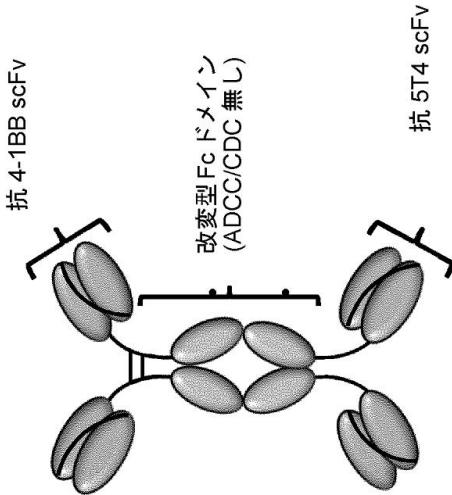
図 9

CHO-K1/ヒト細胞との PBMC の培養物中の抗 CD137×抗 5T4 二重特異性コンストラクトによっ
て誘導された IFN-γ 放出



【図 10】

図 10



10

20

30

40

50

【図 1 1】

図 1 1 B

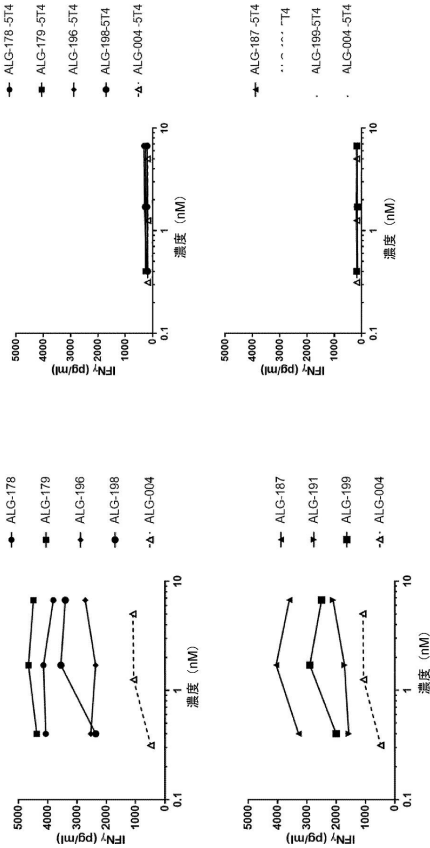
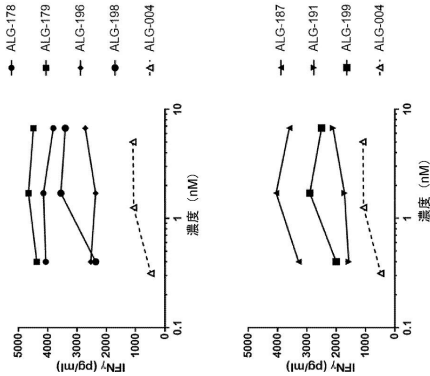


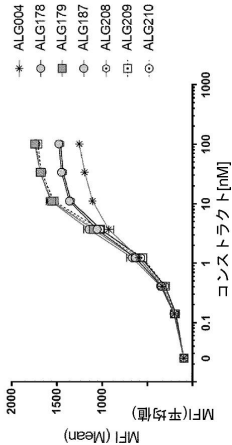
図 1 1 A



【図 1 3】

図 1 3

ヒト 5T4 発現 CT26 細胞に対する抗 CD137×抗 5T4 二重特異性コンストラクトの結合

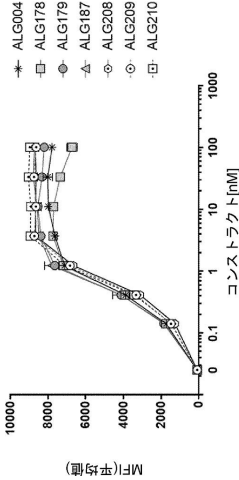


【図 1 2】

図 1 2

ヒト CD137 発現 CHO-K1 細胞に対する抗 CD137×抗 5T4 二重特異性コンストラクトの結合

コンストラクト	EC ₅₀ 値 (nM)	最大 MFI
ALG-APV-004	0.39	7785
ALG-APV-178	0.36	6722
ALG-APV-179	0.39	8207
ALG-APV-187	0.41	8718
ALG-APV-208	0.60	8667
ALG-APV-209	0.56	8630
ALG-APV-210	0.56	8972



【図 1 4】

図 1 4

カニキザル 5T4 発現 CHO-K1 細胞に対する抗 CD137×抗 5T4 二重特異性コンストラクトの結合

コンストラクト	EC ₅₀ 値 (nM)	最大 MFI
ALG-APV-004	6.5	26580
ALG-APV-178	9.5	26675
ALG-APV-179	10.1	26834
ALG-APV-187	8.5	25958
ALG-APV-208	7.4	24943
ALG-APV-209	8.9	25431
ALG-APV-210	7.2	23799

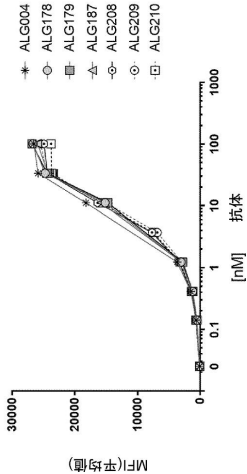


図 1 7

【図 1 7】
ヒト 5T4 発現 CHO-K1 細胞との PBMC の培養物中の抗 CD137×抗 5T4 二重特異性コンストラクトによって誘導された IFN γ 放出

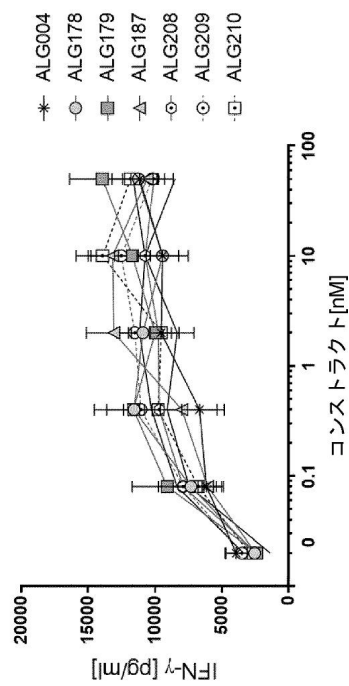


図 1 5

【図 1 5】
MOLM 13 に対する抗 CD137×抗 5T4 二重特異性コンストラクトの結合

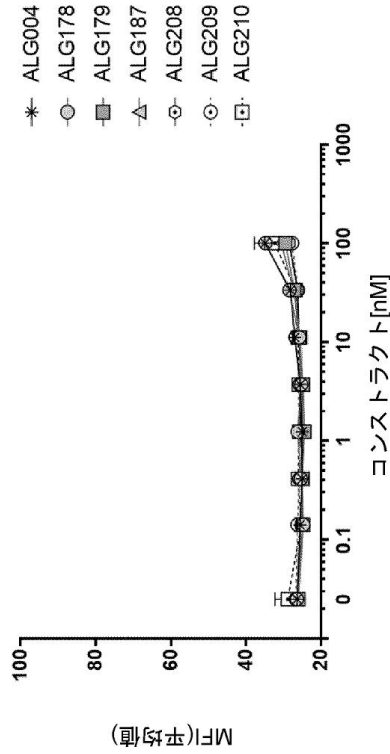


図 1 8 A

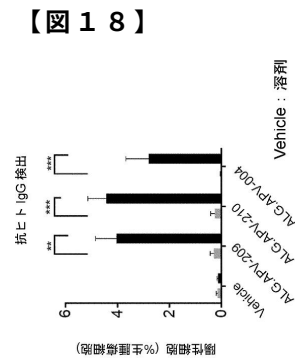


図 1 8 B

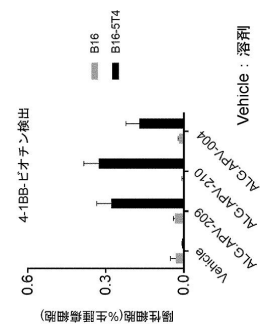


図 1 6 A

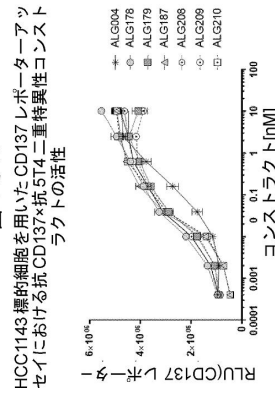
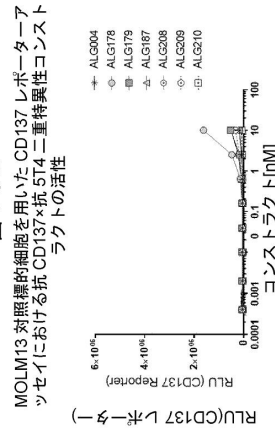


図 1 6 B



コンストラクト	EC ₅₀ 値 (nM)
ALG-APV-004	0.20
ALG-APV-178	0.03
ALG-APV-208	0.02
ALG-APV-179	0.03
ALG-APV-209	0.02
ALG-APV-187	0.03
ALG-APV-210	0.03

図 19 B

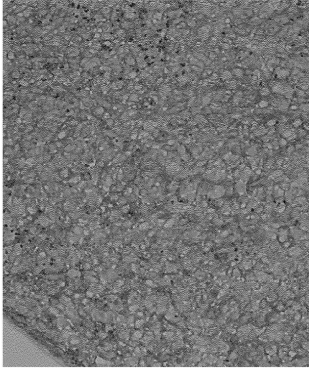
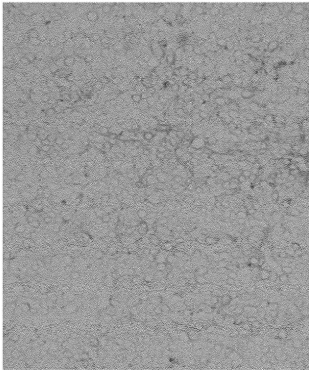


図 19 A



【図 21】

図 21 B

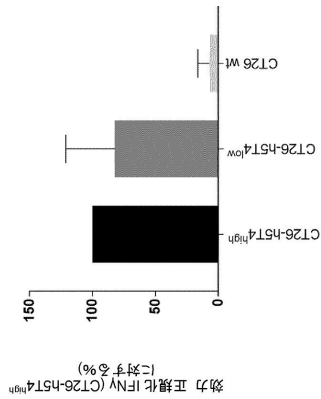
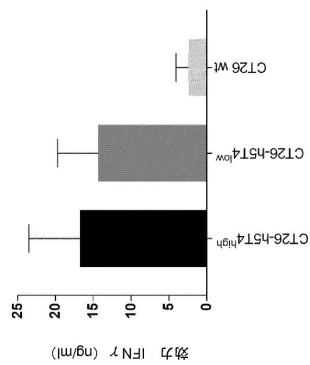
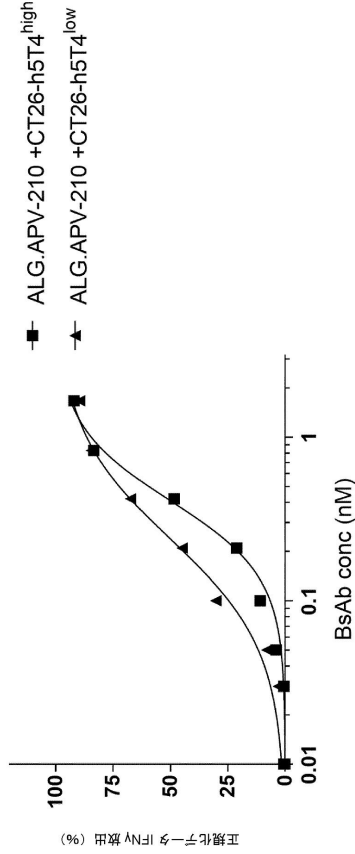


図 21 A



【図 20】

図 20



【図 22】

図 22 A

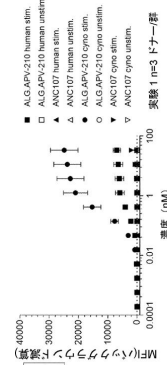


図 22 B

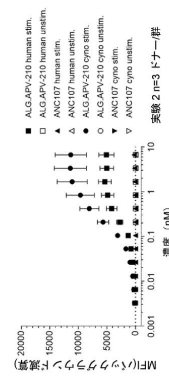
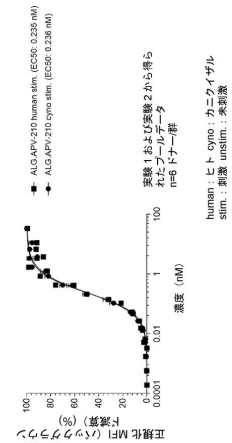
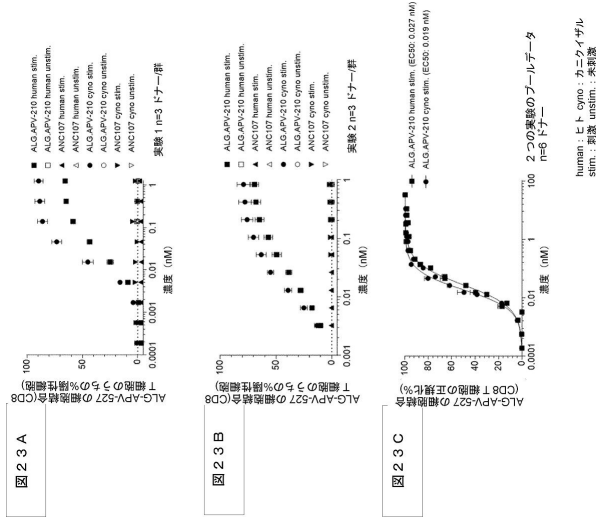


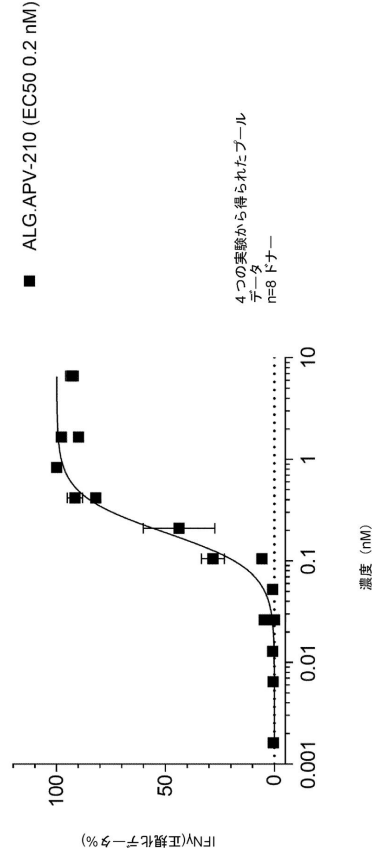
図 22 C



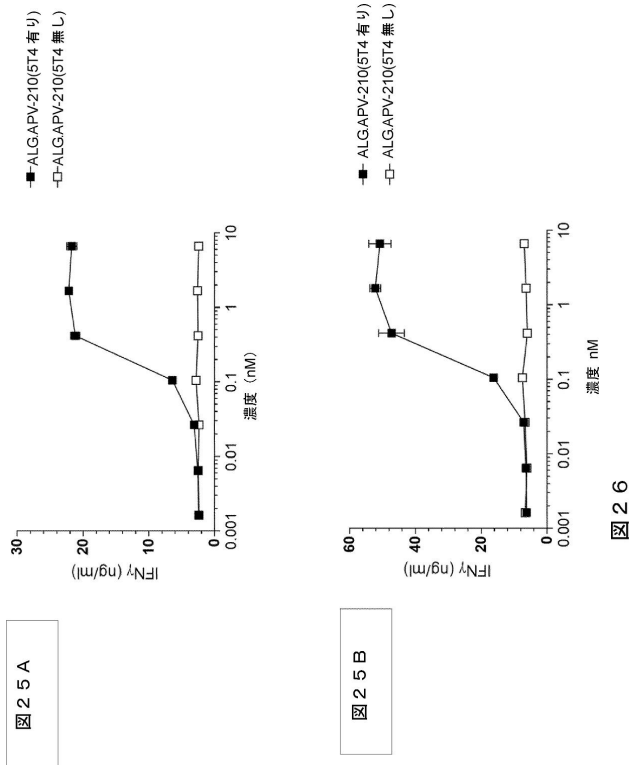
【図 2 3】



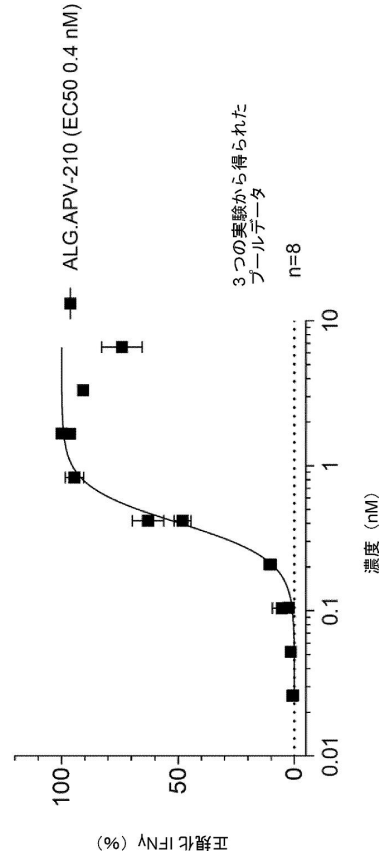
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



10

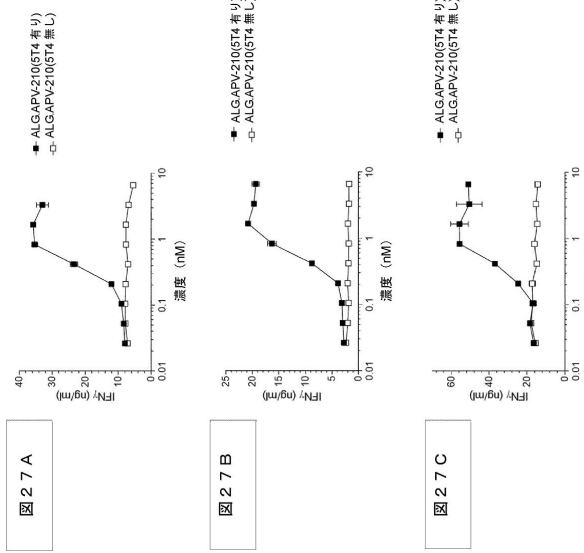
20

30

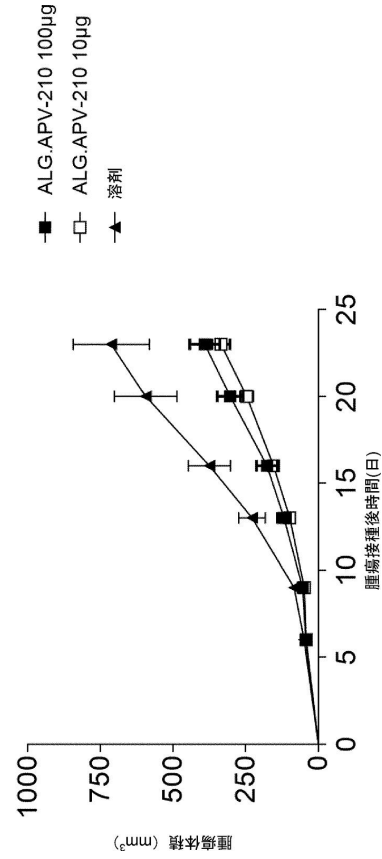
40

50

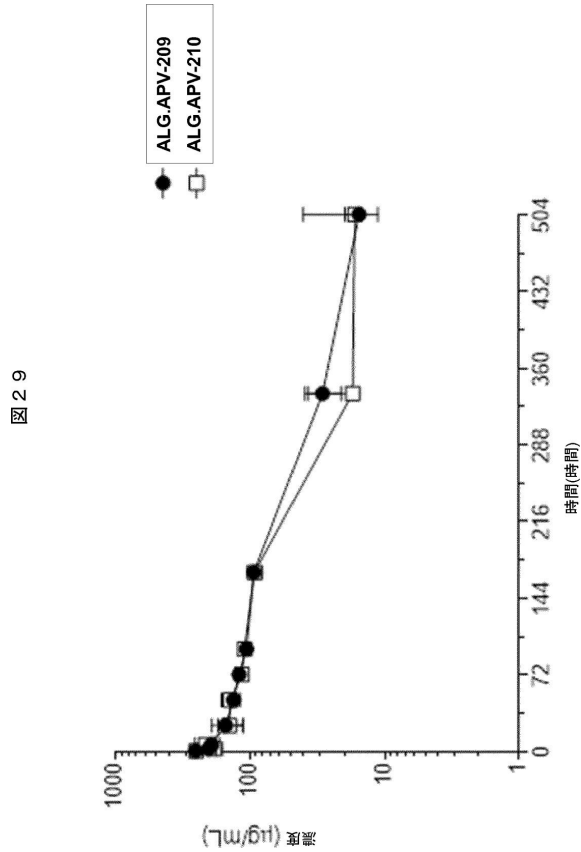
【図 27】



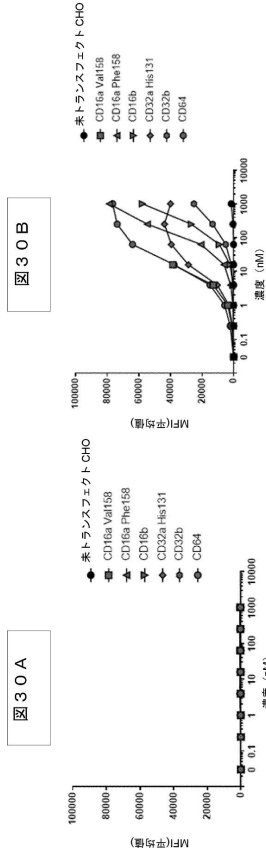
【図 28】



【図 29】



【図 30】



10

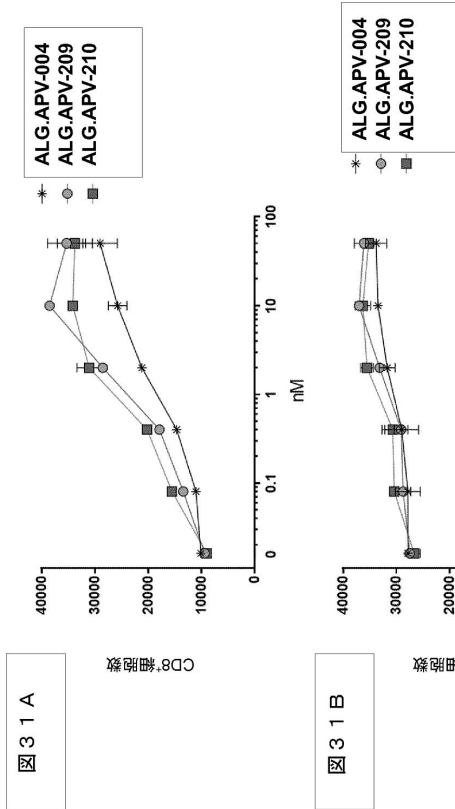
20

30

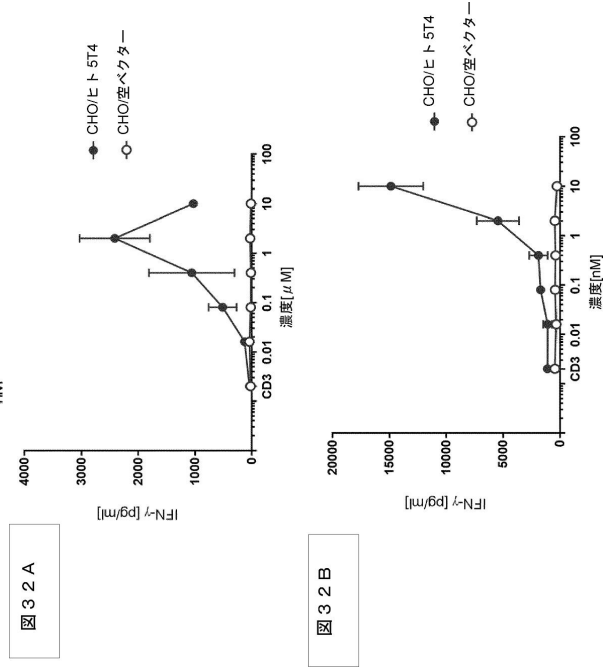
40

50

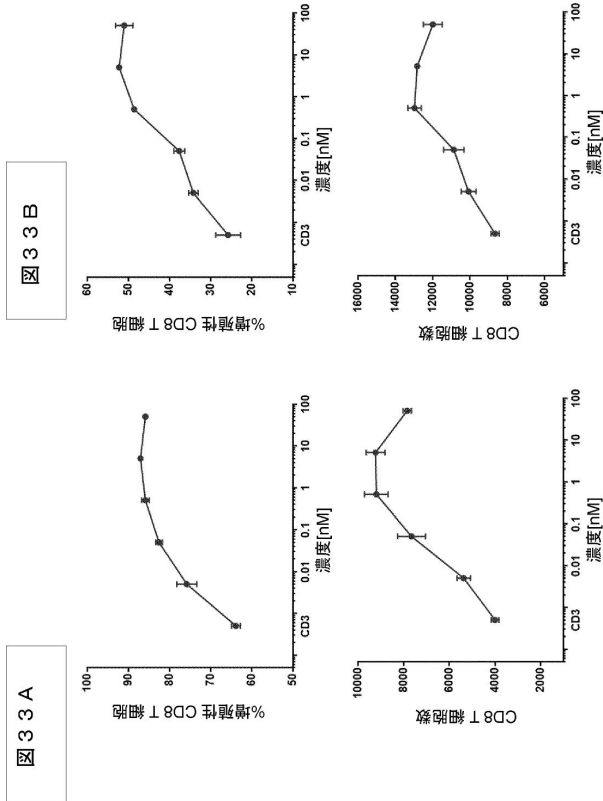
【図 3 1】



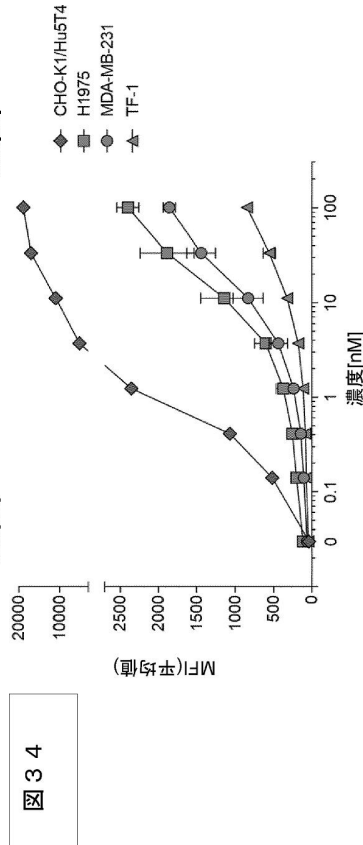
【図 3 2】



【図 3 3】



【図 3 4】



10

20

30

40

50

【図 3 5】

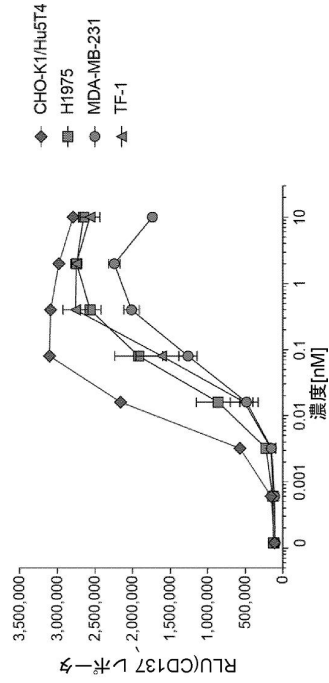


図 3 5

【図 3 6】

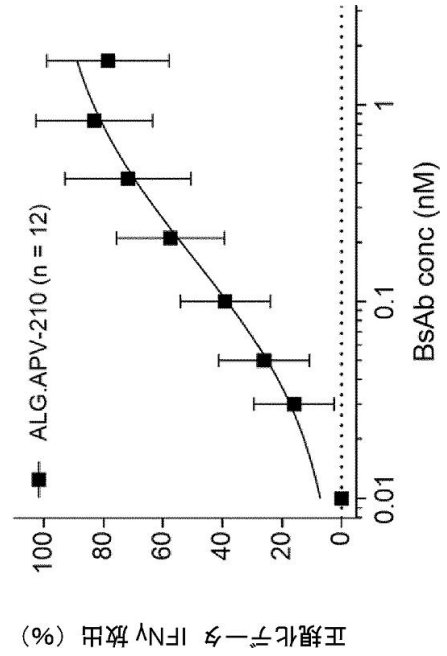


図 3 6

【図 3 7】

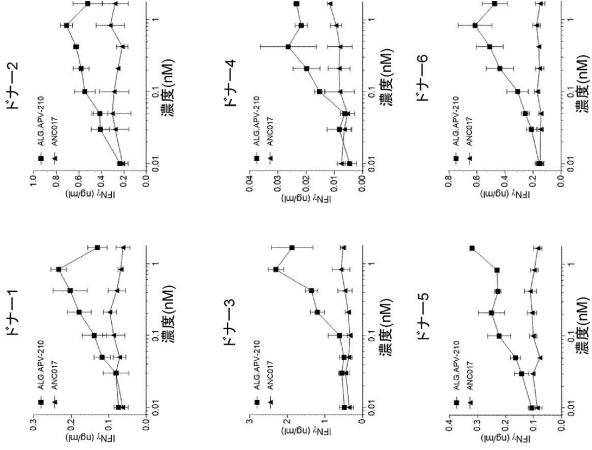


図 3 7

【図 3 8】

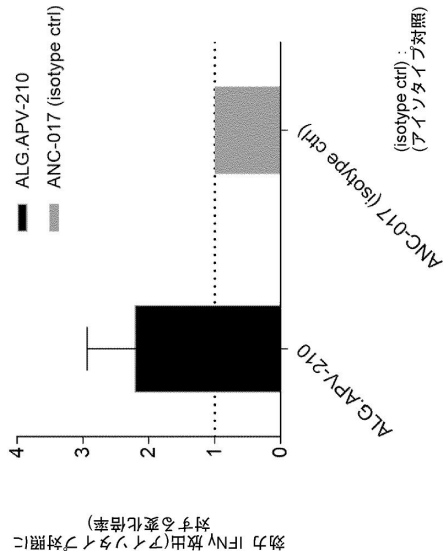


図 3 8

10

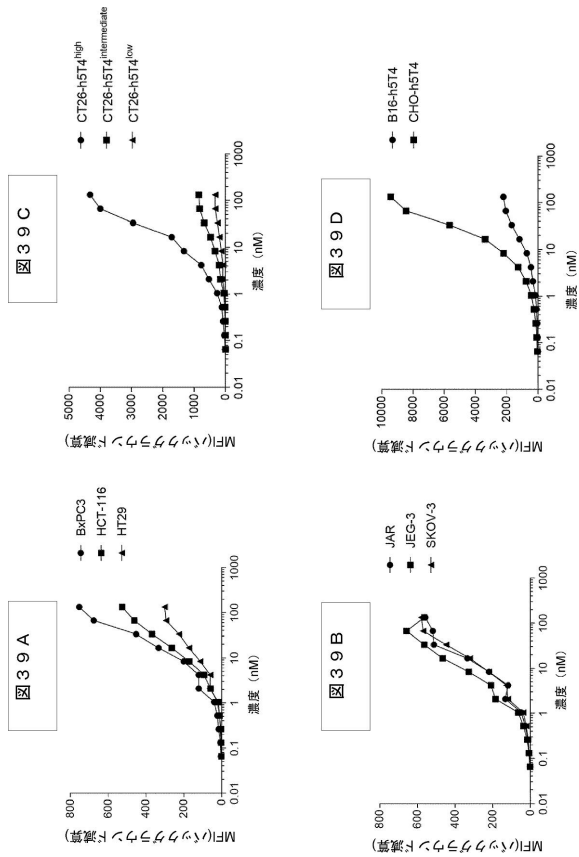
20

30

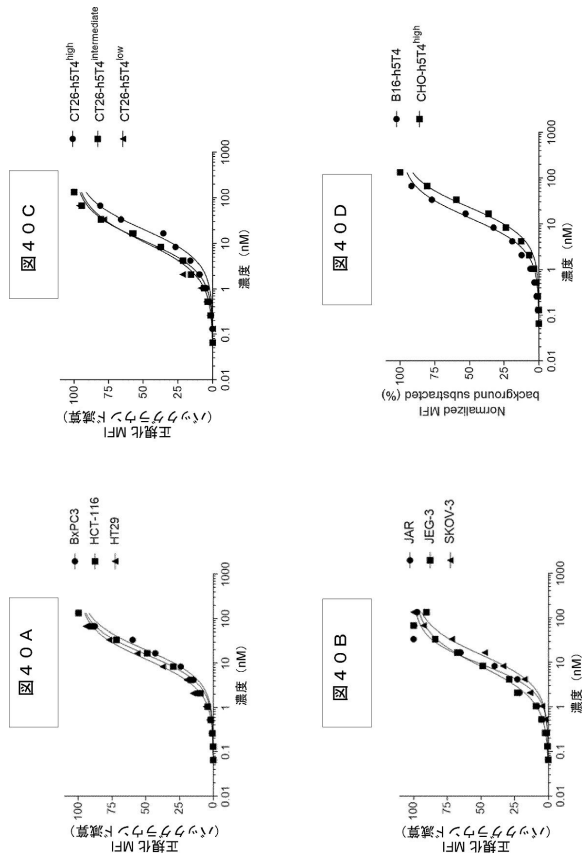
40

50

【図 39】



【図 40】



【配列表】

0007369113000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/30	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
			C 1 2 P	21/08	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/648,072

(32)優先日 平成30年3月26日(2018.3.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国 9 8 1 2 1 ワシントン州, シアトル, スイート 1 0 5 0, フォース アベニュー
2 4 0 1, アプティボ リサーチ アンド デベロップメント エルエルシー内

(72)発明者 ヘルナンデス・ホヨス, ガブリエラ

アメリカ合衆国 9 8 1 2 1 ワシントン州, シアトル, スイート 1 0 5 0, フォース アベニュー
2 4 0 1, アプティボ リサーチ アンド デベロップメント エルエルシー内

(72)発明者 ミッシャー, リンダ

アメリカ合衆国 9 8 1 2 1 ワシントン州, シアトル, スイート 1 0 5 0, フォース アベニュー
2 4 0 1, アプティボ リサーチ アンド デベロップメント エルエルシー内

(72)発明者 ミッシェル, ダニエル

アメリカ合衆国 9 8 1 2 1 ワシントン州, シアトル, スイート 1 0 5 0, フォース アベニュー
2 4 0 1, アプティボ リサーチ アンド デベロップメント エルエルシー内

(72)発明者 フリッツェル, サラ

スウェーデン国 2 2 3 6 3 ルンド, シュレヴェーゲン 2, メディコン ヴィレッジ アリゲー
ター バイオサイエンス アーバー内

(72)発明者 ヴァラス, ローラ

スウェーデン国 2 2 3 6 3 ルンド, シュレヴェーゲン 2, メディコン ヴィレッジ アリゲー
ター バイオサイエンス アーバー内

(72)発明者 エルマーク, ピーター

スウェーデン国 2 2 3 6 3 ルンド, シュレヴェーゲン 2, メディコン ヴィレッジ アリゲー
ター バイオサイエンス アーバー内

(72)発明者 サール, アンナ

スウェーデン国 2 2 3 6 3 ルンド, シュレヴェーゲン 2, メディコン ヴィレッジ アリゲー
ター バイオサイエンス アーバー内

(72)発明者 フェルブリング, クリスティーナ

スウェーデン国 2 2 3 6 3 ルンド, シュレヴェーゲン 2, メディコン ヴィレッジ アリゲー
ター バイオサイエンス アーバー内

(72)発明者 フォン シャンツ, ローラ

スウェーデン国 2 2 3 6 3 ルンド, シュレヴェーゲン 2, メディコン ヴィレッジ アリゲー
ター バイオサイエンス アーバー内

審査官 山▲崎▼ 真奈

(56)参考文献 米国特許出願公開第2007/0161080 (US, A1)

国際公開第2016/185016 (WO, A1)

特表2014-533929 (JP, A)

特表2009-539413 (JP, A)

国際公開第2017/182672 (WO, A1)

国際公開第2018/156740 (WO, A1)

HINNER, M. J. et al., Costimulatory T cell engagement via a novel bispecific anti-CD137 / anti-HER2 protein, Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2015年, 3(Suppl 2), P187

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N

C07K

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq