

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-508958

(P2025-508958A)

(43)公表日 令和7年4月10日(2025.4.10)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	Z N A 4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全75頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-552150(P2024-552150)	(71)出願人 524324147 クロスリンク セラピューティクス インク . アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 ケンブリッジ パール ストリ ート 2 4 4
(86)(22)出願日 令和5年3月1日(2023.3.1)	(74)代理人 100097456 弁理士 石川 徹
(85)翻訳文提出日 令和6年10月28日(2024.10.28)	(72)発明者 ロドルフォ ジェイ . チャパロ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9 ケンブリッジ パール ストリ ート 2 4 4 シー / オウ クロスリンク セラピューティクス インク .
(86)国際出願番号 PCT/US2023/014302	(72)発明者 ロナルド ディー . セイデル ザ サード アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
(87)国際公開番号 WO2023/167947	
(87)国際公開日 令和5年9月7日(2023.9.7)	
(31)優先権主張番号 63/315,529	
(32)優先日 令和4年3月1日(2022.3.1)	
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	
(31)優先権主張番号 63/330,120	
(32)優先日 令和4年4月12日(2022.4.12)	
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	
(31)優先権主張番号 63/353,896	

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗癌剤としての免疫細胞機能のA T P依存性アゴニスト

(57)【要約】

本開示は、ポリペプチドコンストラクトであって、十分なレベルのA T Pに曝露されて、その集合が二量体またはより高いレベルの複合体(例えば、三量体、四量体など)になる原因となる時、免疫細胞機能のアゴニストとして作用するポリペプチドコンストラクトを提供する。コンストラクトの複合体は、抗腫瘍免疫応答を促進するように機能する免疫細胞(例えば、細胞傷害性C D 8 + T細胞および/またはNK細胞)を刺激することができる。コンストラクトは、A T Pのレベルが上昇した固形腫瘍の治療のための抗癌剤/治療薬として用いられてもよい。

【選択図】図1

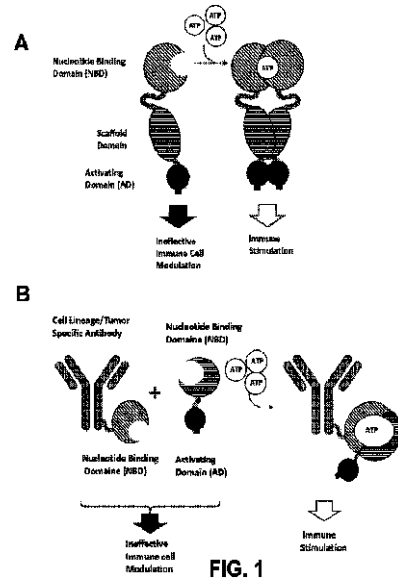


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

任意選択的にリンカーペプチド配列により結合される、ヌクレオチド結合ドメイン (NBD) アミノ酸 (aa) 配列、および腫瘍特異的結合剤 (TSB) アミノ酸配列を含むポリペプチドコンストラクトであって、該 NBD が、一つ以上のアデノシン三リン酸 (ATP) 結合部位を含み、ATP の存在下で同族の非同一の NBD (例えば、ヘテロ二量体化することができる TAP1 または TAP2 の NBD) とホモ二量体化またはヘテロ二量体化することができる、前記ポリペプチドコンストラクト。

【請求項 2】

スキャフォールドアミノ酸配列をさらに含む、請求項 1 に記載のポリペプチドコンストラクト。

10

【請求項 3】

前記第一のポリペプチドコンストラクトが、第一の NBD アミノ酸配列を含み、前記第二のポリペプチドコンストラクトが、第二の NBD アミノ酸配列を含み、該第一および第二の NBD アミノ酸配列が、ATP の存在下でホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成してヘテロ二量体複合体を形成し得る同族配列である、請求項 2 に記載の第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクトを含む組成物。

【請求項 4】

前記第一および第二のポリペプチドコンストラクトが、ホモ二量体を形成する、請求項 3 に記載の組成物。

20

【請求項 5】

前記第一のポリペプチドコンストラクトの前記 TSB および前記第二のポリペプチドコンストラクトの前記 TSB が、メソテリン、上皮細胞接着分子 (EpCAM)、細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (CTLA-4)、炭酸脱水酵素 IX (CAIX)、カドヘリン、癌胎児性抗原 (CEA)、細胞間葉上皮移行因子 (c-MET)、上皮成長因子受容体 (EGFR) ファミリーメンバー、エフリン A 型受容体 3 (EphA3)、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ (FAP)、葉酸結合タンパク質、葉酸受容体アルファ (FR-アルファ)、Erb-B2 受容体チロシンキナーゼ 2 (HER2)、Erb-B2 受容体チロシンキナーゼ 3 (HER3)、インスリン様成長因子 1 受容体 (IGF-1R)、インテグリン V₃、インテグリン 5₁、溶質キャリアファミリー 39 メンバー 6 (Liv1)、黒色腫関連抗原ファミリー A メンバー (MAGEA)、黒色腫関連抗原ファミリー C メンバー (MAGEC)、ムチン (例えば、MUC1)、ニューヨーク食道扁平上皮細胞癌 1 タンパク質 (NY-ESO-1、癌/精巣抗原 1A、癌/精巣抗原 1B)、癌/精巣抗原 2 (NY-ESO-2、CTAG2)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、核因子カッパ B リガンドの受容体活性化因子 (RANKL)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体 1 (ROR1)、テネイシン、TNF 受容体スーパーファミリーメンバー 10a (TRAILR1)、TNF 受容体スーパーファミリーメンバー 10b (TRAILR2)、および血管内皮成長因子受容体 (VEGFR) からなる群からの単一の腫瘍関連抗原 (TAA) を認識する (に結合される)、請求項 4 に記載の組成物。

30

【請求項 6】

各スキャフォールドが、免疫グロブリンポリペプチド配列を含む、請求項 5 に記載の組成物。

40

【請求項 7】

各スキャフォールドが、IgFc アミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

各スキャフォールドが、独立して選択される非二量体化 IgFc を含む、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記免疫グロブリンFc (IgFc) ポリペプチドアミノ酸配列が、抗体関連エフェクター機能を誘導し得るか、または該 IgFc ポリペプチドアミノ酸配列が、ADCC、A

50

D C P、および C D C から選択される少なくとも一つの抗体関連エフェクター機能を強化する一つ以上の置換を含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

各 N B D が、A T P 結合カセット (A B C) トランスポーターの N B D である、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記 N B D が、T A P 1 N B D を含む、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記 T A P 1 N B D が、配列番号 10、87、もしくは 88 のうちのいずれか一つの配列、またはそれらの配列のうちのいずれか一つと 90% 超もしくは 95% 超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 11 に記載の組成物。

10

【請求項 13】

任意選択的にリンカーペプチド配列によって結合されたヌクレオチド結合ドメイン (N B D) アミノ酸 (a a) 配列、および活性化ドメイン (A D) アミノ酸配列を含むポリペプチドコンストラクトであって、該 N B D が、一つ以上のアデノシン三リン酸 (A T P) 結合部位を含み、A T P の存在下で同族の非同一の N B D とホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成のいずれかを行うことができる、前記ポリペプチドコンストラクト。

【請求項 14】

スキャフォールドアミノ酸配列をさらに含む、請求項 13 に記載のポリペプチドコンストラクト。

20

【請求項 15】

前記 A D が、

(i) I L - 7、I L - 15、I L - 12、またはそのサブユニットと、

(i i) P D 1、C D 40、4 - 1 B B、I L - 10 R、C T L A - 4、または C D 28 のうち一つに結合されるアミノ酸配列を含む、請求項 13 に記載のポリペプチドコンストラクト。

【請求項 16】

請求項 13 ~ 15 のいずれかに記載の第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクトを含む組成物であって、

前記第一のポリペプチドコンストラクトが、第一の N B D アミノ酸配列を含み、前記第二のポリペプチドコンストラクトが、第二の N B D アミノ酸配列を含み、該第一および第二の N B D アミノ酸配列が、ヘテロ二量体形成し得る同族配列であり、

30

該第一のポリペプチドコンストラクトが、前記 I L - 12 の p 40 サブユニットを含み、該第二のポリペプチドコンストラクトが、該 I L - 12 の p 35 サブユニットを含む、前記組成物。

【請求項 17】

前記第一の N B D が、T A P 1 N B D アミノ酸配列を含み、前記第二の N B D が、T A P 2 N B D アミノ酸配列を含む、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

任意選択的にリンカーペプチド配列により結合されるヌクレオチド結合ドメイン (N B D) アミノ酸 (a a) 配列、および免疫細胞エンゲージャー (I C E) アミノ酸配列を含むポリペプチドコンストラクトであって、該 N B D が、一つ以上のアデノシン三リン酸 (A T P) 結合部位を含み、A T P の存在下で同族の非同一の N B D (例えば、ヘテロ二量体化することができる T A P 1 または T A P 2 の N B D) とヘテロ二量体化することができる、前記ポリペプチドコンストラクト。

40

【請求項 19】

スキャフォールドアミノ酸配列をさらに含む、請求項 18 に記載のポリペプチドコンストラクト。

【請求項 20】

請求項 1 または 2 に記載の第一のポリペプチドコンストラクトと、請求項 18 または 1

50

9に記載の第二のポリペプチドコンストラクトとを含む組成物であって、

(i) 前記第一のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上の第一のヘテロ二量体形成 N B D アミノ酸配列を含み、前記第二のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上の第二のヘテロ二量体形成 N B D アミノ酸配列を含み、

(i i) 該一つ以上の第一のヘテロ二量体形成 N B D アミノ酸配列の各々が、該一つ以上の第二のヘテロ二量体形成 N B D アミノ酸配列の同族結合パートナーであり、

(i i i) 該第一のポリペプチドコンストラクトおよび該第二のポリペプチドコンストラクトが、A T P の存在下で、該一つ以上の第一のヘテロ二量体形成 N B D アミノ酸配列のうち少なくとも一つと該一つ以上の第二のヘテロ二量体形成 N B D 配列のうち少なくとも一つとの間の相互作用を介して互いに結合して、前記第一および第二のポリペプチド
10
コンストラクトのヘテロ二量体またはより高次の複合体を形成し、

(i v) 該第一のポリペプチドコンストラクトの前記 T S B が、メソテリン、上皮細胞接着分子 (E p C A M)、細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A - 4)、炭酸脱水酵素 I X (C A I X)、カドヘリン、癌胎児性抗原 (C E A)、細胞間葉上皮移行因子 (c - M E T)、上皮成長因子受容体 (E G F R) ファミリーメンバー、エフリン A 型受容体 3 (E p h A 3)、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ (F A P)、葉酸結合タンパク質、葉酸受容体アルファ (F R - アルファ)、E r b - B 2 受容体チロシンキナーゼ 2 (H E R 2)、E r b - B 2 受容体チロシンキナーゼ 3 (H E R 3)、インスリン様成長因子 1 受容体 (I G F - 1 R)、インテグリン V 3、インテグリン 5 1、溶質キャリアファミリー 3 9 メンバー 6 (L i v 1)、黒色腫関連抗原ファミリー A メン
20
バー (M A G E A)、黒色腫関連抗原ファミリー C メンバー (M A G E C)、ムチン (例えば、M U C 1)、ニューヨーク食道扁平上皮細胞癌 1 タンパク質 (N Y - E S O - 1、癌 / 精巣抗原 1 A、癌 / 精巣抗原 1 B)、癌 / 精巣抗原 2 (N Y - E S O - 2、C T A G 2)、前立腺特異的膜抗原 (P S M A)、核因子カッパ B リガンドの受容体活性化因子 (R A N K L)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体 1 (R O R 1)、テネイシン、T N F 受容体スーパーファミリーメンバー 1 0 a (T R A I L R 1)、T N F 受容体スーパーファミリーメンバー 1 0 b (T R A I L R 2)、および血管内皮成長因子受容体 (V E G F R) からなる群からの腫瘍関連抗原に結合し、

(v) 該第二のポリペプチドコンストラクトの前記 I C E が、C D 3、C D 4、C D 8、
30
T C R、C D 2、T C R 鎖、T C R 鎖、T C R、T C R 鎖、T C R 鎖、T R G V 9、C D 8 4、C X C R 1、C D 1 3、C D 3 3、C D 3 4、および C D 1 6 からなる群より選択されるタンパク質に対して親和性を有する、F a b、F a b '、s c F v、アプタマー、またはナノボディを含む、組成物。

【請求項 2 1】

態様 1 ~ 2 0 のいずれか一つに記載のコンストラクトまたは組成物を患者または対象に投与することを含む、癌を治療する方法。

【請求項 2 2】

癌の治療のための医薬の調製のための態様 1 ~ 2 0 のいずれかに記載のコンストラクトまたは組成物の使用。

【請求項 2 3】

癌の治療のための態様 1 ~ 2 0 のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。
40

【請求項 2 4】

前記癌が固形腫瘍を含む、請求項 2 1 ~ 2 3 に記載の方法、使用、コンストラクト、または組成物。

【請求項 2 5】

前記癌が、中皮腫、黒色腫、肉腫、癌、癌肉腫、リンパ腫、または生殖細胞腫瘍である、請求項 2 4 に記載の方法、使用、コンストラクト、または組成物。

【請求項 2 6】

態様 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の組成物の一つ以上のコンストラクト、または一つ以上
50

のコンストラクトをコードする配列を含む、核酸。

【請求項 27】

任意選択的に、プロモーター（例えば、構成的プロモーター）または誘導性プロモーターの制御下にある、請求項 26 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 28】

請求項 26 または 27 に記載のベクターまたは核酸を含む、細胞。

【請求項 29】

前記細胞が、哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または細菌細胞である、請求項 28 に記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2022年3月1日出願された米国仮特許出願第63/315,529号、2022年4月12日出願された米国仮特許出願第63/330,120号、および2022年6月21日出願された米国仮特許出願第63/353,896号の利益を主張する。

（配列表の組み込み）

2023年3月1日に作製され、37 CFR 1.822~1.824に従って作成され、本出願の出願と同時に提出された、205,746バイトを有し、2974-3_PCT_ST26.xmlと題するST.26 XML形式の配列表は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

（序論）

強力な抗癌療法は、理想的な治療用量をはるかに下回る用量で現れる毒性全身作用のため、制限されたままである。サイトカインおよび抗T細胞受容体抗体などの免疫作動薬は、全身的に送達された場合に特に毒性があり、サイトカイン放出症候群および死などの重篤な有害事象につながる可能性がある。全身用量/毒性（すなわち、「治療指数」と比較して、腫瘍における免疫療法剤の有効用量を増加させる戦略には、腫瘍内投与、および腫瘍関連抗原（「TAA」）に対する抗体との連結を介した免疫療法の標的化が含まれる。しかしながら、腫瘍内送達は、オーダーメイドかつ侵襲的であり、したがって、その関連する外科的および物流的複雑さに起因して、大きな患者集団に到達する能力が制限されている。TAAを標的とする新しい薬剤は、免疫作動薬に一定のレベルの条件を付与することを試み、作動薬は、十分な密度の標的TAAを有する部位でのみ生物学的に有効な濃度に蓄積する。TAA標的免疫アゴニストは、免疫療法薬によってアクセス可能な細胞表面上に発現するユニークでかつ検証済みのTAAの数が少ないこと、TAA密度が低いこと、TAAの発現が失われることに起因する癌の回避、真に腫瘍特異的でないTAAによる、on-target/off-tumor毒性、および各TAAが、全身療法と比較して、各TAAがそれぞれ異なる治療的到達範囲の低い薬剤を必要とするという事実を含むが、これらに限定されない、深刻な制限に悩まされている。

【0003】

免疫アゴニズムおよび/またはTAA結合の化学量論を増加させることも、TAA標的免疫療法の効力を強化する手段として探索されている。例えば、ブリナツモマブなどの第一世代二重特異性T細胞エンゲージャーは、1:1の化学量論のために、単一の抗CD3ドメインと対になった単一の抗TAAドメインを含む。しかしながら、二重特異性T細胞エンゲージャーAFM11の場合、代わりに抗TAA:抗CD3化学量論2:2を使用した。この形式は、インビトロでのより強力なT細胞媒介性の腫瘍細胞殺傷と関連し、重要なことに、腫瘍細胞殺傷に必要な細胞傷害性エフェクターT細胞の数を減少させた。しかしながら、その後のAFM11の臨床試験では、研究の終了を余儀なくされる重度の毒性が明らかになった。抗体様分子のFcドメインにおける概念的に類似した化学量論的増加は、インビトロでの効力においても同様の増加を示した。そのような化学量論的修飾は、

10

20

30

40

50

T A Aにおける結合活性の強化と免疫受容体の結合を介して作用する可能性が高い。さらに、Fc受容体またはT細胞受容体などの免疫受容体の架橋は、これらの受容体およびシグナル伝達経路を介したシグナル伝達を増幅し、より強力な免疫応答をもたらすことが知られている。したがって、免疫受容体を、化学量論的に強化された免疫療法と結合させることによって、エフェクターT細胞と抗原密度の要件を緩和させるなど、より強力な腫瘍の標的化が可能になる可能性がある。しかしながら、これらの強化された免疫療法は、安全性の懸念のために臨床応用が困難であった。

【0004】

標的免疫療法は、大部分/すべての腫瘍に一般化可能であり、腫瘍生存に重要であり、正常組織に対して高度に発現する腫瘍特性を利用することによって、現在の免疫療法の前述の欠点を回避することができる。腫瘍微小環境(TME)は、血管系、免疫細胞および支持細胞、細胞外マトリクス、ならびに腫瘍の周囲の局所分子を含む。TMEは、低いpH、高い細胞外アデノシン三リン酸(ATP)含有量、制限された酸素レベル(低酸素症)、漏れやすい血管系、および腫瘍プロテアーゼ(例えば、MMP)の存在などの、多くの異なる腫瘍型に共通する特徴を有している。これらの特徴の中でも、細胞外ATPは、すべての腫瘍とは限らないが、そのほとんどに共通する、変化した必須の腫瘍代謝プログラムの産物であるため、新規のクラスの免疫治療薬の生成に利用できる優れた候補である。細胞外ATPはまた、正常組織(約0.1 μM未満)と比較して、TME(50~1000 μM)において非常に高いレベルで観察される。

【発明の概要】

【0005】

本開示は、腫瘍における強力な癌治療薬の条件付き(ATP依存性)アセンブリのトリガーとしての腫瘍ATPの使用を可能にするヌクレオチド結合ドメイン(NBD)含有分子コンストラクトを含み、それを提供する。NBD含有コンストラクトは、TMEに見られるATPレベルの存在下で二量体またはより高次の複合体を形成する。NBD含有コンストラクトは、とりわけ、様々な癌を治療するための治療薬としての使用を見出す。コンストラクトを用いる治療法は、ATP駆動複合体化(例えば、二量体化)が、免疫細胞をTMEに動員し、かつ/またはTME中の免疫細胞を刺激する薬剤をもたらし得るという事実を利用するように設計される。刺激は、例えば、コンストラクトのATP駆動複合体化の結果として免疫細胞に提示される免疫調節タンパク質ドメインを多量体化し、例えば、受容体の架橋を引き起こすことができない単一の免疫調節タンパク質配列よりも効果的な免疫細胞の刺激を生成することによって行われてもよい。NBD含有コンストラクトの二量体またはその他のより高次の複合体はまた、腫瘍細胞の標的ADCC(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害)および/またはCDC(補体依存性細胞傷害)を含む他の機構を介して作用する。周囲の組織に対するATPレベルの上昇は、TMEにおいてほぼ普遍的であるため、コンストラクトは、多様な腫瘍タイプを治療するための機構を提供する。さらに、二量体へのアセンブリを受けていない個々のコンストラクトまたは高次コンストラクトは、免疫刺激をもたらす能力が限定的であるか、または有しないため、二量体形成または複合体形成をもたらすことができるTMEにおけるATPレベルの上昇は、ATPがより低濃度である非腫瘍組織においてより小さな効果で強力な局所刺激をもたらすことができる。したがって、TMEに見られるATPレベルの存在下で免疫調節アミノ酸配列を多価状態に組み立てることができるコンストラクトを使用して、TMEにおける免疫細胞作用を調節し、選択的な免疫媒介性抗腫瘍作用をもたらし得る。

【0006】

NBD含有コンストラクトはまた、トランス標的化およびシス標的化を含むいくつかの他の利点を提供する。NBD含有コンストラクトによるシス標的化は、腫瘍浸潤性白血球の刺激をもたらす(例えば、IL-2またはCD28などの免疫刺激作用薬を提供することによって)、抗腫瘍免疫応答の増幅をもたらすことができる。TAAに対してトランス標的化されたとき、コンストラクトは、TAAを担持する腫瘍細胞の免疫媒介性細胞溶解をもたらす、これはATPレベルの局所的な上昇から生じるものを超える追加の腫瘍特異

的作用を追加する。用いられる標的化スキーム（例えば、シス標的化またはトランス標的化）に関わらず、コンストラクトは、例えば、CD40L、CD28、IFN-g、IL-12などに由来する多様な免疫調節因子ドメインの使用を可能にし、その各々は、架橋を必要とする受容体を介して作用する。本明細書に記載のNBD含有コンストラクトの他の利点としては、それらが二量体またはより高次の複合体に組み立てられるサイズの増加に起因して、腫瘍組織への浸透を可能にする比較的小さなサイズ、およびTMEからの拡散の低減が挙げられる。

【0007】

コンストラクトを説明することに加えて、本開示はまた、それらの調製の方法およびそれらの使用方法を提供する。

10

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、Aにおいて、ATP結合部位を有するNBD、リンカー配列によって結合されたスキャフォールドドメイン（スキャフォールドアミノ酸配列）、および免疫細胞活性化ドメイン（AD）を含む、本開示のコンストラクトの図を提供する。Aの図の右側はまた、結合部位が実質的に占有されるのに十分なATP濃度（例えば、NBDに結合するATPのKdの範囲の濃度またはより高い濃度）の存在下でのコンストラクトの二量体化を示す。Bで、図1は、(i)リンカーによって結合されたヘテロ二量体形成NBDペアの腫瘍特異的結合剤（二価細胞系統または腫瘍特異的抗体として例示されるが、scFvまたはナノボディなどの一価結合剤であってもよい）および第一のNBDを含む第一のコンストラクトと、(ii)リンカーによって結合されたヘテロ二量体形成NBDペアの第二のNBDを含む第二のコンストラクトとを提供する。Bの図の右側は、ATPの存在下でのNBDドメインの二量体化による第一および第二のコンストラクトのヘテロ二量体の形成を示す。

20

【0009】

【図2】図2は、非二量体化であってもよく、または相互特異的であってもよいスキャフォールド配列も含む構造C、D、およびEのコンストラクトを有する、NBDおよびADを含む一連のコンストラクト（構造A～E）を提供する。各コンストラクトの要素は、独立して選択される任意のリンカーによって結合される。本図はまた、ATPの存在下でのコンストラクトの二量体の形成を示す。

30

【0010】

【図3】図3は、一連のコンストラクトペア（構造A～O）を提供する。A～Iでは、各ペアの第一のコンストラクトは、一つまたは複数のNBDと、TAAに結合する腫瘍特異的結合剤とを含み、ペアの第二のコンストラクトは、NBDおよびADおよび/または一価免疫細胞エンゲージャーを含む。J～Mでは、各ペアの第一のコンストラクトは、一つまたは複数のNBDおよび免疫細胞エンゲージャーを含み、ペアの第二のコンストラクトは、NBDおよびADを含む。コンストラクト対E～I、L、およびMの各々は、コンストラクトのうち少なくとも一つにスキャフォールドを有する。NおよびOでは、各ペアの第一のコンストラクトは、腫瘍特異的結合剤および二つのNBDを含み、ペアの第二のコンストラクトは、NBDおよびADを含む。Oのコンストラクトはまた、スキャフォールド配列を含む。図3はまた、ATPの存在下でのコンストラクトの二量体の形成を示す。各コンストラクトの要素は、独立して選択される任意のリンカーによって結合される。

40

【0011】

【図4A】図4Aは、二つ以上のNBDを含み、ATPの存在下（例えば、TME中）で重合して複合体を形成することができる、一連のコンストラクト（A、C、およびDを参照）、コンストラクトの対（B、E、F、G、およびI）、またはコンストラクトの三つ組（H）を提供する。一部の例では、コンストラクトのうちの一つ以上は、スキャフォールド配列を含み、各コンストラクトは、独立して選択される任意のリンカーによって結合され得る。図はまた、各事例に存在するコンストラクトを含むATPの存在下での複合体の形成を示す。

50

【 0 0 1 2 】

【図 4 B】図 4 B は、腫瘍環境中に見られるような ATP の上昇の存在下でホモ二量体を形成する腫瘍特異的結合剤（例えば、抗メソテリアンなどの抗体）に結合された NBD の例を示す。（A）では、コンストラクトは、単一特異性または二重特異性であってもよく、したがって ATP の存在下で四量体または四量体様複合体を生じさせる二価抗体を含む。分子は、Fc ドメインを含む必要はなく、二つの抗原結合ドメイン（例えば、VHH または scFV 腫瘍特異的抗原結合剤）を有してもよく、依然として二価のままである。（B）、（C）、および（D）において、ホモ二量体形成コンストラクトは、NBD 一価単鎖抗体を含む。（A）～（D）における腫瘍特異的結合剤は、例えば、抗HER2、抗メソテリン、抗EpCAM、抗CLA-4、または抗PSMAであってもよい。スキャフォールド配列が存在する場合、それらは、FcRI、FcRII、FcRIII 受容体、および/または C1q タンパク質のうちのいずれか一つ以上に結合することができる免疫グロブリンFcペプチド（IgG1 Fc など）であってもよい。これらのタンパク質のうちの一つ以上に結合することができる複合体は、腫瘍特異的結合剤成分が結合し得る標的（例えば、抗原）を発現する細胞に対して指向される抗体依存細胞性細胞毒素（ADCC）、抗体依存性細胞貪食（ADCP）、および/または補体依存性細胞傷害（CDC）などの抗体依存性機能をもたらすことができる。したがって、かかる抗体機能は、腫瘍細胞を除去するために治療的に使用され得る。

10

【 0 0 1 3 】

【図 5】図 5 は、二つの ATP 分子を含む、抗原プロセシング 1（TAP1）NBD に関連するトランスポーターの二量体を示す。

20

【 0 0 1 4 】

【図 6】図 6 は、野生型 TAP1（配列番号 9）、UniProtKB - O95477 由来の ABCA1 遺伝子産物（配列番号 1）、UniProtKB - P08183 由来の ABCB1 遺伝子産物（配列番号 2）、UniProtKB - P33527 由来の ABCC1 遺伝子産物（配列番号 3）、UniProtKB / Swiss - Prot : P33897（配列番号 4）由来の ABCD1 遺伝子産物、UniProtKB / Swiss - Prot : P61221（配列番号 5）由来の ABCE1 遺伝子産物、UniProtKB - Q8NE71 由来の ABCF1 遺伝子産物（配列番号 6）、および UniProtKB / Swiss - Prot : P45844（配列番号 7）由来の ABCG2 遺伝子産物の NBD ドメインのアライメントを示す。TAP1 アミノ酸配列のアミノ酸 46～55 の Walker A 領域配列およびアミノ酸 152～156 の LSGGQ 配列の一部は、下線付き太字である。図 3 に示される TAP1 NBD の加水分解酸性アミノ酸（すなわち、177 位の Asp）および Asp（D）または Glu（E）残基が示されている。

30

【 0 0 1 5 】

【図 7】図 7 は、UniProtKB - Q03519（配列番号 11）由来のヒト TAP2 の配列を示す。

【 0 0 1 6 】

【図 8】図 8 は、N676G、S677N、Q680R、E682Q、および/または Q683R 置換を有する TAP1 バリエーションの SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）ゲルを示す。左から右に、レーンは、分子量マーカー（M）、還元試料（R）、空のレーン、および非還元試料（NR）である。

40

【 0 0 1 7 】

【図 9】図 9 は、配列中に存在するシステインの N676G、S677N、Q680R、E682Q、および/または Q683R 置換および置換を有する TAP1 NBD バリエーションポリペプチドのサイズ排除クロマトグラムを示し、（i）1mM のアデノシン二リン酸（ADP）の存在下で、ポリペプチドの単量体形態（見かけの Mw 37kDa）をもたらす、および（ii）1mM のアデノシン三リン酸（ATP）の存在下で、ポリペプチドの二量体形態（見かけの Mw 57kDa）をもたらす。

【 0 0 1 8 】

50

【図10】図10は、図9のクロマトグラフに供した同じTAP1 NBD変異体の分子量光度測定評価の結果を示す。1 mMのATPの存在下で得られた結果は、TAP1 NBDバリエーションの二量体化を示す。

【0019】

【図11】図11は、(A)ADPまたは(B)ATPの存在下でのTAP1の動的光散乱(DLS)サイズ決定の結果を提供する。

【0020】

【図12】図12は、ADPおよびATPの存在下での精製タンパク質のホモ二量体化およびクロマトグラフィ分析のために修飾された配列番号87の精製TAP1 NBDのクーマシーブルー染色ゲルを提供する。

10

【0021】

【図13】図13は、(A)配列番号87および配列番号88によって提供されるTAP1 NBDポリペプチドの誘導発現、および(B)配列番号88のポリペプチドの精製のSDS-PAGEゲルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

A. 定義

本明細書で使用される場合、アミノ酸(単数形「aa」または複数形「aas」)は、哺乳類細胞翻訳においてポリペプチドおよびタンパク質に組み込まれた天然起源のタンパク質原性アミノ酸を意味する。別段の記載がない限り、以下のとおりである。L(Leu、ロイシン)、A(Ala、アラニン)、G(Gly、グリシン)、S(Ser、セリン)、V(Val、バリン)、F(Phe、フェニルアラニン)、Y(Tyr、チロシン)、H(His、ヒスチジン)、R(Arg、アルギニン)、N(Asn、アスパラギン)、E(Glu、グルタミン酸)、D(Asp、アスパラギン)、C(Cys、システイン)、Q(Gln、グルタミン)、I(Ile、イソロイシン)、M(Met、メチオニン)、P(Pro、プロリン)、T(Thr、トレオニン)、K(Lys、リジン)、およびW(Trp、トリプトファン)。アミノ酸はまた、哺乳類細胞に見られる一部のタンパク質に存在するアミノ酸であるヒドロキシプロリンおよびセレノシステインを含むが、それらの存在が明示的に示されていない限り、それらが含まれるとは理解されない。

20

【0023】

配列中の特定の位置でのアミノ酸の置換は、単一文字コードまたは三文字コードで与えられる元のアミノ酸、そのアミノ酸の数値位置、および単一文字コードまたは三文字コードで配列に置換されるアミノ酸によって示される。一例として、プロリン(P)で置換された配列の12位のアラニン(A)は、一文字コードを使用してA12Pとして、または三文字コードを使用してAla12Proとして示される。二つ以上の置換が同じ配列に存在する場合、それらは斜線「/」によって分離されてもよい。したがって、V23AおよびQ41Gの置換と同じ配列における前述のA12Pの置換は、A12P/V23A/Q41Gという配列で示される場合がある。

30

【0024】

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、本明細書では互換的に使用され、別段の記載がない限り、哺乳類細胞における翻訳中にタンパク質に生合成的に組み込まれる天然起源のタンパク質原性L-アミノ酸である、アミノ酸のポリマー形態を指す。

40

【0025】

異なる配列の対応する残基を特定するためのアライメントは、米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)BLASTプログラム(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteinsでworldwide web上のBLAST+ 2.9.0のブラストリリース)または欧州バイオインフォマティクス研究所のClustal Omegaプログラム(バージョン1.2.4はwww.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)を使用して、デフォルトパラメータを使用して行われてもよい。別段の記載がない限り、Clus

50

t a l O m e g a を使用して、異なる配列の対応する残基を特定する。

【 0 0 2 6 】

配列同一性パーセント値は、整列された二つのアミノ酸配列または核酸配列の間で同じであるアミノ酸またはヌクレオチドの割合を指す。別段の記載がない限り、配列同一性の割合は、B L A S T + リリース 2 . 9 . 0 を使用して、デフォルトパラメータを有するポリペプチドに対するブラストアライメントまたは核酸に対するブラストアライメントを使用して決定される。

【 0 0 2 7 】

「実質的」という用語は、別段の示唆がない限り、「全体」と「全体ではないが大部分」の両方を包含することを意図している。例えば、「A D C C または C D C を介して細胞溶解を実質的に誘導しない」I g F c は、細胞溶解を全く誘導しない、または A D C C もしくは C D C を介した細胞溶解をほとんど誘導しないが完全に誘導しないわけではない I g F c を意味する。

【 0 0 2 8 】

B . 説明

腫瘍内の微小環境は、その pH、A T P 含有量、制限された酸素レベル（低酸素症）、および腫瘍プロテアーゼ（例えば、M M P）レベルのうちのいずれかが一つ以上における差異などの多くの点で、非悪性組織とは異なる。正常（非腫瘍）組織における細胞外 A T P レベルは、典型的には、正常組織において 0 . 0 1 ~ 0 . 1 マイクロモル（ μ M）の範囲内であり、一方で固形腫瘍における A T P の細胞外レベルは、概して 5 0 ~ 2 0 0 μ M の範囲内である。本開示は、腫瘍微小環境で見られる A T P レベルを使用して、腫瘍内の細胞に対する免疫応答をもたらすことを説明し、提供する。より具体的には、本明細書に記載される一部のコンストラクトは、免疫細胞活性化ドメイン（「A D」）（すなわち、免疫細胞と結合し、これを刺激する免疫調節性分子の活性化ドメイン）、および腫瘍微小環境（T M E）中に見られるレベルで A T P の存在下で実質的な量の二量体または他のより高次の複合体を形成する少なくとも一つの N B D を含み得る。N B D の二量体形成またはより高次の複合体形成は、二つ以上の免疫細胞 A D を提示する複合体をもたらす。二量体またはより高次の複合体として提示されたときに N K 細胞および C D 8 + T 細胞などの免疫細胞を刺激することができるが、単独で提示されたときに同じ免疫細胞を同じ程度まで刺激しない免疫細胞 A D の使用は、T M E 内の免疫応答の腫瘍内刺激を可能にする。

【 0 0 2 9 】

本明細書に記載される他のコンストラクトは、T A A または免疫細胞誘導ドメインに結合する腫瘍特異的結合ドメインと、腫瘍微小環境中に存在するレベルで A T P の存在下で実質的な量の二量体または他のより高次の複合体を形成する少なくとも一つの N B D とを含み得る。そのようなコンストラクトは、任意選択的に A D を含み得る。N B D の二量体形成またはより高次の複合体形成は、T M E 中の免疫細胞を動員および/または刺激することができる二量体またはより高次の複合体をもたらす。そのようなコンストラクトの二量体形成または他のより高次の複合体は、T M E の外側ではより高次の複合体を形成しないため、腫瘍の外側の免疫刺激を制限しながら、免疫応答の腫瘍内刺激を可能にする。

【 0 0 3 0 】

複合体化されていないコンストラクトの A D、腫瘍特異的結合ドメイン、および免疫細胞エンゲージャーは、単独で提示された場合、N K 細胞および C D 8 + T エフェクター細胞などの細胞を効果的に刺激しないため、コンストラクトは、全身免疫の活性化および関連する毒性効果をもたらさない。しかしながら、本明細書に記載のコンストラクトは、複合体形成を促進するのに十分な A T P が存在する T M E に局在する免疫刺激を提供し、したがって、その作用が環境に限定される免疫細胞機能の A T P 依存性アゴニストの形態とみなされ得る。加えて、コンストラクトの複合体化された形態（例えば、二量体、三量体など）は、サイズおよび分子量の増加を有するため、T M E からのそれらの拡散がさらに低減され、それらの作用が T M E に制限される。T M E から拡散するこれらの二量体またはよりより高次の複合体は、周囲の非悪性組織における A T P レベルが低すぎてそれらの

10

20

30

40

50

複合体を支持することができないため、非効果的な個々のモノマーに解離する。したがって、本明細書に記載のコンストラクトの複合体によって提供される免疫刺激は、可逆的であり、ATPレベルが複合体化を誘導するのに十分に高い微小環境に限定されると理解される。

【0031】

C. 免疫細胞機能のATP依存性アゴニストの構造

1. NBDおよびADを含む免疫細胞機能のATP依存性アゴニスト

その最も単純な形態では、本明細書に記載のNBD含有分子コンストラクトは、NBDと、免疫細胞（例えば、CD8+T細胞、NK細胞など）と結合し刺激するADとを含む。NBDは、ATPによって占有されたときに、コンストラクトの二つ以上の分子が、コンストラクトのNBD間の相互作用により二重鎖またはより高次の複合体（三重など）を形成する、一つ以上のATP結合部位を含む。かかる分子コンストラクトは、任意選択的に、一つ以上の独立して選択されるスキャフォールドアミノ酸配列および/または一つ以上の独立して選択されるリンカー配列を含む。例えば、図1の構造Aおよび図2の構造A-Dを参照のこと。いくつかの例では、ヘテロ二量体を形成する種間スキャフォールド配列がコンストラクトに組み込まれる場合があり、その結果、図2の構造Eに例示されているように、分子内に1種類以上のADが存在することがある。ADと一緒に（例えば、ホモ二量体またはヘテロ二量体として）提供することにより、NK細胞および/またはT細胞などの標的免疫細胞集団を刺激するADを使用することで、腫瘍微小環境における高レベルのATPに起因する腫瘍内免疫応答の選択的刺激が可能になると同時に、（例えば、NK細胞またはT細胞）の全身的な活性化および/または非腫瘍組織における免疫応答を回避することができる。

10

20

【0032】

NBDアミノ酸配列、スキャフォールドアミノ酸配列、およびADは、任意の順序で組織化され得る。第一の事例では、コンストラクトは、（例えば、N末端からC末端に）NBDアミノ酸配列、スキャフォールドアミノ酸配列、およびADを含む。第二の事例では、コンストラクトは、N末端からC末端に、NBDアミノ酸配列、AD、およびスキャフォールドアミノ酸配列を含む。第三の事例では、コンストラクトは、N末端からC末端まで、AD、スキャフォールドアミノ酸配列、およびNBDアミノ酸配列を含む。第四の事例では、コンストラクトは、N末端からC末端まで、AD、NBDアミノ酸配列、およびスキャフォールドアミノ酸配列を含む。第五の事例では、コンストラクトは、N末端からC末端に向かって、スキャフォールドアミノ酸配列、AD、およびNBDアミノ酸配列を含む。最後に、第六の事例では、コンストラクトは、N末端からC末端に向かって、スキャフォールドアミノ酸配列、NBDアミノ酸配列、およびADを含む。

30

【0033】

2. 腫瘍特異的結合剤および/または免疫細胞エンゲージャーを含むNBD含有コンストラクト

本明細書に記載されるNBD含有コンストラクトは、NBDに加えて、一つ以上の腫瘍特異的結合ドメインおよび/または免疫細胞誘導ドメインも含んでもよい。以下でより詳細に論じるように、腫瘍特異的結合ドメインは、腫瘍特異的結合剤とも呼ばれ、腫瘍細胞の表面上に発現されるTAAに対する親和性を有するNBD含有コンストラクトのドメインである。免疫細胞エンゲージャーとも呼ばれる免疫細胞誘導ドメインは、免疫細胞の細胞表面分子（例えば、抗原）に対する親和性を有するNBD含有コンストラクトのドメインである。別段の記載がない限り、例えば抗体断片であってもよい免疫細胞エンゲージャーは、それらが結合する免疫細胞のオフターゲット刺激（例えば、全身刺激）の可能性を避けるために一価である。一つ以上の腫瘍特異的結合剤および/または免疫細胞エンゲージャーを含むNBD含有コンストラクトはまた、一つ以上のADを含んでもよい。図3の構造D、E、H、およびIを参照のこと。

40

【0034】

腫瘍特異的結合剤および免疫細胞エンゲージャーは、例えば、TME環境中に見られる

50

濃度で ATP の存在下でヘテロ二量体または他のより高次の複合体（例えば、三量体）を形成する NBD 含有コンストラクトに組み込まれてもよい。ヘテロ二量体の形成は、コンストラクトのペアの第一のメンバーに第一のヘテロ二量体形成 NBD、およびコンストラクトのペアの第二のメンバーに第二のヘテロ二量体形成 NBD を組み込むことによって駆動されてもよい。NBD の第一および第二のヘテロ二量体形成ペアは、同族結合パートナーとして作用する。本開示によって包含されるこうした NBD 含有コンストラクトペアのタイプを例示するために、こうした NBD 含有コンストラクトペアの一連の非限定的な例を図 3 に示す。インビボで、二量体化されたコンストラクトは、免疫細胞エンゲージャーによって結合された免疫細胞を、腫瘍特異的結合剤によって認識される標的腫瘍細胞と相互作用するように導き、標的腫瘍細胞に対する免疫応答をもたらす。かかるコンストラクトは、複合体形成のために ATP の上昇を必要とするため、TME における腫瘍細胞の標的化を可能にし、それによって、免疫細胞のオフターゲット結合および刺激を制限する。腫瘍特異的結合剤および免疫細胞エンゲージャーを含むペアのコンストラクトは、同一であっても異なっている一つ以上の AD の組み合わせによって増強されてもよく、標的免疫細胞を刺激するために第一および第二の NBD 含有コンストラクトの相互作用によってもたらされる二量体形成を必要としてもよい。

10

【0035】

図 3 のエントリ A および B はそれぞれ、腫瘍特異的結合剤に連結された一つ以上の第一のヘテロ二量体形成 NBD を含む（例えば、N 末端から C 末端へ、または C 末端から N 末端へ）第一の NBD 含有コンストラクトと、同族の第二のヘテロ二量体形成 NBD および AD を含む（例えば、N 末端から C 末端へ）第二の NBD 含有コンストラクトと、の一对のコンストラクトを提供する。コンストラクトの要素は、独立して選択される任意のリンカー配列によって結合される。かかるコンストラクトは、ATP の上昇がヘテロ二量体化するために必要であるため、TME 中の腫瘍細胞への AD の標的化を可能にし、それによってオフターゲット結合を制限し、AD による免疫細胞の全身刺激を回避する。さらに、B に記載されるコンストラクトの AD は、同一でも異なっている一つ以上の AD の組み合わせによって増強されてもよく、標的免疫細胞上で機能するために二量体形成を必要とし得る。A または B で図 3 には示されていないが、A または B のヘテロ二量体形成コンストラクトのいずれかまたは両方はまた、スクャフォールドアミノ酸配列を含んでもよい（例えば、図 3 のエントリ E を参照）。

20

【0036】

図 3 のエントリ A または B に示されるタイプのヘテロ二量体化を示す例示的なコンストラクトの対は、例えば、(i) TAA（例えば、NYESO-1、メソテリン、CEA、PSMA、または MAGE-A1、MAGE-A4、MAGE-A9、または MAGE-A11 などの MAGE）に対して親和性を有する腫瘍特異的結合剤に連結された一つ以上の TAP1 NBD を含む第一の NBD 含有コンストラクト、および (ii) ATP および IL-2 配列の存在下で TAP1 NBD の同族結合パートナーとして作用する TAP2 NBD を含む第二の NBD 含有コンストラクトを含んでもよい。TME 中に存在するレベルで ATP に曝露されると、そのようなコンストラクトはヘテロ二量体化し、TME 中に存在する T 細胞を刺激するように作用することができる。

30

【0037】

図 3 のエントリ C および D はそれぞれ、第一の NBD 含有コンストラクトが腫瘍特異的結合剤に連結された一つ以上の第一のヘテロ二量体形成 NBD を（例えば、N 末端から C 末端に）含み、第二の NBD 含有コンストラクトが、同族の第二のヘテロ二量体形成 NBD および免疫細胞エンゲージャーを（例えば、N 末端から C 末端に）含むヘテロ二量体形成ペアのコンストラクトを提供する。コンストラクトの要素は、独立して選択される任意のリンカー配列によって結合される。ヘテロ二量体形成ペアの第一および第二のコンストラクトのいずれかまたは両方は、スクャフォールド配列を含み得る（例えば、F~I の図 3 を参照されたい）。腫瘍特異的結合剤および / または免疫細胞エンゲージャーを含むコンストラクトは、エントリ D、E、H、および I にあるように AD をさらに含んでもよい。AD が、免疫細胞エンゲージャーも含むコンストラクト中に存在する場合、AD は、オ

40

50

フターゲット刺激を防止するために免疫細胞刺激のために二量体またはより高次の複合体（例えば、4-1BBLなどのTNFファミリーメンバー）としてT細胞への提示を必要とするものから選択されてもよい。

【0038】

図3のエントリCを例示する一对のコンストラクトは、例えば、(i)(b)腫瘍特異的結合剤に連結された(a)TAP1 NBDを含む第一のNBD含有コンストラクトと、(ii)(a)ATP存在下でTAP1 NBDの同族結合パートナーとして作用するTAP2 NBDと、(b)一価のT細胞エンゲージャー（例えば、抗CD3抗体フラグメントまたはナノボディやscFvなどの単鎖抗体構築物）とを含む第二のNBD含有コンストラクトと、を含む。腫瘍特異的結合剤は、腫瘍細胞表面に発現するTAA（例えば、NYESO-1、メソテリン、CEA、PSMA、またはMAGE-A1、-A4、-A9、-A11のようなMAGE）に対して親和性を有する抗体、抗体フラグメント、またはscFvやナノ抗体のような単鎖抗体コンストラクト）であってもよい。

10

【0039】

図3のエントリA~Iは、二つの分子コンストラクトの組み合わせとして現れる。これらの組み合わせにおける腫瘍特異的結合剤を含む第一のコンストラクトは、ADおよび/または免疫細胞エンゲージャーを含む第二のコンストラクトとは別個のため、二つ以上のタイプの第一または第二のコンストラクトを含む集団（混合物）が形成され得る。例えば、図3のエントリA~Iのいずれか一つに示される第一および第二のコンストラクトの混合物が形成されてもよく、混合物は、各々が異なるTAAを標的とする腫瘍特異的結合剤を有する二つ以上の第一のコンストラクトを含む。図3のエントリAまたはBのいずれか一つに図示される第一および第二のコンストラクトの混合物が形成されてもよく、混合物は、各々が異なる免疫細胞受容体に向けられた一つ以上のADを有する二つ以上の第二のコンストラクトを含む。同様に、図3のエントリC~Iのいずれか一つに示される第一および第二のコンストラクトの混合物が形成されてもよく、混合物は、各々が異なる免疫細胞表面抗原に向けられた異なる免疫細胞エンゲージャーを有する二つ以上の第二のコンストラクトを含む。免疫細胞エンゲージャー、腫瘍特異的結合剤、またはADのうちの一つのみが変化する集団に加えて、第一および第二のコンストラクトの混合物は、免疫細胞エンゲージャー、腫瘍特異的結合剤、およびADから選択される二つ以上の要素で変化する二つ以上の第一および第二のコンストラクトを含み得る。

20

30

【0040】

図3のエントリJ~Mはそれぞれ、第一のNBD含有コンストラクトが、免疫細胞エンゲージャーに連結された一つまたは複数の第一のヘテロ二量体形成NBD（例えば、N末端からC末端）を含み、第二のNBD含有コンストラクトが、同族第二のヘテロ二量体形成NBDおよびAD（例えば、N末端からC末端）を含む、一对のコンストラクトを提供する。コンストラクトの要素は、独立して選択される任意のリンカー配列によって結合される。かかるコンストラクトは、TMEにおける免疫細胞の活性化を可能にする一方で、ヘテロ二量体化するためにATPの上昇を必要とし、それによってオフターゲット結合を制限し、ADによる免疫細胞の全身刺激を回避するため、TMEの外側の実質的な活性化を回避することができる。さらに、KまたはMのいずれかに記載されるコンストラクトのADは、同一であっても異なってもよく、標的免疫細胞上で機能するために二量体化を必要とし得る。

40

【0041】

JおよびKで図3に見られるタイプのヘテロ二量体形成コンストラクトを示すコンストラクトの例示的な対は、例えば、(i)T細胞表面上に発現されるCD28に対する親和性を有する免疫細胞エンゲージャー（例えば、抗体、抗体断片、またはVHHもしくはナノボディなどの単鎖抗体コンストラクト）に連結された一つ以上のTAP1 NBDを含む第一のNBD含有コンストラクトと、(ii)ATPおよびIL-2配列の存在下でTAP1 NBDの同族結合パートナーとして作用するTAP2 NBDを含む第二のNBD含有コンストラクトとを含む。TME中に存在するレベルでATPによってヘテロ二量

50

体に複合体化されたとき、そのようなコンストラクトは、その環境中に存在する T 細胞を刺激するように作用し得る。

【 0 0 4 2 】

コンストラクトの混合物を含む組成物は、異なる T A A に向けられた二つ以上の腫瘍特異的結合剤の使用が、腫瘍が単一のコンストラクトで単剤療法から逃れることを回避できる治療用途での使用を見出す。同様に、二つ以上の免疫細胞エンゲージャーおよび/または A D の使用は、二つ以上のタイプの免疫細胞を動員し、腫瘍細胞に対してより激しい免疫応答を提供し、それによって、単一のコンストラクトを用いた単剤療法を使用して起こるよりも堅牢な腫瘍に対する免疫応答をもたらすことができる。

【 0 0 4 3 】

3 . 二つ以上の N B D を含む N B D 含有コンストラクト、および N B D 含有分子コンストラクトの複合体の形成

本明細書に記載の N B D 含有コンストラクトは、A T P の存在下でコンストラクトが複合体に効果的に重合することを可能にする二つ以上の N B D を含む得る。二つ以上の N B D は、例えば、縦一列の対として配置されてもよい。縦一列に配置される場合、N B D は、コンストラクト内で互いに隣接し、介在するリンカーアミノ酸配列以外のコンストラクトのいずれの要素によっても分離されない（例えば、A D、スキヤフォールド、腫瘍特異的結合ドメイン、または免疫細胞誘導ドメインは、縦一列の N B D の間に存在しない）。追加の N B D は、それらが縦一列に配置されないように、コンストラクト内に位置してもよい。例えば、二つ以上の N B D を含む N B D 含有コンストラクトは、節 C . 1 (N B D および A D を含む免疫細胞機能の A T P 依存性アゴニスト) で上述した第一から第六の事例の N B D を、縦一列にペアの N B D で置換することによって形成され得る。二つ以上の N B D (例えば、縦一列) を含む N B D 含有コンストラクトはまた、免疫細胞エンゲージャーまたは腫瘍特異的結合剤を含むコンストラクトから形成されてもよい。

【 0 0 4 4 】

少なくとも二つの N B D を含む N B D 含有分子コンストラクトの複合体は、A T P レベルが A T P が結合部位を占有するのに十分に高い T M E などの環境中にコンストラクトを配置することによって形成され得る。そのような複合体は、図 3 の N および O、ならびに図 4 A に例示されている。ここで、図 4 A 二つ以上の N B D アミノ酸配列が本開示のコンストラクトに組み込まれ、コンストラクトは、実際には、A T P の存在下で可逆的に重合して複合体を産生し得る。A T P の存在下で形成される複合体は、二量体、三量体、四量体、またはより高次の構造であってもよい。例えば、図 4 A を参照。コンストラクトに二つ以上の N B D を組み込むことは、効力および有効性の最大化を可能にし、他の特性に影響を与え得る。例えば、標的細胞の表面上で発現される要素に対して多価となる複合体（例えば、腫瘍特異的エンゲージャーまたは A D に対して）は、標的細胞に対して増加した有効親和性を示してもよく、より大きな複合体は T M E 中により長く留まり、それによって複合体のインビボ半減期を効果的に延長されるなどの影響である。

【 0 0 4 5 】

複合体は、縦一列に配置された少なくとも二つの N B D を含んでもよく、最大で、N B D アミノ酸配列（図 4 A、構造 A、B、および参照 E）および A D、免疫細胞エンゲージャー、および/または腫瘍特異的結合剤を分離するリンカーアミノ酸配列（例えば、剛直なリンカー）を有する。あるいは、N B D は、腫瘍特異的結合剤または免疫細胞エンゲージャーに別々に結合されてもよい（図 4 A、構造 C および D を参照）。複合体を形成するために使用される N B D 含有コンストラクトは、ホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成 N B D を含む得る。図 4 A には表示されていないが、同じコンストラクト分子中のホモ二量体形成 N B D は、ドメイン間の生産的な A T P 結合界面が形成されないように分子を構築することによって、自己会合が防止され得る。これは、例えば、N B D 間の距離を制限することによって、または N B D 間の剛直なペプチドリンカーを使用することによって達成され得る。

【 0 0 4 6 】

10

20

30

40

50

少なくとも二つの N B D および A D を含む N B D 含有コンストラクトを、図 4 A で構造 A および B によって例証する。構造 A は、A T P の存在下でホモ二量体形成し、図 4 A に構造 A で示されるように二量体および / またはより大きなコンストラクトを形成し得る、N B D を使用する。対照的に、構造 B は、A T P の存在下でヘテロ二量体またはポリマーを形成する構造を含む。T M E 中に存在するレベルで A T P に曝露されると、コンストラクトは、A D を提示する大きな複合体（例えば、A D ホモ二量体またはヘテロ二量体として）を形成し得る。かかる N B D 含有コンストラクトの複合体は、T M E 中の N K 細胞および / または T 細胞などの標的免疫細胞を刺激し得る。複合体中に存在する A D は、同じであってもよく、（例えば、図 4 A、構造 A を参照）または異っていてもよい（例えば、図 4 A、構造 B を参照）。例えば、複合体中に存在する第一の A D と第二の A D の配列は同一であり、二量体またはよりより高次の複合体中に提示されたときに免疫細胞応答の活性化をもたらし得る。あるいは、複合体中に存在する第一の A D および第二の A D は、一緒に提示されたときに免疫細胞活性化を引き起こす異なる分子（例えば、異なるインターロイキン）由来であってもよい。また、複合体中に存在する第一の A D と第二の A D の配列は異っており（非同ー）、組み合わせた場合、例えば I L - 1 2、I L - 2 3、または I L - 2 7 などの二量体免疫調節因子の活性断片を形成し、その各々が二つのサブユニット（ および ポリペプチド鎖 ）を含むことも可能である。それぞれが単一の N B D を含む N B D 含有コンストラクトは、A T P の存在下で二つの異なる（非同ーの）A D を含む複合体に組み立てられてもよい。あるいは、二つのサブユニットからなる活性 A D は、A T P の存在下で単一の N B D をそれぞれ含むコンストラクトを使用して、活性 A D に組み立てることができる（例えば、図 2、構造 A および B を参照）。

【 0 0 4 7 】

上記の N B D 含有コンストラクトに加えて、本開示は、少なくとも二つの N B D と、図 4 A、構造 C に例示される腫瘍特異的結合アミノ酸配列（腫瘍特異的結合剤）、および / または図 4 A、構造 D に例示される免疫細胞結合アミノ酸配列（免疫細胞エンゲージャー）とを含む N B D 含有コンストラクトを提供する。このような分子コンストラクトは、任意選択的に、一つ以上の独立して選択されるスキャフォールドアミノ酸配列および / または一つ以上の独立して選択されるリンカー配列を含む。腫瘍特異的結合剤には、T A A（例えば、H E R - 2、M A G E - 2、M A G E - 4、N Y - E S O など）に結合する抗体が含まれるが、これらに限定されない。免疫細胞エンゲージャーとしては、免疫細胞表面抗原（例えば、T 細胞上の C D 3、C D 8、または C D 4、T 細胞上の T R G V 9、N K 細胞上の C D 1 6 など）に結合する抗体が挙げられるが、これらに限定されない分子が挙げられる。別段の記載がない限り、免疫細胞エンゲージャーは、T M E の外側の免疫細胞の刺激を避けるために一価であり、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）または補体依存性細胞傷害（C D C）が改変されて、かかる応答を実質的に制限または防止し得る配列を有する。

【 0 0 4 8 】

A T P レベルが、N B D ドメインがより高次の複合体（例えば、二量体）を形成することを可能にする T M E 中に存在すると、少なくとも二つの N B D、ならびに腫瘍特異的結合剤および / または免疫細胞エンゲージャーを含むコンストラクトは、免疫刺激をもたらし得る大きな複合体を形成する。I g F c を含むスキャフォールド、および腫瘍特異的結合剤の少なくとも二つの N B D を含むコンストラクトは、T M E に複合体を形成することができる（例えば、図 4 A、構造 C）に示され、例えば、A D C C または C D C をもたらし得る。少なくとも二つの N B D および免疫細胞エンゲージャーを含むコンストラクトは、T M E に複合体を形成することができる（例えば、図 4 A、構造 D を参照）に示され、それらは、例えば、標的抗原（例えば、C D 8 + T 細胞上の C D 3 または N K 細胞上の C D 1 6）の架橋による標的免疫細胞の刺激をもたらし得る。

【 0 0 4 9 】

少なくとも二つの N B D を含む N B D 含有コンストラクトと腫瘍特異的結合剤とを組み合わせること（例えば、図 4 A、構造 C を参照）、ならびに少なくとも二つの N B D およ

び免疫細胞エンゲージャーを含むNBD含有コンストラクト（例えば、図4A、構造Dを参照）は、腫瘍特異的結合剤および免疫細胞エンゲージャーの両方を含む複合体をもたらすことができる。第一のヘテロ二量体形成NBDを腫瘍特異的結合剤と共に、第二のヘテロ二量体形成NBDを免疫細胞エンゲージャーと共に使用することは、ATPの存在下で形成される複合体が結合剤およびエンゲージャーの両方を含有し、標的腫瘍細胞に対する免疫細胞応答を刺激することができることを確実にすることができる。これは、少なくとも二つのNBDと腫瘍特異的結合剤とを含むコンストラクトと、少なくとも二つのNBDと免疫細胞エンゲージャーとを含み、TME中に大きな複合体を形成するコンストラクトの混合物で例示される（例えば、NBDが縦一列に示されているEおよびFの図4Aの構造を参照）。十分なATPの存在下でこのような構造から生じる複合体は、腫瘍特異的結合剤を介して免疫細胞を腫瘍標的に結合し、同時に、現在複合体化されている単量体免疫細胞エンゲージャーを介して細胞表面上の受容体を架橋することによって免疫細胞の活性化をもたらすことができる。

10

【0050】

複合体を形成するために使用される各コンストラクト中に存在する腫瘍特異的結合剤および/または免疫細胞エンゲージャーアミノ酸配列は、同じである必要はない。したがって、図3の複合体、構造A~I、および図4A、構造C~Iは、異なるTAA（例えば、二つ以上の腫瘍特異的結合剤）に向けられた二つ以上の腫瘍特異的結合剤、および存在する場合、二つ以上の免疫細胞エンゲージャーを有してもよい。単一の複合体において、異なるTAAに対して向けられた二つ以上の異なる腫瘍特異的結合剤を使用することにより、二つ以上のNBDを含むコンストラクトから形成される複合体が、異なる腫瘍抗原標的を発現する腫瘍に対して活性であることが可能になるだけでなく、腫瘍抗原発現の喪失による療法からの腫瘍の回避を制限し得る。単一の複合体において異なる免疫細胞エンゲージャーを使用することにより、二つ以上のタイプの免疫細胞（例えば、CD8+T細胞およびNK細胞の両方）からの免疫応答の刺激が可能になる。また、腫瘍特異的結合剤を含むコンストラクトを含有する複合体を含む、TMEで形成される複合体にADを組み込むことも可能である。これは、例えば、図4AのHで例示されるようなコンストラクトにおいて、ADおよびNBD（例えば、二つ以上のNBD）からなる1つ以上の構築物を組み合わせることによって、または図4AのIで例示されるようなコンストラクトにおいて、AD、NBD（例えば、二つ以上のNBD）、および腫瘍特異的結合剤からなる1つ以上の構築物を組み合わせることによって行うことができる。

20

30

【0051】

腫瘍特異的結合剤、免疫細胞エンゲージャー、およびADは、TMEに形成された複合体に入る異なるコンストラクトによって提供されるため、複合体の組成は、異なるコンストラクトを混合することによって（例えば、患者への投与前または投与中に）制御することができる。したがって、単一のコンストラクトは、異なる治療法の組み合わせに使用されることもある。

【0052】

D. NBD含有コンストラクトの要素

1. NBDおよびATPとの相互作用

本明細書に記載のコンストラクトに組み込むためのNBDは、いくつかの基準に基づいて選択され得る。コンストラクトがヒト治療用途が意図されている場合、NBDは、優先的にヒトATP結合タンパク質に由来し、それらの免疫原性を制限し、好ましくは、十分なATPに曝露されたときに溶液相二量体化またはより高い複合体形成を受けることができる。免疫原性である非ヒトタンパク質が採用される場合、免疫原性領域を、そのヒトホモログにより密接にまたは完全に一致させるように改変することにより、免疫原性部分をヒト化してもよい。本明細書に記載されるコンストラクトで使用される二量体またはより高次の複合体の溶液相形成は、標的TMEに見られるATP濃度で発生するが、正常組織では発生しない。したがって、本明細書に提供されるコンストラクトで使用するためのNBDは、例えば、正常組織の細胞外空間に見られる上限レベル（すなわち、約1μM以上

40

50

)から、TMEに見られるATPレベル程度までの約1桁上(10倍上)のATPの解離定数を有し得る。いくつかの場合では、NBDの親和性は、約 $1\ \mu\text{M}$ ~約 $200\ \mu\text{M}$ である。例えば、NBDのATP親和性は、約 $1\ \mu\text{M}$ ~約 $5\ \mu\text{M}$ 、または約 $5\ \mu\text{M}$ ~約 $25\ \mu\text{M}$ の範囲内であり得る。NBDのATP親和性は、約 $25\ \mu\text{M}$ ~約 $50\ \mu\text{M}$ の範囲内であり得る。他の実施例では、NBDの親和性は、約 $50\ \mu\text{M}$ ~約 $100\ \mu\text{M}$ 、または約 $100\ \mu\text{M}$ ~約 $200\ \mu\text{M}$ の範囲内であり得る。

【0053】

一部のタンパク質のNBDは、十分なレベルのATPの存在下でホモ二量体を形成し、他のタンパク質は、十分なレベルのATPの存在下でヘテロ二量体を形成する。ホモ二量体形成NBDおよびヘテロ二量体形成NBDの両方は、本明細書に記載されるポリペプチドコンストラクトの様々な態様で採用され得る。十分なレベルのATPが存在する場合に、溶液中にNBDがホモ二量体を形成することが望ましい場合、二量体間の界面におけるアミノ酸残基は、二つのNBD分子間の界面形成を妨げるアミノ酸残基を除去するか、または置換するかのいずれかに修飾され得る。あるいは、二つのNBD分子間の相互作用に寄与しないアミノ酸を、ホモ二量体形成をもたらす相互作用に寄与するアミノ酸で置換することが可能である。

【0054】

a) NBDとしてのATP結合カセット

多くのタンパク質は、本明細書に記載されるコンストラクトのNBDとしての使用に適したNBDを含む。これらのタンパク質の中でも、ATP結合カセット(ABC)トランスポーターは、高度に保存され、免疫原性である可能性が低い豊富なトランスポーターファミリーであるため、部分的に適切な候補を表す。ABCトランスポーターは、ATP加水分解からのエネルギーを利用して、細胞質へのまたは細胞質からの基質の輸送を促進する多様な機能を有する膜タンパク質の大きなスーパーファミリーである。例えば、Locher, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 364(1514): 239-245(2009)、およびその中に引用される参考文献を参照のこと。ヒトゲノムは、48個または49個の別個のABCトランスポーターをコードする。(上掲書参照) ABCトランスポーターは、ABC1、MDR/TAP、MRP、ALD、OABP、GCN20、および白色の7つの別個のファミリーメンバーに分けられる。TAP1を含む各ファミリーの代表的なメンバーを図6に整列させている。ATP結合カセットファミリーのNBDは保存され、二つのサブドメインを含む。(上掲書参照) 第一のものは、RecAタンパク質に類似しており、Pループ(Walker-Aモチーフ)を含有する。第二のサブドメインは、「螺旋サブドメイン」と称され、LSGGQモチーフを含む。(上掲書参照) トランスポーターのNBDは、直接対尾の配向で二量体として組み立てられ、それらの界面に挟まれた二つのATP結合部位および加水分解部位を形成する(図5)。その配向では、二つのドメインの各々におけるLSGGQモチーフは、ATP-サンドイッチ界面で対向するWalker-A配列に隣接する。こうしたインターフェースは、例えば、Loe et al., (2002) J Biol Chem., 277(44): 41303-41306、およびSmith et al., (2002) Mol Cell., 10(1): 139-149の図3Aに記載されている。ヌクレオチド(ATP)が結合部位に存在しない場合、ドメイン界面にギャップがあるが、ATPが結合すると、NBDは二量体化し、ATPを加水分解し、その後解離することができる(例えば、上記のLocher 2009を参照のこと)。安定化二量体は、NBDドメイン配列ATP加水分解欠損または実質的にATP加水分解欠損を引き起こすアミノ酸置換を含むことによって形成され得る(例えば、Vakkasoglu et al., (2107) PLoS ONE, 12(5): e0178238を参照、doi.org/10.1371/journal.pone.0178238で入手可能である)。例えば、NBDタンパク質に見られる加水分解Asp残基またはGlu残基は、Asn残基またはGln残基によって置換されてもよい(例えば、図3を参照)。

10

20

30

40

50

【0055】

十分なATPが存在するときに、ABCタンパク質のNBDを溶液中にホモ二量体を形成することが望ましい場合、二量体間の界面における残基は、界面形成を妨げるアミノ酸残基を除去するか、もしくは置換するか、または相互作用に寄与し得るアミノ酸との界面相互作用に寄与しないアミノ酸を置換するかのいずれかに修飾され得る。一例として、ラットTAP1のNBDが溶液中でホモ二量体形成し、ATPの存在下で溶液相ホモ二量体形成をもたらすATP-サンドイッチ界面の形成のためのモデルとして使用され得ることが知られている(例えば、Vakkasoglu et al., (2107) PLoS ONE, 12(5): e0178238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178238>を参照)。ホモ二量体形成を受けることが知られている配列、例えば、ラットTAP1 NBDとのNBDアミノ酸配列のアライメントを使用して、標的配列の変化を誘導することができる。アライメントは、米国国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)BLASTプログラム(BLAST+ 2.9.0のblastpリリース版、ワールドワイドウェブ上のblast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins)または欧州バイオインフォマティクス研究所のClustal Omegaプログラム(バージョン1.2.4 www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/で入手可能)を使用して、デフォルトパラメータを使用して実行することができる。別段の記載がない限り、Clustal Omegaが採用される。

10

【0056】

ABC含有タンパク質のNBDアミノ酸配列は、ABCA1遺伝子、UniProtKB - O95477(配列番号1)によってコードされるリン脂質輸送ATPase(ABCまたはABCA1トランスポーター)のNBDドメインのすべてまたは一部を含み得る。NBDは、配列番号1と少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有する配列を含み得る。

20

【0057】

NBDアミノ酸配列は、ABCB1遺伝子、UniProtKB - P08183(配列番号2)によってコードされる多剤耐性タンパク質1(MDR/TAP)のNBDドメインのすべてまたは一部を含み得る。NBDは、配列番号2と少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有する配列を含み得る。

30

【0058】

NBDアミノ酸配列は、ABCC1遺伝子、UniProtKB - P33527(配列番号3)によってコードされる多剤耐性関連タンパク質(MRP、多剤耐性関連タンパク質1)のNBDドメインのすべてまたは一部を含み得る。NBDは、配列番号3と少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0059】

NBDアミノ酸配列は、ABCD1遺伝子、UniProtKB/Swiss-Prot: P33897(配列番号4)によってコードされるATP結合カセットサブファミリーDメンバー1タンパク質(ALD、副腎白質ジストロフィータンパク質)のNBDドメインのすべてまたは一部を含み得る。NBDは、配列番号4と少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有する配列を含み得る。

40

【0060】

NBDアミノ酸配列は、ABCE1遺伝子、UniProtKB/Swiss-Prot: P61221(配列番号5)によってコードされるATP結合カセットサブファミリーEメンバー1タンパク質(OABP、2'-5'-オリゴアデニル酸塩結合タンパク質)のNBDドメインのすべてまたは一部を含み得る。NBDは、配列番号5と少なくとも約90%または少なくとも約95%の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0061】

NBDアミノ酸配列は、ABCF1遺伝子、UniProtKB - Q8NE71(配列番号6)によってコードされるATP結合カセットサブファミリーFメンバー1タンパク

50

質 (G C N 2 0、T N F アルファ誘導性 A T P 結合タンパク質) の N B D ドメインのすべてまたは一部を含み得る。N B D は、配列番号 6 と少なくとも約 9 0 % または少なくとも約 9 5 % の配列同一性を有する配列を含み得る。

【 0 0 6 2 】

N B D アミノ酸配列は、A B C G 2 遺伝子、UniProtKB / Swiss - Prot : P 4 5 8 4 4 (配列番号 7) によってコードされる A T P 結合カセットサブファミリー G メンバー 1 タンパク質 (White , Homolog Of Drosophila White) の N B D ドメインのすべてまたは一部を含み得る。N B D は、配列番号 7 と少なくとも約 9 0 % または少なくとも約 9 5 % の配列同一性を有する配列を含み得る。

10

【 0 0 6 3 】

(1) N B D としての T A P 1 および T A P 2 A T P 結合カセット

T A P 1 および T A P 2 タンパク質は、A T P 結合と、内細胞膜にわたるペプチド転座とのヘテロ二量体形成とを結合するトランスポーターとして作用する同族結合パートナーである。T A P 1 および T A P 2 は、本明細書に提供されるコンストラクトで使用するための N B D の供給源を表す A B C トランスポータースーパーファミリーのメンバーである。ラット T A P 1 N B D は、A T P の存在下でホモ二量体形成を受けることが知られている。ヒト T A P 1 の N B D は、A T P の存在下でホモ二量体形成を受けないが、以前に定義された置換を使用してホモ二量体形成を受けると誘導することができる。例えば、Vakkasoglu et al. (2 0 1 7) “ D - helix influenza dimerization of the ATP-binding cassette (ABC) transporter associated with antigen processing 1 (T A P 1) nucleotide-binding domain , ” P L O S O N E , 1 2 (5) : e 0 1 7 8 2 3 8、ワールドワイドウェブ上の doi . org / 1 0 . 1 3 7 1 / journal . pone . 0 1 7 8 2 3 8 を参照。T A P 1 ホモ二量体形成につながる置換としては、配列番号 8 において太字斜字体で表記される、N 6 7 6、S 6 7 7、Q 6 8 0、E 6 8 2、および Q 6 8 3 のうちのひとつ以上 (例えば、各々) にあるものが挙げられる。例えば、ホモ二量体形成をもたらす T A P 1 置換は、N 6 7 6 G、S 6 7 7 N、Q 6 8 0 R、E 6 8 2 Q および Q 6 8 3 R 置換のうちのひとつ以上 (例えば、全て) を含み得る。N B D として採用される T A P 1 および T A P 2 タンパク質の部分 (例えば、ドメイン) はまた、配列中に存在する (例えば、セリン残基を有する) ひとつ以上のシステインの置換を含んで、望ましくないジスルフィド結合形成を防止し、非機能的なフォールディングまたは望ましくない分子間ジスルフィド結合形成をもたらし得る。T A P 1 および T A P 2 N B D はまた、例えば、それらの N B D を含むコンストラクトの精製のためのドメインの C 末端に、His タグを含み得る。

20

30

【 0 0 6 4 】

ヒト T A P 1 由来の N B D アミノ酸配列 (配列番号 9) は、例えば、NCBI 参照配列 : 配列番号 8 の NP _ 0 0 0 5 8 4 . 3、または UniProtKB - Q 0 3 5 1 8 - 2 :

40

50

【化 1】

1 MASSRCPAPR GCRCLPGASL AWLGTVLLLL ADWVLL
 RTAL PRIFSLLVPT ALPLLRVWAV
 61 GLSRWAVLWL GACGVLRA TV GSKSENAGA Q GWLAAL
 KPLA AALGLALPGL ALFRELISWG
 121 APGSADSTRL LHWGSHPTAF VVS YAAALPA AALWHK
 LGSL WVPGGQGGSG NPVRRLLGCL
 181 GSETRRLSLF LVLVVLSSLG EMAIPFFTGR LTDWIL
 QDGS ADTFTRNLTL MSILTIASAV
 241 LEFVG DGIYN NTMGHVHSHL QGEVFGAVLR QETEFF 10
 QQNQ TGNIMSRVTE DTSTLSDSLS
 301 ENLSLFLWYL VRGLCLLGIM LWGSVSLTMV TLITLP
 LLFL LPKKVGK WYQ LLEVQVRESL
 361 AKSSQVAIEA LSAMPTVRSF ANEEGEAQKF REKLQE
 IKTL NQKEAVAYAV NSWTTSISGM
 421 LLKVGILYIG GQLVTSGAVS SGNLVT FVLY QMQFTQ
 AVEV LLSIYPRVQK AVGSSEKIFE
 481 YLDRTPRCPP SGLLTPHLE GLVQFQDV SF AYPNRP
 DVLV LQGLTFTLRP GEVTALVGNP
 541 GSGKSTVAAL LQNL YQPTGG QLLLDGKPLP QYEHRY 20
 LHRQ VAAVGQEPQV FGRSLQENIA
 601 YGLTQKPTME EITAAAVKSG AHSFISGLPQ GYDTEV
 DEAG SQLSGGQRQA VALARALIRK
 661 PCVLILDDAT SALDANSQLQ *VEQLLYESPE* RYSRSV
 LLIT QHLSLVEQAD HILFLEGGAI
 721 REGGTHQQLM EKKGCYWAMV QAPADAPE (参照配列: NP_
 000584. 2、配列番号8)

のNBDアミノ酸配列(アミノ酸492-748)に対して90%以上または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。 30

【0065】

NCBI配列およびUniProt配列の両方に共通するTAP1 NBDドメインは、
 【化 2】

1 GLLTPLHLEG LVQFQDV SFA YPNRPDVLVL QGLTFT
 LRPG EVTALVGNP GSGKSTVAALL
 61 QNLYQPTGGQ LLLDGKPLPQ YEHRYLHRQV AAVGQE
 PQVF GRSLQENIA YGLTQKPTMEE 121 ITAAAVKSGA H
 SFISGLPQG YDTEVDEAGS QLSGGQRQAV ALARALIRKP
 CVLILDDATS 181 ALDANSQLQV *EQLLYESPER* YSRSVL
 LITQ HLSLVEQADH ILFLEGGAIR EGGTHQQLME 241 K 40
 KGCYWAMVQ APADAPE (配列番号9)

である。ホモ二量体形成に関連する配列番号8の残基N676、S677、Q680、E682、およびQ683は、配列番号9のN185、S186、Q189、E191、およびQ192として現れ、太字斜字体で表記される。ヒトTAP1由来のNBDアミノ酸配列は、例えば、配列番号9として提供されるNCBI参照配列: NP_000584.2 (アミノ酸492-748)に記載されているアミノ酸配列のNBDの少なくとも230個の連続したアミノ酸に対して97%以上または98%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなる。

【0066】

ヒトTAP1由来のNBDアミノ酸配列は、例えば、配列番号8のC662（例えば、C662S）およびC735（例えば、C735S）に対応するアミノ酸残基での置換を含み得る。ヒトTAP1由来のNBDアミノ酸配列はまた、例えば、以下の配列番号10において太字斜字体で表記されている配列番号8のN676、S677、Q680、E682、およびQ683の1つ以上（例えば、N676G、S677N、Q680R、E682Q、および/またはQ683R）に対応するアミノ酸における置換を含んでいてもよい。ヒトTAP1由来のNBDアミノ酸配列はまた、例えば、配列番号8のD668に対応するAspでの置換を含んでもよく、これは、NBD ATP加水分解欠損を引き起こす。したがって、TAP1のNBDポリペプチドアミノ酸配列は、例えば、配列番号10のアミノ酸配列、またはその配列：

10

【化3】

```

1  GLLTPLHLEG  LVQFQDVSFA  YPNRPDVLVL  QGLTFT
LRPG  EVTALVGPNG  SGKSTVAALL
61  QNLYQPTGGQ  LLLDGKPLPQ  YEHRYLHRQV  AAVGQE
PQVF  GRSLQENIAY  GLTQKPTMEE  121  ITAAAVKSGA  H
SFISGLPQG  YDTEVDEAGS  QLSGGQRQAV  ALARALIRKP
SVLILDNATS  181  GNQLRV  QRLLYESPER  YSRSVLLITQ
HLSLVEQADH  ILFLEGGAIR  EGGTHQQLME
241  KKGSYWAMVQ  APADAPE (配列番号10)

```

20

に対して90%超もしくは95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。あるいは、NBDアミノ酸配列は、配列番号10に提供される配列の少なくとも230または240個の連続するアミノ酸と97%超または98%超の配列同一性を有し得る。

【0067】

ヒトTAP1由来のNBDアミノ酸配列は、例えば、配列番号8のC662（例えば、C662S）およびC735（例えば、C735S）におけるものに対応する置換を含み得る。ヒトTAP1由来のNBDアミノ酸配列はまた、例えば、以下の配列番号87で太字斜字体で表記されている、配列番号8におけるN676、S677、Q680、E682、およびQ683（例えば、N676G、S677N、Q680R、E682Q、および/またはQ683R）のうちの一つ以上におけるものに対応する置換を含み得る。さらに、ヒトTAP1由来のNBDアミノ酸配列は、配列番号8のD668に対応するAspでの置換を含んでもよく、これは、NBD ATP加水分解欠損を引き起こす。したがって、TAP1のNBDポリペプチドアミノ酸配列は、例えば、配列番号87のアミノ酸配列、またはその配列：

30

【化4】

```

1  MPPSGLLTPL  HLEGLVQFQD  VSFAYPNRPD  VLVLQGL
LTFT  LRPGEVTALV  GPNGSGKSTV
61  AALLQNLYQP  TGGQLLLDGK  PLPQYEHRYL  HRQVAA
VGQE  PQVFGRSLQE  NIAYGLTQKP
121  TMEEITAAAV  KSGAHSFISG  LPQGYDTEVD  EAGSQL
SGGQ  RQAVALARAL  IRKPSVLILD
181  NATSALDAGN  QLRVQRLLYE  SPERYSRSVL  LITQH
SLVE  QADHILFLEG  GAIREGGTHQ
241  QLMKKGSYW  AMVQAPADAP  E (配列番号87)

```

40

に対して90%超もしくは95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。あるいは、NBDアミノ酸配列は、配列番号87に提供される配列の少なくとも250または260個の連続するアミノ酸と97%超または98%超の配列同一性を有し得る。

【0068】

50

ヒトTAP1由来のNBDアミノ酸配列は、例えば、配列番号8のC662（例えば、C662S）およびC735（例えば、C735S）におけるものに対応する置換を含み得る。ヒトTAP1由来のNBDアミノ酸配列はまた、例えば、以下の配列番号88で太字および斜字体である、配列番号8におけるN676、S677、Q680、E682、およびQ683（例えば、N676G、S677N、Q680R、E682Q、および/またはQ683R）のうちの一つ以上におけるものに対応する置換を含み得る。さらに、ヒトTAP1由来のNBDアミノ酸配列は、配列番号8のD668に対応するアミノ酸での置換（例えば、D668N置換）を含んでもよく、これは、NBD ATP加水分解欠損を引き起こす。したがって、TAP1のNBDポリペプチドアミノ酸配列は、例えば、配列番号88のアミノ酸配列、またはその配列：

10

【化5】

```

1  METEFFQQNQ  TGGGGSGLQT  VRSFSGGGGS  GGSGLL
TPLH  LEGLVQFQDV  SFAYPNRPDV
61  LVLQGLTFTL  RPGEVTALVG  PNGSGKSTVA  ALLQNL
YQPT  GGQLLLDGKP  LPQYEHRYLH
121  RQVAAVGQEP  QVFGRSLEEN  IAYGLTQKPT  MEEITA
AAVK  SGAHSFISGL  PQGYDTEVDE
181  AGSQLSGGQR  QAVALARALI  RKP SVLI LDN_  ATSALD
AGNQ  LRVQRLLYES  PERYSRSVLL
241  ITQHLSLVEQ  ADHILFLEGG  AIREGGTHQQ  LMEKKG
SYWA  MVQAPADAPE (配列番号88)

```

20

に対して90%超もしくは95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。あるいは、NBDアミノ酸配列は、配列番号88に提供される配列の少なくとも300または310個の連続するアミノ酸と97%超または98%超の配列同一性を有し得る。配列番号88に提供されるNBDは、TAP1 NBD配列に加えて、TAP1由来のカップリングヘリックス1（CH1、アミノ酸2～11）、およびTAP2由来のカップリングヘリックス2（CH2、アミノ酸17～25）、ならびに関連するGSリンカー（アミノ酸12～16および25～30）を含み、これらは一緒に配列上の「キャップ」を構成する。TAP1 NBDコンストラクトは、実施例3に示されるように、生物学的発現系において実質的により高いレベルで発現する。

30

【0069】

一部の事例では、ホモ二量体形成しないが、むしろ同族のNBDとヘテロ二量体形成するTAPタンパク質由来のNBDを使用して、本開示のコンストラクトの対（例えば、図2のBおよびDおよび図3を参照）またはコンストラクトの複合体（例えば、図4A）。例えば、ヒトTAP1 NBDおよびヒトTAP2 NBDを有する一対のコンストラクトを調製することができる。TAP1およびTAP2 NBDを含むコンストラクトの対は、十分なATPの存在下でTAP1およびTAP2の相互作用を介してヘテロ二量体を形成する。ヘテロ二量体化することができるTAP1およびTAP2などのNBDを使用することで、免疫細胞刺激のために活性化配列の異なる特定の組み合わせを組み合わせることができる。一例として、IL-12A（p35）、任意選択のリンカーアミノ酸配列、およびTAP1を含むコンストラクトは、IL-12B（p40）、任意選択のリンカーアミノ酸配列、およびTAP2を含むコンストラクトと十分なATPの存在下でヘテロ二量体化して、活性IL-12ABヘテロ二量体を提示するコンストラクトの対を形成することができる。かかるコンストラクトはまた、所望される場合、IgFcアミノ酸配列などのスクフォールドアミノ酸配列を含んでもよい。

40

【0070】

図7は、ヒトTAP2の配列を提供する。一部の事例では、本開示のコンストラクトのNBDは、ヒトTAP2由来のNBD由来のアミノ酸配列、またはヒトTAP2 NBD

50

と90%超もしくは95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。例えば、NBDは、UniProtKB - Q03519 (TAP2_HUMAN)のNBDアミノ酸配列と90%超または95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

```

1  MRLPDLRPWT  S L L L V D A A L L  W L L Q G P L G T L  L P Q
G L P G L W L  E G T L R L G G L W  G L L K L R G L L G
61  F V G T L L L P L C  L A T P L T V S L R  A L V A G A S R A P  P A R
V A S A P W S  W L L V G Y G A A G  L S W S L W A V L S  1 2 1  P P G A Q E
K E Q D  Q V N N K V L M W R  L L K L S R P D L P  L L V A A F F F L V  L A
V L G E T L I P  H Y S G R V I D I L  1 8 1  G G D F D P H A F A  S A I F F
M C L F S  F G S S L S A G C R  G G C F T Y T M S R  I N L R I R E Q L F  S
S L L R Q D L G F  2 4 1  F Q E T K T G E L N  S R L S S D T T L M  S N W L
P L N A N V  L L R S L V K V V G  L Y G F M L S I S P  R L T L L S L L H M
3 0 1  P F T I A A E K V Y  N T R H Q E V L R E  I Q D A V A R A G Q  V V R
E A V G G L Q  T V R S F G A E E H  E V C R Y K E A L E  3 6 1  Q C R Q L Y
W R R D  L E R A L Y L L V R  R V L H L G V Q M L  M L S C G L Q Q M Q  D G
E L T Q G S L L  S F M I Y Q E S V G  4 2 1  S Y V Q T L V Y I Y  G D M L S
N V G A A  E K V F S Y M D R Q  P N L P S P G T L A  P T T L Q G V V K F  Q
D V S F A Y P N R  4 8 1  P D R P V L K G L T  F T L R P G E V T A  L V G P
N G S G K S  T V A A L L Q N L Y  Q P T G G Q V L L D  E K P I S Q Y E H C
5 4 1  Y L H S Q V V S V G  Q E P V L F S G S V  R N N I A Y G L Q S  C E D
D K V M A A A  Q A A H A D D F I Q  E M E H G I Y T D V  6 0 1  G E K G S Q
L A A G  Q K Q R L A I A R A  L V R D P R V L I L  D E A T S A L D V Q  C E
Q A L Q D W N S  R G D R T V L V I A  6 6 1  H R L Q T V Q R A H  Q I L V L
Q E G K L  Q K L A Q L (配列番号11)

```

NBDは、例えば、ヒトTAP2アミノ酸配列に対して90%超または95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

```

G T L A P T T L Q G  V V K F Q D V S F A  Y P N R P D R P V L  K G L T F T L
R P G  E V T A L V G P N G  S G K S T V A A L L  Q N L Y Q P T G G Q  V L L
D E K P I S Q  Y E H C Y L H S Q V  V S V G Q E P V L F  S G S V R N N I A Y
G L Q S C E D D K V  M A A A Q A A H A D  D F I Q E M E H G I  Y T D V G E K
G S Q  L A A G Q K Q R L A  I A R A L V R D P R  V L I L D E A T S A  L D V
Q C E Q A L Q  D W N S R G D R T V  L V I A H R L Q T V  Q R A H Q I L V L Q
E G K L Q K (配列番号12)。

```

NBDはまた、配列番号12と96%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

【0071】

ATP加水分解欠損をもたらすTAP1のD668N置換に対応する触媒酸性アミノ酸残基を除去する変異は、TAP2 NBDアミノ酸配列に組み込まれ得る。

【0072】

(2) NBDとしてのCFTR ATP結合カセット

一部の事例では、本開示のコンストラクトのNBDは、ヒト嚢胞性線維症膜コンダクタンズ制御因子(CFTR)由来のNBD由来のアミノ酸配列、またはヒトCFTRと90%超もしくは95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。例えば、NBDは、UniProtKB - P13569 (配列番号13)のNBDアミノ酸配列に対して90%以上または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

```

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

```

I V R T L L L H P A I F G L H H I G M
 1 5 1 Q M R I A M F S L I Y K K T L K L S S R V L D K I S I G Q L V
 S L L S N N L N K F D E G L A L A H F
 2 0 1 V W I A P L Q V A L L M G L I W E L L Q A S A F C G L G F L I
 V L A L F Q A G L G R M M M K Y R D Q
 2 5 1 R A G K I S E R L V I T S E M I E N I Q S V K A Y C W E E A M
 E K M I E N L R Q T E L K L T R K A A
 3 0 1 Y V R Y F N S S A F F F S G F F V V F L S V L P Y A L I K G I
 I L R K I F T T I S F C I V L R M A V
 3 5 1 T R Q F P W A V Q T W Y D S L G A I N K I Q D F L Q K Q E Y K 10
 T L E Y N L T T T E V V M E N V T A F
 4 0 1 W E E G F G E L F E K A K Q N N N N R K T S N G D D S L F F S
 N F S L L G T P V L K D I N F K I E R
 4 5 1 G Q L L A V A G S T G A G K T S L L M V I M G E L E P S E G K
 I K H S G R I S F C S Q F S W I M P G
 5 0 1 T I K E N I I F G V S Y D E Y R Y R S V I K A C Q L E E D I S
 K F A E K D N I V L G E G G I T L S G
 5 5 1 G Q R A R I S L A R A V Y K D A D L Y L L D S P F G Y L D V L
 T E K E I F E S C V C K L M A N K T R
 6 0 1 I L V T S K M E H L K K A D K I L I L H E G S S Y F Y G T F S 20
 E L Q N L Q P D F S S K L M G C D S F
 6 5 1 D Q F S A E R R N S I L T E T L H R F S L E G D A P V S W T E
 T K K Q S F K Q T G E F G E K R K N S
 7 0 1 I L N P I N S I R K F S I V Q K T P L Q M N G I E E D S D E P
 L E R R L S L V P D S E Q G E A I L P
 7 5 1 R I S V I S T G P T L Q A R R R Q S V L N L M T H S V N Q G Q
 N I H R K T T A S T R K V S L A P Q A
 8 0 1 N L T E L D I Y S R R L S Q E T G L E I S E E I N E E D L K E
 C F F D D M E S I P A V T T W N T Y L
 8 5 1 R Y I T V H K S L I F V L I W C L V I F L A E V A A S L V V L 30
 W L L G N T P L Q D K G N S T H S R N
 9 0 1 N S Y A V I I T S T S S Y Y V F Y I Y V G V A D T L L A M G F
 F R G L P L V H T L I T V S K I L H H
 9 5 1 K M L H S V L Q A P M S T L N T L K A G G I L N R F S K D I A
 I L D D L L P L T I F D F I Q L L L I
 1 0 0 1 V I G A I A V V A V L Q P Y I F V A T V P V I V A F I M L R A
 Y F L Q T S Q Q L K Q L E S E G R S P
 1 0 5 1 I F T H L V T S L K G L W T L R A F G R Q P Y F E T L F H K A
 L N L H T A N W F L Y L S T L R W F Q
 1 1 0 1 M R I E M I F V I F F I A V T F I S I L T T G E G E G R V G I 40
 I L T L A M N I M S T L Q W A V N S S
 1 1 5 1 I D V D S L M R S V S R V F K F I D M P T E G K P T K S T K P
 Y K N G Q L S K V M I I E N S H V K K
 1 2 0 1 D D I W P S G G Q M T V K D L T A K Y T E G G N A I L E N I S
 F S I S P G Q R V G L L G R T G S G K
 1 2 5 1 S T L L S A F L R L L N T E G E I Q I D G V S W D S I T L Q Q
 W R K A F G V I P Q K V F I F S G T F
 1 3 0 1 R K N L D P Y E Q W S D Q E I W K V A D E V G L R S V I E Q F
 P G K L D F V L V D G G C V L S H G H
 1 3 5 1 K Q L M C L A R S V L S K A K I L L L D E P S A H L D P V T Y 50

Q I I R R T L K Q A F A D C T V I L C
 1 4 0 1 E H R I E A M L E C Q Q F L V I E E N K V R Q Y D S I Q K L L
 N E R S L F R Q A I S P S D R V K L F
 1 4 5 1 P H R N S S K C K S K P Q I A A L K E E T E E E V Q D T R L
 【 0 0 7 3 】

NBDは、例えば、ヒトCFTRアミノ酸配列に対して80%超または85%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

V L K D I N F K I E R G Q L L A V A G S T G A G K T S L L M V I M G E L E P S E
 G K I K H S G R I S F C S Q F S W I M P G T I K E N I I F G V S Y D E Y R Y R
 S V I K A C Q L E E D I S K F A E K D N I V L G E G G I T L S G G Q R A R I S L 10
 A R A V Y K D A D L Y L L D S P F G Y L D V L T E K E I F E S C V C K L M A N K
 T R I L V T S K M E H L K K A D K I L I L H E G S S Y F Y G T F S E L Q N L Q P
 D F (配列番号14)。あるいは、NBDは、例えば、配列番号14に対して90%超
 または95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。NBDはまた、配列番号1
 4と96%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

【 0 0 7 4 】

NBDは、例えば、Atwell et al., (2010), Protein
 Engineering, Design & Selection, 23(5) 3
 75-384に記載されるヒトCFTRアミノ酸配列Ser-NBD1[387-646(
 D405-436)]と80%超または85%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含 20
 み得る。S X T T T E V M E N V T A F W E E G G T P V L K D I N F K I E R G Q
 L L A V A G S T G A G K T S L L M V I M G E L E P S E G K I K H S G R I S F C S
 Q F S W I M P G T I K E N I I F G V S Y D E Y R Y R S V I K A C Q L E E D I S K
 F A E K D N I V L G E G G I T L S G G Q R A R I S L A R A V Y K D A D L Y L L D
 S P F G Y L D V L T E K E I F E S C V C K L M A N K T R I L V T S K M E H L K K
 A D K I L I L H E G S S Y F Y G T F S E L Q N L Q P D F S S K L M X (配列番号
 15)、式中、2位のXは、存在しないか、またはLであってもよく、229位のXは、
 存在しないか、またはGであってもよい。あるいは、NBDは、例えば、配列番号15に
 対して90%超または95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。NB 30
 Dはまた、配列番号15と96%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を
 含んでもよい。NBDは、例えば、配列番号16のアミノ酸1~216に対して90%超
 または95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよく、2位のXは、存在し
 ないか、またはLであってもよい。

【 0 0 7 5 】

2. スキャフォールド

スキャフォールドアミノ酸配列は、インピボでの分子の半減期を延長するために、構造
 的構造の手段として本明細書に記載のATP依存性アゴニストコンストラクトに組み込ま
 れてもよく、ADCC、ADCP、および/またはCDCを誘導することができる場合、
 それらのエフェクター機能の基礎として作用してもよい。スキャフォールドは、二量体お
 よびより高次の複合体(例えば、三量体)または非二量体化可能(非二量体化)を形成す 40
 ることができてもよく、その場合、二量体またはより高次の複合体を形成しない。本明細
 書に記載されるコンストラクトに組み込まれたスキャフォールドは、例えば、免疫グロブ
 リン(Ig)アミノ酸配列または非免疫グロブリンアミノ酸配列を含み得る。

【 0 0 7 6 】

一部の実施形態では、スキャフォールドポリペプチド配列は、二量体形成または多量体
 形成配列として機能する免疫グロブリン重鎖定常領域(CH2-CH3)ポリペプチド配
 列を含む。スキャフォールドが免疫グロブリン(Ig)アミノ酸配列を含む場合、それは
 、免疫グロブリン重鎖定常領域(CH2-CH3)ポリペプチドアミノ酸配列(例えば、
 IgFcアミノ酸配列)を含み得る。スキャフォールドアミノ酸配列は、例えば、二量体
 形成を防止するために改変されたIg CH2および/またはCH3アミノ酸配列を含み 50

得る。I g 重鎖二量体を安定化する鎖間ジスルフィド結合に關与する任意の一つ以上のシステインは、I g 重鎖配列がホモ二量体化して鎖間ジスルフィド結合を形成することができないように、(例えば、アラニンまたはセリンで)置換されてもよい。スキヤフォールドポリペプチドは、(配列番号56)の野生型(wt)ホモサピエンスI g G1 Fcポリペプチド配列を含み得る。

```
1 DKTHTCPCPCP APELLGGPSV FLFPKPKKDT LMI
SRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
```

```
61 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDW
LNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
```

```
121 GQPREPQVYT LPPSRREEMTK NQVSLTCLVK GFY 10
PSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
```

```
181 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALH
NHYTQKS LSLSPGK ; 任意選択的に、二量体形成を防止するように改変さ
れる。あるいは、スキヤフォールドは、例えば、配列番号56と90%超または95%超
の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。スキヤフォールドはまた、配列番号56
と96%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。
```

【0077】

スキヤフォールドポリペプチドは、LALA置換(L234A、L235A置換、それぞれ太字および斜体のアミノ酸14および15として現れる)を含む、配列番号57のホモサピエンスI g G1 Fcアミノ酸配列を含み得る。

【化6】

```
1 DKTHTCPCPCP APEAAGGPSV FLFPKPKKDT LMISRT
PEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
```

```
61 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNG
KEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
```

```
121 GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSD
IAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
```

```
181 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHY
TQKS LSLSPG ;
```

30

任意選択的に、二量体形成を防止するように改変される。あるいは、スキヤフォールドは、例えば、配列番号57と90%超または95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。スキヤフォールドはまた、配列番号57と96%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

【0078】

非二量体形成スキヤフォールドは、ヒト単鎖Fc(scFc)二量体として調製されてもよい。例えば、Zhou et al., Biomaterials 117:24-31(2017)を参照。そのようなscFc二量体は、I g G1に基づいてもよく、以下の配列を有してもよい。

```
1 DKTHTCPCPCP APELLGGPSV FLFPKPKKDT LMI
SRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
```

```
61 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDW
LNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK 121 GQPREP
```

```
QVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WE
SNGQPENN YKTTTPVLDS 181 DGSFFLYSKL TVDKS
```

```
RWQQG NVFSCSVMHE ALHNHHTQKS LSLSPGGGGG S
GGGGSGGGG 241 SGGGGSGGGG SGGGGSDKTH TCPP
```

```
CPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV
```

```
301 DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYN 50
```

STYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS 361 NKALPA
 PIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LT
 CLVKGFYP SDIAVEWESN 421 GQPENNYKTT PPVLD
 SDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN H
 YTQKSLSL 481 PG (配列番号102)。あるいは、スキヤフォールドは、例えば、配列番号102に対して90%超または95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。スキヤフォールドはまた、配列番号102と96%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。配列番号102のスキヤフォールドコンストラクトは、ADCC、ADCP、およびCDCの誘導の能力があるが、以下で論じる「LALA」を含む置換を導入して、それらのエフェクター機能を誘導するscFcの能力を選択的に変化させ得る。

10

【0079】

スキヤフォールドポリペプチドは、配列番号58のwt Homo sapiens IgG2 Fcポリペプチドを含んでもよい (GenBank AAN76044アミノ酸99~325を参照) :

1 STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD YFP
 EPVTVSW NSGALTSQVH TFPVAVLQSSG

61 LYSLSLVVTV PSSNFGTQTY TCNVDHKPSN TKV
 DKTV ERK CCVECP PCA PPVAGPSVFL

121 FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VQF
 NWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTFRV

181 VSVLTVVHQD WLVNGKEYKCK VSNKGLPAPI EKT
 ISKTKGQ PREPQVYTL PPSREEMTKNQ

241 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTP
 PMLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV

301 FSCSVMHEAL HNHYTQKSL LSPGK; 任意選択的に、二量体形成を防止するように改変される。あるいは、スキヤフォールドは、例えば、配列番号58に対して90%超または95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。スキヤフォールドはまた、配列番号58と96%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

20

30

【0080】

スキヤフォールドポリペプチドは、配列番号59のwt Homo sapiens IgG3 Fcポリペプチド (例えば、GenBank AAW65947アミノ酸19~246を参照) を含み得る。

1 HKPSNTKVDK RVELKTP LGD THTTCP PCA PEL
 LGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC

61 VVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REE
 QYNSTYR VSVLTVLHQ DWLVNGKEYKC

121 KVS NKALPAP IEKTI SKAKG QPREPQVYTL PPS
 RDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW

181 ESNGQPENNY KTT PPVLDSD GSFFLYSKLT VDK
 SRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL

241 LSPGK; 任意選択的に、二量体形成を防止するように改変されている。あるいは、スキヤフォールドは、例えば、配列番号59と90%超または95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。スキヤフォールドはまた、配列番号59と96%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

40

【0081】

スキヤフォールドポリペプチドは、配列番号60のwt Homo sapiens IgG4 Fcポリペプチドを含み得る。

1 PPCPSCPAP E FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRT

50

PEVTCVV VDV SQEDPEV QFNWYVDGVE
 61 VHN AKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNG
 KEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
 121 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSD
 IAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS

181 FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHY
 TQKSLSL SPG; 任意選択的に、二量体形成を防止するように改変される。あ
 るいは、スキヤフォールドは、例えば、配列番号60と90%超または95%超の配列同
 一性を有するアミノ酸配列を含み得る。スキヤフォールドはまた、配列番号60と96%
 超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

10

【0082】

例えばADCCおよびADCPをもたらす抗体のIgGクラスの相互作用は、受容体の
 Fcファミリー(FcR)のメンバーと結合するそれらのFc領域によって生じる。
 ヒトタンパク質ファミリーは、FcRI(CD64)、FcRII(アイソフォーム
 FcRIIa、FcRIIb、およびFcRIIcを含むCD32)、およびFc
 RIII(アイソフォームFcRIIIaおよびFcRIIIbを含むCD16
)からなる。例えば、Lazar et al.(2006)PNAS:103(11
), 4005-4010を参照。

【0083】

一つ以上の抗体関連エフェクター機能(例えば、ADCC、ADCP、および/または
 CDC応答)を強化することができるバリエーションのうち、ヒトIgG1中のS239Dお
 よびI332Eの個々の置換、ならびにS239D/I332EおよびS239D/I3
 32E/A330Lでの二重置換および三重置換がある。ヒトIgG1Fc配列(配列
 番号56)中のS239D、I332E、およびA330Lに対応する置換は、S19D
 、I112E、およびA110Lである。一実施形態では、置換は、二重変異体S239
 D/I332EまたはS239D/I332E/A330Lである。Lazar et
 al., 2006を参照。

20

【0084】

IgG1antibodiesにおける一つ以上の抗体関連エフェクター機能を強化す
 る他の置換としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: Ser298Al
 a/Glu333Ala/Lys334Ala; Ser239Asp/Ala330
 Leu/Ile332Glu; Ser239Asp/Ile332Glu; Gly
 236Ala/Ser239Asp/Ala330Leu/Ile332Glu; G
 ly236Ala; Ser239Asp/Ile332Glu/Gly236Ala
 ; Leu234Tyr/Gly236Trp/Ser298Ala; Phe243
 Leu/Arg292Pro/Tyr300Leu/Val305Ile/Pro396
 Leu; Lys326Trp/Glu333Ser; Lys326Ala/Glu
 333Ser; Lys326Met/Glu333Ser; Cys221Asp
 /Asp222Cys; Ser267Glu/His268Phe/Ser324T
 hr; His268Phe/Ser324Thr; およびGlu345Arg。
 Saunders KO(2019)Front. Immunol. 10:129
 6.doi:10.3389/fimmu.2019.01296を参照。配列番号5
 6のIgG1Fc配列の対応する位置は、示された位置から220を減算することによ
 って得ることができる。一実施形態では、少なくともADCCは、置換によって増強され
 る。一実施形態では、少なくともADCPは、置換によって増強される。一実施形態では
 、少なくともCDCは、置換によって増強される。一実施形態では、少なくとも補体固定
 は、置換によって強化される。

30

40

【0085】

IgG1抗体の一つ以上の抗体関連エフェクター機能(例えば、ADCC、ADCP、
 および/またはCDC応答)を実質的に減少させることができるバリエーションとしては、以

50

下が挙げられるが、これらに限定されない：Leu 235 Glu； Leu 234 Ala / Leu 235 Ala (LALA)； Ser 228 Pro / Leu 235 Glu； Leu 234 Ala / Leu 235 Ala / Pro 329 Gly； Pro 331 Ser / Leu 234 Glu / Leu 235 Phe； Asp 265 Ala； Gly 237 Ala； Glu 318 Ala； Glu 233 Pro； および Gly 236 Arg / Leu 328 Arg。上述のように、配列番号56として提供されるIgG1 Fc配列におけるそれらの置換の対応する位置は、示される位置から220を減算することによって得ることができる。一実施形態では、スキファールド配列は、LALA置換を有するIgG1 Fc配列を含む（例えば、配列番号57を参照）。一実施形態では、少なくともADCCは、置換によって実質的に減少する。一実施形態では、少なくともADCPは、置換によって実質的に減少する。一実施形態では、少なくともCDCは、置換によって実質的に減少する。一実施形態では、少なくとも補体固定は、置換によって実質的に減少する。例えば、Saunders 2019およびその中の引用を参照のこと。一実施形態では、IgG1 Fc置換は、S239D / I332E / A330Lであってもよく、これはCDC機能を実質的に変化させることなくADCCの強化を可能にする（Lazar et al. , 2006を参照）。

10

【0086】

一つ以上の抗体関連エフェクター機能を実質的に減少させることができるIgG1、IgG2、およびIgG4抗体配列中の他のパリアントとしては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：His 268 Gln / Val 309 Leu / Ala 330 Ser / Pro 331 Ser (IgG2m4)； Val 234 Ala / Gly 237 Ala / Pro 238 Ser / His 268 Ala / Val 309 Leu / Ala 330 Ser / Pro 331 Ser (IgG2)； Leu 234 Ala / L235 Ala / Gly 237 Ala / P238 Ser / His 268 Ala / Ala 330 Ser / Pro 331 Ser (IgG1)； および S228P / Phe 234 Ala / Leu 235 Ala (IgG4 PAA)。例えば、Saunders 2019およびその中の引用を参照のこと。

20

【0087】

代替的な非二量体化スキファールドドメインとしては、以下に限定されないが、XTEN化、PEG化、脂質化（ワールドワイドウェブ「www」上のpubs.acs.org/doi/10.1021/acsmmedchemlett.8b00226）ヒト血清アルブミン（HSA）融合物（www上のnature.com/articles/s42003-021-01790-2）および抗HSA結合ドメイン、抗HSAペプチドを含むがこれに限定されない（www上のpubs.acs.org/doi/10.1021/acsmolpharmaceut.2c00106）、抗体および抗体断片（例えば、ScFv、FAB、など）およびVHHドメイン（www上のsemananticscholar.org/paper/Serum-albumin%E2%80%90binding-VHHS-with-variable-pH-enable-Faassen-Ryan/d34256a0d39a0ab92db9195210fa0fc7430758b6）を参照のこと。

30

【0088】

3. リンカー

本開示のコンストラクトは、任意選択的に、任意の二つの要素の間に位置するリンカーを有する。リンカーは、NBDアミノ酸配列、スキファールドアミノ酸配列、およびADのうちのいずれか二つの間に位置し得る。リンカーは、典型的には、4～50アミノ酸の長さ（例えば、4～25アミノ酸または25～50アミノ酸）のアミノ酸配列からなり、とりわけ、それらの剛性のために選択され得る。リンカーはそれぞれ独立して選択される。

40

【0089】

一部の例では、リンカーは、グリシン、セリン、および/またはアラニン残基からなる可撓性アミノ酸配列である。他の例では、リンカーは、グリシンおよびセリンからなるア

50

ミノ酸配列である。例えば、配列 G G G S (配列番号 16) または配列 G G G G S (配列番号 26) は、リンカー (G G G S)_{1~10} (配列番号 16~25) または (G G G G S)_{1~10} (配列番号 26~35) において 1~10 回出現するか、または反復され得る。リンカーが G G G S または G G G G S 配列を含む場合もあり、それらの配列は 1~5 回または 5~10 回出現してもよい。

【0090】

剛性リンカーは、コンストラクトのドメイン間 (例えば、同じコンストラクト中の N B D 間) の好ましくない相互作用を低減または実質的に排除するために、ドメイン間の実質的に固定された距離または空間的分離を維持することが望ましい場合に用いられ得る。例えば、単一分子中に存在する一対の N B D は、剛直なリンカーの使用を通して自己会合から保たれ得る。例示的な剛直なペプチドまたはポリペプチドリンカーとしては、配列 X (E A A A K)_nX を含むリンカーが挙げられ、式中、E A A A K は、1~20 倍 (すなわち、配列番号 36~55 の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 倍) のリンカー中に存在してもよく、X は存在しないか、またはアラニンである。リンカーが X (E A A A K)_nX 配列を含む一部の場合、n は 1~5 または 5~10 であり得る。リンカーが X (E A A A K)_nX 配列を含む一部の場合、n は 11~15 または 16~20 であってもよい。あるいは、剛直なペプチドリンカーは、4~40 (例えば、4~20 または 20~40 アミノ酸) の長さを有する (Lys-Pro)、(Glu-Pro)、(Thr-Pro-Arg)、および (Ala-Pro) の反復を含み得る。他の剛直なリンカーとしては、2~10 回または 10~20 回のジペプチド配列 K P または E P の反復を含むリンカーが挙げられる。

【0091】

4. 免疫細胞誘導ドメイン

免疫細胞誘導ドメイン (複数の場合、免疫細胞エンゲージャー、I C E、または I C E と呼ばれる) は、免疫細胞表面分子に結合することができる N B D 含有コンストラクトのドメインである。免疫細胞エンゲージャーは、典型的には、抗体関連分子 / アミノ酸配列 (例えば、抗体、F a b、F a b'、単鎖抗体、s c F v、ペプチドアプタマー、またはナノボディの抗原結合断片) である。別段の記載がない限り、免疫細胞エンゲージャーは、個々の分子が細胞標的 (例えば、免疫細胞表面抗原) を架橋し、免疫細胞の標的刺激から外れることを防止するために、一価であると理解される。個々の免疫細胞エンゲージャーは、概して、アゴニストとして作用することができず、それらが結合する免疫細胞を刺激することができないが、免疫細胞エンゲージャーを有する複数のコンストラクトが複合体に局在化されるときである (例えば、図 4 A の D または E を参照)、または腫瘍細胞の表面上に固定化された (例えば、図 3 の C などのコンストラクトを使用して) 場合、免疫細胞エンゲージャーは、免疫細胞刺激 / 活性化のアゴニストとして機能し得る。

【0092】

免疫細胞エンゲージャーは、T M E に現れるか、または T M E にリクルートされ得る、いくつかの異なる免疫細胞に向けられ得る。かかる免疫細胞およびそれらの対応する免疫細胞エンゲージャーの標的は、表 1 に記載されるものを含む。

10

20

30

40

【表 1】

表 1 一部の免疫細胞およびそれらの対応する免疫細胞エンゲージャー

免疫細胞	免疫細胞エンゲージャー標的/免疫細胞エンゲージャー (例えば、標的に対して向けられた抗体または抗体関連分子*)
CD4+T 細胞	CD3/抗 CD3 γ または抗 CD3 ϵ ; $\alpha\beta$ TCR/抗 TCR α 鎖または抗 TCR β 鎖 ; CD4/抗 CD4
CD4+ Treg	CD25、
CD8+T 細胞	CD3/抗 CD3 γ または抗 CD3 ϵ ; $\alpha\beta$ TCR/抗 TCR α 鎖または抗 TCR β 鎖 CD8/抗 CD8
$\delta\gamma$ T 細胞	$\delta\gamma$ TCR/抗 TCR δ 鎖または抗 TCR γ 鎖 (例えば、TRGV9/抗 TRGV9
NK 細胞	CD16/抗 CD16
MDSC (骨髄由来抑制細胞)	CD84/抗 CD84、CXCR1/抗 CXCR1、DR5/抗 DR5、CD13/抗 CD13; CD33/抗 CD33、CD34/抗 CD34、CD16/抗 CD16

*抗体関連分子としては、抗体、Fab、Fab₂、および単鎖抗体、scFv、ペプチドアダプター、またはナノボディアミノ酸配列を含むポリペプチドの抗原結合断片が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0093】

表 1 に列挙されるものなどの免疫細胞エンゲージャーが、TAA に向けられた腫瘍特異的結合剤を含む第二の NBD 含有コンストラクトと対合または複合体形成することができる第一の NBD 含有ポリペプチドコンストラクトに組み込まれる場合、その細胞溶解につながる腫瘍細胞のトランス標的化が観察され得る (例えば、図 3 の C、D、および F - H、ならびに図 4 A の E、F、H、および I を参照)。免疫細胞表面タンパク質に対して指向される抗体関連分子 / アミノ酸配列の組み込みは、そのようなコンストラクトおよび複合体中に CD3、TCR、および / または CD16 を含むが、これらに限定されない、強力な細胞溶解作用を生じ得る。細胞溶解活性は、二つ以上のタイプの免疫細胞と相互作用する免疫細胞エンゲージャーが採用される場合に強化され得る。一部の例示的な抗 CD3 免疫細胞エンゲージャーは、以下を提供する。

30

【0094】

免疫細胞エンゲージャーポリペプチドは、以下の配列 :

A I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D I R N Y L N W Y Q Q K
P G K A P K L L I Y Y T S R L E S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L
Q P E D F A T Y Y C Q Q G N T L P W T F G Q G T K V E I K G G G G S G G G G S G
G G G S G G G G S G G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y
S F T G Y T M N W V R Q A P G K G L E W V A L I N P Y K G V T T Y A D S V K G R
F T I S V D K S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S G Y Y G D S D W
Y F D V W G Q G T L V T V S S (配列番号 61) を有する U C H T - 1 モノクローナル
抗体に基づく s c F v、抗ヒト CD3 であってもよい。免疫細胞エンゲージャーはまた、
配列番号 61 に対し、90% 超または 95% 超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含ん
でもよい。さらに、免疫細胞エンゲージャーは、配列番号 61 に対し、96% 超または 9
8% 超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

40

【0095】

免疫細胞エンゲージャーポリペプチドは、以下の配列 :

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

50

S F T G Y T M N W V R Q A P G K G L E W V A L I N P Y K G V S T Y N Q K F K D R
 F T I S V D K S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R S G Y Y G D S D W
 Y F D V W G Q G T L V T V S S (配列番号62)を有するUCHT-1モノクローナル
 抗体に基づくs c F v、抗ヒトCD3であってもよい。免疫細胞エンゲージャーはまた、
 配列番号62に対し、90%超または95%超の配列同一性を有する配列を含んでもよい。
 さらに、免疫細胞エンゲージャーは、配列番号62に対し、96%超または98%超の
 配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

【0096】

免疫細胞エンゲージャーポリペプチドは、以下の配列：

Q V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G S I F S A N T M G W Y R Q A 10
 P G K Q R E L V A G M N T S G S T V Y G D S V K G R F T I S R D N A K N I A Y L
 Q M N S L I P E D T A V Y Y C T L V Q R G P N Y W G Q G T Q V T V S S (配列番号
 63)を有する抗ヒトCD3 VHHであってもよい。免疫細胞エンゲージャーはまた、
 配列番号63に対し、90%超または95%超の配列同一性を有する配列を含んでもよい。
 さらに、免疫細胞エンゲージャーは、配列番号63に対し、96%超または98%超の
 配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

【0097】

免疫細胞エンゲージャーポリペプチドは、以下の配列：

D V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T R Y T M H W V R Q A
 P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y A D S V K G R F T I T T D K S T S T A 20
 Y M E L S S L R S E D T A T Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T V T V S S
 G G G S G G G S G G G S D I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A
 S Q S V S Y M N W Y Q Q K P G K A P K R W I Y D T S K V A S G V P A R F S G S G
 S G T D Y S L T I N S L E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G G G T K V E I
 K (配列番号64)を有するL2K抗体に基づく抗ヒトCD3 s c F v (vH-vL)
 であってもよい。免疫細胞エンゲージャーはまた、配列番号64に対し、90%超または
 95%超の配列同一性を有する配列を含んでもよい。さらに、免疫細胞エンゲージャーは
 、配列番号64に対し、96%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含
 んでもよい。

【0098】

免疫細胞エンゲージャーポリペプチドは、配列番号65に記載される配列を有するL2
 K抗体に基づく抗ヒトCD3 s c F v (vH-vL)であってもよく、Q43Cおよび
 G99Cでのシステイン置換(示されるG233C)の間にジスルフィド結合を含む。D
 V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T R Y T M H W V R Q A
 P G C G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y A D S V K G R F T I T T D K S T S T A Y
 M E L S S L R S E D T A T Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T V T V S S G
 G G S G G G S G G G S D I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S
 Q S V S Y M N W Y Q Q K P G K A P K R W I Y D T S K V A S G V P A R F S G S G S
 G T D Y S L T I N S L E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N P L T F G C G T K V E I K
 (配列番号65)。免疫細胞エンゲージャーはまた、配列番号65と90%超または95 40
 %超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。さらに、免疫細胞エンゲージャー
 は、配列番号65に対し、96%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列
 を含んでもよい。

【0099】

免疫細胞エンゲージャーポリペプチドは、配列番号66に記載される配列を有するL2
 K抗体に基づく抗ヒトCD3 s c F v (vH-vL)であってもよく、Q43Cおよび
 G100Cでのシステイン置換(示されるG234C)の間にジスルフィド結合を含む。
 D V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T R Y T M H W V R Q
 A P G C G L E W I G Y I N P S R G Y T N Y A D S V K G R F T I T T D K S T S T A
 Y M E L S S L R S E D T A T Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T V T V S S 50

GGGGS GGGGS GGGGS DIVLTQS PATLSLS SPGERATLS CRA
 SQSVSYMNWY QQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSG
 SGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGCTKVEI
 K (配列番号66)。免疫細胞エンゲージャーはまた、配列番号66に対し、90%超ま
 たは95%超の配列同一性を有する配列を含んでもよい。さらに、免疫細胞エンゲージャ
 ーは、配列番号66に対し、96%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列
 を含んでもよい。

【0100】

免疫細胞エンゲージャーポリペプチドは、配列番号67に記載される配列を有するL2
 K抗体に基づく抗ヒトCD3 scFv (vH-vL)であってもよく、G44Cおよび
 :G99Cでのシステイン置換(示されるG233C)の間にジスルフィド結合を含む。
 DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWV RQ
 APGQCLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAY
 YMELSSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSS
 GGGGS GGGGS GGGGS DIVLTQS PATLSLS SPGERATLS CRA
 SQSVSYMNWY QQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSG
 SGTDYSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGCTKVEI
 K (配列番号67)。免疫細胞エンゲージャーはまた、配列番号67に対し、90%超ま
 たは95%超の配列同一性を有する配列を含んでもよい。さらに、免疫細胞エンゲージャ
 ーは、配列番号67に対し、96%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列
 を含んでもよい。

【0101】

免疫細胞エンゲージャーポリペプチドは、配列番号68に記載される配列を有するL2
 K抗体に基づく抗ヒトCD3 scFv (vH-vL)であってもよく、G44Cおよび
 G100Cでのシステイン置換(示されるG234C)の間にジスルフィド結合を含む。

1 DVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT RYT
 MHWVRQA PGQCLEWIGY INPSRGYTNY
 61 ADSVKGRFTI TTDKSTSTAY MELSSLRSED TAT
 YYCARYY DDHYCLDYWG QGTTVTVSSG 121 GGGSGG
 GGS GGGSDIVLTQ SPATLSLSPG ERATLSCRAS QS
 VSYMNWYQ QKPGKAPKRW 181 IYDTSKVASG VPARF
 SSGSGS GTDYSLTINS LEAEDAATYY CQQWSSNPLT F
 GGCTKVEIK (配列番号68)。免疫細胞エンゲージャーはまた、配列番号68に
 対し、90%超または95%超の配列同一性を有する配列を含んでもよい。さらに、免疫
 細胞エンゲージャーは、配列番号68に対し、96%超または98%超の配列同一性を有
 するアミノ酸配列を含んでもよい。

【0102】

配列番号61~62および64~68の反復を含むGGGS(配列番号16)および/
 またはGGGS(配列番号26)は、ドメイン間のリンカー配列である。

【0103】

5. 免疫細胞活性化ドメイン(活性化ドメイン)

本開示のコンストラクトに組み込まれ得る活性化ドメイン(「ADs」または単数形
 の場合「AD」)には、二量体またはより高次の複合体として提示された場合に抗腫瘍細
 胞免疫応答を刺激することができるが、単数形提示された場合に免疫細胞を刺激する能力
 は限定的である、様々な分子または分子断片(例えば、サイトカインの断片)が含まれる
 。最大活性のために受容体架橋を必要とする一部の免疫細胞アゴニストとしては、CD4
 0L、CD28、IFN-g、およびIL-12が挙げられるが、これらに限定されない
 。抗腫瘍細胞免疫応答は、例えば、ADを含むコンストラクトによるNK細胞またはT細
 胞(例えば、CD8+ T細胞)の刺激から生じる場合があり、顆粒依存性および顆粒非
 依存性の応答を含みうる。

10

20

30

40

50

【0104】

ADは、例えば、TNF、リンパ毒素、リンパ毒素、およびBAFF(CD25)などのTNFスーパーファミリーメンバーのアミノ酸配列を含み得る。ADはまた、例えば、CD80およびCD86などのB7スーパーファミリーメンバーのアミノ酸配列を含んでもよい。ADはまた、例えば、IL-15、IL-12、IL-2、またはIL-7のすべてまたは一部のアミノ酸配列(例えば、細胞外ドメインのすべてまたは一部の配列)を含んでもよい。ADは、例えば、IL-12のアミノ酸配列のすべてまたは一部(例えば、ヒトIL-12の一方または両方のサブユニット)を含み得る。

【0105】

例として、TMEに見られるATPレベルの存在下での、ホモ二量体形成するコンストラクト(例えば、図2のAおよびCを参照)、またはホモマー複合体を形成するコンストラクト(例えば、図4AのAを参照)は、IL-15、IL-12、またはIL-7の免疫調節性アミノ酸配列を含むが、これらに限定されない。抗PD1、抗PDL1、抗CD40、抗CD40L、抗CD137/4-1BB、抗TGF、抗IL-10、または抗IL10R結合活性を有する抗体関連配列(例えば、単鎖scFVまたはナノボディ配列)も用いられ得る。

【0106】

前述に加えて、CpGリピートまたは一つ以上のIMT504配列を有する核酸を含む核酸は、ADとして使用されてもよく、ホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成のNBD含有コンストラクトに組み込まれてもよい。

【0107】

ADは、例えば、CD80ポリペプチドアミノ酸配列を含んでいてもよい。

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

6 1 I T N N L S I V I L A L R P S D E G T Y E C V V L K Y E K D A F K
R E H L A E V T L S V K A D F P T P S I S D F E I P T 1 2 1 S N I R R I
I C S T S G G F P E P H L S W L E N G E E L N A I N T T V S Q D P E T E
L Y A V S S K L D F N M T T N H S F 1 8 1 M C L I K Y G H L R V N Q T F

NWNTT K(配列番号99)。あるいは、ADは、配列番号99と少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含んでもよい。ADはまた、配列番号99の少なくとも170または180の連続するアミノ酸と少なくとも96%または少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0108】

ADは、例えば、CD86(IgV-IgCドメイン)

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

6 1 T S F D S D S W T L R L H N L Q I K D K G L Y Q C I I H H K K P T
G M I R I H Q M N S E L S V L A N F S Q P E I V P I S 1 2 1 N I T E N V
Y I N L T C S S I H G Y P E P K K M S V L L R T K N S T I E Y D G I M Q
K S Q D N V T E L Y D V S I S L S V 1 8 1 S F P D V T S N M T I F C I L
E T D K T R L L S S P F S I E L E D P Q P P P D H I P (配列番号100)、

またはCD86 IgVドメイン:

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

6 1 T S F D S D S W T L R L H N L Q I K D K G L Y Q C I I H H K K P T
G M I R I H Q M N S E L S V L A (配列番号101)を含むCD86ポリペプチドア

ミノ酸配列を含んでもよい。あるいは、ADは、配列番号100または101と少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含んでもよい。ADはまた、配列番号100または101の少なくとも100または110の連続するアミノ酸と少なくとも96%または少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含んでもよい。

10

20

30

40

50

【0109】

ADは、例えば、アゴニストとしてIL-12に結合するアミノ酸配列（例えば、IL-12または抗CD28 scFvまたはナノボディアミノ酸配列）を含み得る。ADは、例えば、配列

```

1  IWELKKD VYV  VELDWYPDAP  GEMVVLTCDT  PEE
DGITWTL  DQSSEVLGSG  KTLTIQVKEF
61  GDAGQYTCHK  GGEVLSHSL  LLHKKEDGIW  STD
ILKDQKE  PKNKTLRCE  AKNYSGRFTC
121  WWLTTISTDL  TFSVKSSRGS  SDPQGVTCGA  ATLSA
AERV RG  DNKEYEYSVE  CQEDSACPAA
181  EESLPIEVMV  DAVHKLKYEN  YTSSFFIRDI  IKPD
PDKNLQ  LKPLKNSRQV  EVSWEYPDTW
241  STPHSYFSLT  FCVQVQGKSK  REKKDRVFTD  KTS
ATVICRK  NASISVRAQD  RYYSSSWSEW
301  ASVPCS GGGG  SGGGSGGGG  SRNLPVATPD  PGM
FPC LHHS  QNLLRAVSNM  LQKARQTLF
361  YPCTSEEIDH  EDITKDKTST  VEACLPLELT  KNE
SCLNSRE  TSFITNGSCL  ASRKTSFMMA
421  LCLSSIYEDL  KMYQVEFKTM  NAKLLMDPKR  QIF
LDQNMLA  VIDELMQALN  FNSETVPQKS
481  SLEEPDFYKT  KIKLCILLHA  FRIRAVTIDR  VMS
YLNAS

```

(配列番号90)を含むIL-12を含んでいてもよく、これは、p40サブユニットの断片、GGGGSのリンカーリピート、およびp35サブユニットの断片を含む。あるいは、ADは、配列番号90と少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含んでもよい。ADはまた、配列番号90の少なくとも480または500の連続するアミノ酸と少なくとも96%または少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0110】

上述のように、本開示のコンストラクトは、ATPの存在下でヘテロ二量体化するNBDを含み得る。したがって、ヘテロ二量体形成NBDを含む第一のコンストラクトと第二のコンストラクトとの間の複合体を使用して、ADを組み立てることができる。例えば、BおよびDの図2を参照されたい)。例えば、IL-12 ADは、ATPの存在下で、以下を採用することによって形成され得る。

(i) 以下の配列を含むp40サブユニット（第一の免疫調節ドメインとして）を含む第一のコンストラクト、

```

1  IWELKKD VYV  VELDWYPDAP  GEMVVLTCDT  PEE
DGITWTL  DQSSEVLGSG  KTLTIQVKEF
61  GDAGQYTCHK  GGEVLSHSL  LLHKKEDGIW  STD
ILKDQKE  PKNKTLRCE  AKNYSGRFTC  121  WWLTTI
STD L  TFSVKSSRGS  SDPQGVTCGA  ATLSA  AERV RG  DN
KEYEYSVE  CQEDSACPAA  181  EESLPIEVMV  DAVHK
LKYEN  YTSSFFIRDI  IKPD  PDKNLQ  LKPLKNSRQV  E
VSWEYPDTW  241  STPHSYFSLT  FCVQVQGKSK  REKK
DRVFTD  KTS  ATVICRK  NASISVRAQD  RYYSSSWSEW
301  ASVPCS

```

(配列番号91)、または配列番号91と少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を有する配列、ならびに

(ii) 以下の配列を含むp35サブユニット（第二の免疫調節ドメインとして）を含む第二のコンストラクトであって、

```

1  RNLPVATPD  GMFPCLHHSQ  NLLRAVSNML  QKA
RQTLF  Y  PCTSEEIDHE  DITKDKTSTV  061  EAACLPL

```

E L T K N E S C L N S R E T S F I T N G S C L A S R K T S F M M A L C L
 S S I Y E D L K M Y Q V E F K T M N 1 2 1 A K L L M D P K R Q I F L D Q
 N M L A V I D E L M Q A L N F N S E T V P Q K S S L E E P D F Y K T K I
 K L C I L L H A F 1 8 1 R I R A V T I D R V M S Y L N A S (配 列 番 号 9 2)
 、 または配列番号92と少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む。

【0111】

A D は、例えば、P D 1 に結合するアミノ酸配列（例えば、抗 P D 1 s c F v またはナノボディアミノ酸配列）または P D L 1 に結合するアミノ酸配列（例えば、抗 P D L 1 s c F v またはナノボディアミノ酸配列）のすべてまたは一部を含み得る。

10

【0112】

A D は、例えば、C D 4 0 に結合するアミノ酸配列（例えば、抗 C D 4 0 s c F v もしくはナノボディアミノ酸配列もしくは C D 4 0 L アミノ酸配列）、または C D 4 0 L に結合するアミノ酸配列（例えば、抗 C D 4 0 L s c F v もしくはナノボディアミノ酸配列、もしくは C D 4 0 アミノ酸配列）を含み得る。A D として用いられ得るポリペプチドは、C D 4 0 L アミノ酸配列：

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

6 1 T F C S N R E A S S Q A P F I A S L C L K S P G R F E R I L L R
 A A N T H S S A K P C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G A 1 2 1 S V F V N

20

V T D P S Q V S H G T G F T S F G L L K L (配 列 番 号 9 6) 、 または配列番号96と少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。あるいは、A D として採用され得るポリペプチドは、リンカー配列（例えば、G G G G S リピートを含むリンカー配列）によって分離された C D 4 0 L アミノ酸配列の三量体を含む：

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

6 1 T F C S N R E A S S Q A P F I A S L C L K S P G R F E R I L L R A
 A N T H S S A K P C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G A 1 2 1 S V F V N V

30

T D P S Q V S H G T G F T S F G L L K L G G G G S G G G G S G G G G S G
 D Q N P Q I A A H V I S E A S S K T 1 8 1 T S V L Q W A E K G Y Y T M S
 N N L V T L E N G K Q L T V K R Q G L Y Y I Y A Q V T F C S N R E A S S

Q A P F I A S L C 2 4 1 L K S P G R F E R I L L R A A N T H S S A K P C
 G Q Q S I H L G G V F E L Q P G A S V F V N V T D P S Q V S H G T G F T

3 0 1 S F G L L K L G G G G S G G G G G S G G G G S G D Q N P Q I A A H V
 I S E A S S K T T S V L Q W A E K G Y Y T M S N N L V 3 6 1 T L E N G K

Q L T V K R Q G L Y Y I Y A Q V T F C S N R E A S S Q A P F I A S L C L
 K S P G R F E R I L L R A A N T H S 4 2 1 S A K P C G Q Q S I H L G G V

40

F E L Q P G A S V F V N V T D P S Q V S H G T G F T S F G L L K L (配 列 番 号 9 5) 、 または配列番号95と少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0113】

A D は、例えば、C D 1 3 7 / 4 - 1 B B に結合するアミノ酸配列（例えば、抗 C D 1 3 7 s c F v もしくはナノボディアミノ酸配列、または C D 1 3 7 L / 4 - 1 B B L アミノ酸配列）、または T G F に結合するアミノ酸配列（例えば、抗 T G F s c F v もしくはナノボディアミノ酸配列、または T G F B R I I アミノ酸配列）を含み得る。A D として採用され得るポリペプチドは、4 - 1 B B L アミノ酸配列：

1 A C P W A V S G A R A S P G S A A S P R L R E G P E L S P D D P A
 G L L D L R Q G M F A Q L V A Q N V L L I D G P L S W

6 1 Y S D P G L A G V S L T G G L S Y K E D T K E L V V A K A G V Y Y

50

VFFQLEL RRVVAGEGSG SVSLALHLQP 121 LRSAAG
 AAAL ALTVDLPPAS SEARNSAFGF QGRLLHLSAG QR
 LGVHLHTE ARARHAWQLT 181 QGATVLGLFR VTPEI
 PAGLP SPRSE (配列番号94)、または配列番号94と少なくとも90%も
 しくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。あるいは、ADと
 して採用され得るポリペプチドは、リンカー配列(例えば、GGGGSリピートを含むリ
 ンカー配列) :

1 ACPWAVSGAR ASPGSAASPR LREGPELSPD DPA
 GLLDLRQ GMFAQLVAQN VLLIDGPLSW
 61 YSDPGLAGVS LTGGLSYKED TKELVVAKAG VYY 10
 VFFQLEL RRVVAGEGSG SVSLALHLQP 121 LRSAAG
 AAAL ALTVDLPPAS SEARNSAFGF QGRLLHLSAG QR
 LGVHLHTE ARARHAWQLT 181 QGATVLGLFR VTPEI
 PAGLP SPRSEGGGGS GGGGSGGGGS ACPWAVSGAR A
 SPGSAASPR 241 LREGPELSPD DPAGLLDLRQ GMFA
 QLVAQN VLLIDGPLSW YSDPGLAGVS LTGGLSYKED
 301 TKELVVAKAG VYYVFFQLEL RRVVAGEGSG SVS
 LALHLQP LRSAAGAAAL ALTVDLPPAS 361 SEARNS
 AFGF QGRLLHLSAG QRLGVHLHTE ARARHAWQLT QG
 ATVLGLFR VTPEIPAGLP 421 SPRSEGGGGS GGGGS 20
 GGGGS ACPWAVSGAR ASPGSAASPR LREGPELSPD D
 PAGLLDLRQ 481 GMFAQLVAQN VLLIDGPLSW YSDP
 GLAGVS LTGGLSYKED TKELVVAKAG VYYVFFQLEL
 541 RRVVAGEGSG SVSLALHLQP LRSAAGAAAL ALT
 VDLPPAS SEARNSAFGF QGRLLHLSAG 601 QRLGVH
 LHTE ARARHAWQLT QGATVLGLFR VTPEIPAGL PSP
 RSE (配列番号93)、または配列番号93と少なくとも90%も
 しくは少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列によって分離された4-1BBLアミノ酸配列の
 三量体を含む。

【0114】 30

ADは、例えば、IL-10に結合するアミノ酸配列(例えば、抗IL-10 scFvまたはナノボディアミノ酸配列)、またはIL-10Rに結合するアミノ酸配列(例
 えば、抗IL-10R scFvまたはナノボディアミノ酸配列)を含み得る。

【0115】

ADは、例えば、CD3に結合するアミノ酸配列(例えば、抗CD3 scFvまたは
 ナノボディアミノ酸配列)を含み得る。

【0116】

ADは、例えば、CTLA-4に結合するアミノ酸配列(例えば、抗CTLA-4 s
 cFvまたはナノボディアミノ酸配列)を含み得る。

【0117】

ADは、例えば、CD28に結合するアミノ酸配列(例えば、抗CD28 scFvま
 たはナノボディアミノ酸配列)を含み得る。ADとして使用され得る抗CD28 scF
 vは、以下の配列を含み得る :

1 DIELTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE YYV
 TSLMQWY QQKPGQPPKL LIFAASNVES
 61 GVPARFSGSG SGTNFSLN IH PVDEDDVAMY FCQ
 QSRKVPY TFGGGTKLEI KRGGGGSGGG
 121 GSGGGGSQVK LQQSGPGLVT PSQSLSITCT VSG
 FSLSDYG VHWVRQSPGQ GLEWLGV IWA
 181 GGGTNYNSAL MSRKSISKDN SKSQVFLKMN SLQ 50

A D D T A V Y Y C A R D K G Y S Y Y Y S M D Y W G Q G

2 4 1 T T V T V S S (配列番号 8 9)。あるいは、A D は、配列番号 8 9 と少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含んでもよい。A D はまた、配列番号 8 9 の少なくとも 2 2 0 または 2 3 0 の連続するアミノ酸と少なくとも 9 6 % または少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する配列を含み得る。

【 0 1 1 8 】

A D は、例えば、インターフェロン - (I F N -) ポリペプチド配列、または I F N - 受容体に結合するアミノ酸配列 (例えば、抗 I F N - 受容体 s c F v または ナノボディアミノ酸配列) を含み得る。I F N - A D として用いられ得る s c I F N - ポリペプチドは、以下の配列を含み得る：

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

6 1 F K D D Q S I Q K S V E T I K E D M N V K F F N S N K K K R D D F E K L T N Y S V T D L N V Q R K A I D E L I Q V M A E 1 2 1 F S T E E Q Q E G P Y V K E A E N L K K Y F N A G H S D V A D N G T L F L G I L K N W K E E S D R K I M Q S Q I V S F Y 1 8 1 F K L F K N F K D D Q S I Q K S V E T I K E D M N V K F F N S N K K K R D D F E K L T N Y S V T D L N V Q R K A I H E L 2 4 1 I Q V M A E L S P A A K T G K R K R S Q M L F R G (配列番号 9 7)。

あるいは、A D は、配列番号 9 7 と少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含んでもよい。A D はまた、配列番号 9 7 の少なくとも 2 2 0 または 2 3 0 の連続するアミノ酸と少なくとも 9 6 % または少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する配列を含み得る。

【 0 1 1 9 】

A D は、例えば、C D 1 6 に結合するアミノ酸配列 (例えば、抗 C D 1 6 s c F v または ナノボディアミノ酸配列) を含み得る。A D として用いられ得る抗 C D 1 6 V H H ポリペプチドは、

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

6 1 S V K G R F T I S R D N I K R T A G L Q M N S L K P E D T A V Y Y C N A Q T D L R D W T V R E Y W G Q G T Q V T V S S (S E Q I D N O : 9 8) ; または

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

6 1 A D S V K G R F T I S R D N A K N T V Y L Q M S S L K P E D T A V Y Y C A A N P W P V A A P R S G T Y W G Q G T Q V T V

1 2 1 S S (配列番号 1 0 3) を含み得る。あるいは、A D は、配列番号 9 8 または 1 0 3 と少なくとも 9 0 % または少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する配列を含んでもよい。A D はまた、配列番号 9 8 または 1 0 3 の少なくとも 1 0 0 または 1 1 0 の連続するアミノ酸と少なくとも 9 6 % または少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する配列を含み得る。

【 0 1 2 0 】

A D は、アミノ酸配列からなる必要はなく、例えば、核酸配列から構成されてもよい。核酸 A D の非限定的な例としては、任意で 1、2、または 3 個のヌクレオチドの置換、欠失、または挿入を有する、C p G リピート (例えば、C p G オリゴデオキシヌクレオチド配列) または I M T 5 0 4 (T C A T C A T T T T G T C A T T T T G T C A T T (配列番号 6 9、例えば、Insula et al., 2007 Stem Cells、2 5 : 1 0 4 7 - 1 0 5 4 を参照) を有する核酸配列が挙げられる。

【 0 1 2 1 】

6 . 腫瘍特異的結合ドメイン

本明細書に記載されるコンストラクトの腫瘍特異的結合ドメイン (腫瘍特異的結合剤ま

10

20

30

40

50

たは「TSB」とも呼ばれる)は、腫瘍細胞表面上に発現される標的分子に結合することによってコンストラクトを腫瘍細胞に向ける標的化配列として機能するポリペプチドアミノ酸配列である。標的分子は、腫瘍関連抗原(「TAA」)(本明細書では癌関連抗原または「CAA」とも呼ぶ)であってもよく、その細胞表面発現は、一つ以上の癌細胞型に制限される、または実質的に制限される。発現が腫瘍細胞に制限または実質的に制限される分子に加えて、腫瘍細胞の表面に存在する他の分子が標的化されてもよく、これには、腫瘍細胞内で上方制御され得る正常な(非形質転換された)細胞上に発現される細胞タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。正常および多くの腫瘍細胞(例えば、形質転換された腫瘍細胞)上で発現されるチェックポイントタンパク質(例えば、T細胞活性化のVドメインIgサブレッサーまたは「VISTA」)、T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン3または「Tim-3」、ならびにプログラム死リガンド1またはPD-L1)も、TSBの標的分子として機能し得る。免疫回避または脱出の手段として腫瘍細胞によってしばしば上方制御される標的化チェックポイントタンパク質は両方とも、腫瘍細胞の表面上に豊富に発現され得る標的を提供し、TSBによるチェックポイント阻害を提供する。形質転換された腫瘍細胞上での発現に実質的に制限されないタンパク質は、腫瘍細胞上で発現された場合、TSBの標的とみなされる。TSBによって向けられる任意の免疫応答は、ATPレベルが、TSBのADまたは免疫細胞エンゲージャーへの対合または複合体形成を可能にするのに十分に高いTMEに限定され、それらの要素に結合されたNBDを介してTSBの標的とみなされる(例えば、図3、4A、および4Bを参照)。TSBとしては、例えば、ポリペプチド、ならびに抗体、抗体の抗原結合断片、Fab、Fab、および単鎖抗体、scFv、ペプチドアプタマー、またはナノボディアミノ酸配列を含むポリペプチドなどの他の分子が挙げられる。

【0122】

TSBによって標的化され得る固形腫瘍に関連する一部のTAAとしては、以下に限定されないが、炭酸脱水酵素IX(CAIX)、カドヘリン、癌胎児性抗原(CEA)、細胞間葉上皮移行因子(c-MET)、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4)、上皮成長因子受容体(EGFR)ファミリーメンバー、上皮細胞接着分子(EpCAM)、エフリンA型受容体3(EphA3)、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ(FAP)、葉酸結合タンパク質、葉酸受容体アルファ(FR-アルファ)、Erbb-B2受容体チロシンキナーゼ2(HER2)、Erbb-B2受容体チロシンキナーゼ3(HER3)、インスリン様成長因子1受容体(IGF-1R)、インテグリンV3、インテグリン51、溶質キャリアファミリー39メンバー6(Liv1)、黒色腫関連抗原ファミリーAメンバー(MAGEA)、黒色腫関連抗原ファミリーCメンバー(MAGEC)、メソテリン、ムチン(例えば、MUC1)、ニューヨーク食道扁平上皮細胞癌1タンパク質(NY-ESO-1、癌/精巣抗原1A、癌/精巣抗原1B)、癌/精巣抗原2(NY-ESO-2、CTAG2)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、核因子カッパBリガンドの受容体活性化因子(RANKL)、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1(ROR1)、テネニン、TNF受容体スーパーファミリーメンバー10a(TRAILR1)、TNF受容体スーパーファミリーメンバー10b(TRAILR2)、および血管内皮成長因子受容体(VEGFR)を含む。

【0123】

TSBによって標的化され得る固形腫瘍に関連する一部のTAAには、以下が含まれるが、これらに限定されない。癌/精巣抗原1A、癌/精巣抗原1B、または癌/精巣抗原2(NY-ESO-2、CTAG2)、

【0124】

TSBによって標的化され得る固形腫瘍に関連する一部のTAAには、以下が含まれるが、これらに限定されない。MAGEA-1、MAGEA-4、またはMAGEA-9が含まれるが、これらに限定されない。

【0125】

TSBによって標的化され得る固形腫瘍に関連する一部のTAAには、以下が含まれる

が、これらに限定されない。MAGEC - 1、MAGEC - 2、またはMAGEC - 3が含まれるが、これらに限定されない。

【0126】

TSBの標的として機能し得る一部のチェックポイントタンパク質には、VISTA、TIM - 3、PD - L1、CTLA - 4およびLAG - 3が含まれるが、これらに限定されない。

【0127】

TSBポリペプチドは、マウス由来SS1抗体に関連する抗ヒトメソテリンscFvポリペプチドであってもよく、

【化7】

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGY
TMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKS
SSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGSGTPVTVS
S**GXGGS**SGGGGSGGGGSDIELTQSPA IMSASPGEKVTMTCSASS
SVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSK LASGVPGRFSGSGNSY
SLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIK,

10

である配列を有するアマツキシマブでも用いられ、式中、XはVまたはGである（配列番号70）。TSBポリペプチドはまた、その配列と90%超または95%超の配列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、TSBポリペプチドは、その配列と96%超または98%超の配列同一性を有する配列を含み得る。

20

【0128】

TSBポリペプチドは、以下の配列を有するモノクローナル抗体YP218に関連する抗ヒトメソテリンscFv(vH - vL)ポリペプチドを含んでもよく、

【化8】

QEQLVESGGGLVQ
PGASLTTLTCTASGIDFSRYMCWVRQ APGKGLEGIACIYIGG
SGSTYYASWAKGRFTISKASSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR
GTNLNYIFRLWGPGLTLVTVSS**GXGGS**SGGGGSGGGGSDVVMQT
PASVSEPVGGTVTIKCQASQRIS SYLSWYQQKPGQRPKLLIFG
ASTLASGVPSRFKGS GSGTEYTLTISDLECADAAATYYCQSYAY
FDSNNWHAFGGGTEVVV,

30

式中、XはVまたはGである（配列番号71）。TSBポリペプチドはまた、その配列と90%超または95%超の配列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、TSBポリペプチドは、その配列と96%超または98%超の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0129】

TSBポリペプチドは、以下の配列を有するモノクローナル抗体YP218に関連する抗ヒトメソテリンscFv(vL - vH)ポリペプチドを含んでもよく、

【化9】

DVVMQTTPASVSE
PVGGTVTIKCQASQRIS SYLSWYQQK PGQRPKLLIFGASTLA
SGVPSRFKGS GSGTEYTLTISDLECADAAATYYCQSYAYFDSNN
WHAFGGGTEVVV**GXGGS**SGGGGSGGGGSGEQLVESGGGLVQPGA
SLTLTCTASGIDFSRYMCWVRQAPGKGLEGIACIYIGGSGST
YYASWAKGRFTISKASSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGTNL
NYIFRLWGPGLTLVTVSS,

50

式中、XはVまたはGである（配列番号72）。TSBポリペプチドはまた、その配列と90%超または95%超の配列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、TSBポリペプチドは、その配列と96%超または98%超の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0130】

TSBポリペプチドは、モノクローナル抗体15B6に関連する抗ヒトメソテリンscFv(vH-vL)ポリペプチドを含んでもよく、

【化10】

EVQLQQSGPVLVKPGASVKISCK
KASGYSFTGYYMHWVRQS NGKSLEWIGRINPYTGVP
SYKHNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDS
AVYYCARELGGYWGQGTTLTVSS **GXGGS**
GGGGSGGGGSQAVVTQESALTTSPGETVTLT
CRSSTGAVTTGNYPNWVQEKPDHLFTGLIAGTNNR
APGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCAL
WFSSHWVFGGGTKLTVLG,

ここで、XはVまたはGである（配列番号73）。TSBポリペプチドはまた、その配列と90%超または95%超の配列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、TSBポリペプチドは、その配列と96%超または98%超の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0131】

TSBポリペプチドは、モノクローナル抗体15B6に関連する抗ヒトメソテリンscFv(vL-vH)ポリペプチドを含んでもよく、

【化11】

PDHLFTGLIAGTNNR
APGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCAL
WFSSHWVFGGGTKLTVL **GGXGGS**
GGGGSGGGGSEVQLQQSGPVLVKPGASVKISCK
ASGYSFTGYYMHWVRQSN
GKSLEWIGRINPYTGVP
SYKHNFKDKASLTVDKSS
STAYMELHSLTSEDS
AVYYCARELGGYWGQGT
TLTVSS,

式中、XはVまたはGである（配列番号74）。TSBポリペプチドはまた、その配列と90%超または95%超の配列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、TSBポリペプチドは、その配列と96%超または98%超の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0132】

TSBポリペプチドは、以下の配列を有する、vLおよびvHの位置G102CおよびK43C（図に示すK168C）の間のジスルフィド結合を有するモノクローナル抗体15B6に関連する抗ヒトメソテリンscFv(vL-vH)ポリペプチドを含み得る。

【化12】

QAVVTQESALTTSPGETVTLT
CRSSTGAVTTGNYPNWVQEKPDHLFTGLIAGTNNR
APGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCAL
WFSSHWVFGCGTKLTVLG **GGGG**
SGGGGSEVQLQQSGPVLVKPGASVKISCK
ASGYSFTGYYMHWVRQSN
GCSLEWIGRINPYTGVP
SYKHNFKDKASLTVDKSS
STAYMELHSLTSEDS
AVYYCARELGGYWGQGT
TLTVSS（配列番号75）

。TSBポリペプチドはまた、その配列と90%超または95%超の配列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、TSBポリペプチドは、その配列と96%超または98%超の配列同一性を有する配列を含み得る。

【 0 1 3 3 】

T S B ポリペプチドは、以下の配列を有する、v L および v H の位置 G 1 0 2 C および S 4 4 C (図に示す S 1 6 9 C) の間のジスルフィド結合を有するモノクローナル抗体 1 5 B 6 に関連する抗ヒトメソテリン s c F v (v L - v H) ポリペプチドを含み得る。

【 化 1 3 】

QAVVTQESAL

TTSPGETVTLLTCRSSTGAVTTGNYPNWVQEKPDHLFTGLIA G
 TNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWFS
 SHWVFGCGTKLTVLG **GGGGSGGGGSGGGG**SEVQLQQSGPVLVK
 PGASVKISCKASGYSFTGYMHVWRQSNKCLEWIGRINPYTG 10
 VPSYKHNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARE
 LGGYWGQGTTTLTVSS (配列番号76)

。 T S B ポリペプチドはまた、その配列と 9 0 % 超または 9 5 % 超の配列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、 T S B ポリペプチドは、その配列と 9 6 % 超または 9 8 % 超の配列同一性を有する配列を含み得る。

【 0 1 3 4 】

T S B ポリペプチドは、以下の配列を有する、v L および v H の位置 G 1 0 3 C および K 4 3 C (図に示す K 1 6 8 C) の間のジスルフィド結合を有するモノクローナル抗体 1 5 B 6 に関連する抗ヒトメソテリン s c F v (v L - v H) ポリペプチドを含み得る。 20

【 化 1 4 】

QAVVTQESAL

TTSPGETVTLLTCRSSTGAVTTGNYPNWVQEKPDHLFTGLIA G
 TNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWFS
 SHWVFGGCTKLTVLG **GGGGSGGGGSGGGG**SEVQLQQSGPVLVK
 PGASVKISCKASGYSFTGYMHVWRQSNKCSLEWIGRINPYTG
 VPSYKHNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARE
 LGGYWGQGTTTLTVSS (配列番号77) 30

。 T S B ポリペプチドはまた、その配列と 9 0 % 超または 9 5 % 超の配列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、 T S B ポリペプチドは、その配列と 9 6 % 超または 9 8 % 超の配列同一性を有する配列を含み得る。

【 0 1 3 5 】

T S B ポリペプチドは、以下の配列を有する、v L および v H の位置 G 1 0 3 C および S 4 4 C (図に示す S 1 6 9 C) の間のジスルフィド結合を有するモノクローナル抗体 1 5 B 6 に関連する抗ヒトメソテリン s c F v (v L - v H) ポリペプチドを含み得る。

【 化 1 5 】

QAVVTQESAL

TTSPGETVTLLTCRSSTGAVTTGNYPNWVQEKPDHLFTGLIA G
 TNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWFS
 SHWVFGGCTKLTVLG **GGGGSGGGGSGGGG**SEVQLQQSGPVLVK
 PGASVKISCKASGYSFTGYMHVWRQSNKCLEWIGRINPYTG
 VPSYKHNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARE
 LGGYWGQGTTTLTVSS (配列番号78) 40

。 T S B ポリペプチドはまた、その配列と 9 0 % 超または 9 5 % 超の配列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、 T S B ポリペプチドは、その配列と 9 6 % 超または 9 8 % 超の配列同一性を有する配列を含み得る。 50

【 0 1 3 6 】

T S B バインダーポリペプチドは、以下の配列： Q V Q L V Q S G G G L V Q P G
G S L R L S C A A S D F D F A A Y E M S W V R Q A P G Q G L E W V A I I S H D
G I D K Y Y T D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N T L R A E D T A T Y
Y C L R L G A V G Q G T L V T V S S S (配列番号 7 9) を有する、モノクローナル抗
体 S D 1 に関連する抗ヒトメソテリン (V H H) ポリペプチドを含み得る。T S B ポリペ
プチドはまた、その配列と 9 0 % 超または 9 5 % 超の配列同一性を有する配列を含み得る
。あるいは、T S B ポリペプチドは、その配列と 9 6 % 超または 9 8 % 超の配列同一性を
有する配列を含み得る。

【 0 1 3 7 】

T S B ポリペプチドは、モノクローナル抗体 M T 2 0 1 およびアデカツムマブに関連す
る抗ヒト E p C A M s c F v (v H - v L) ポリペプチドを含んでもよく、配列：

【 化 1 6 】

EVQLLES
GGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV
ISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV
YYCAKDMGWGSGWRPYYYYGMDVWGQGT T V T V S S **G X G G S G G G G**
S G G G G S ELQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRTS QS ISSYLNWYQ
QKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT I S S L Q P
EDSATYYCQQSYDIPYTFGQGTKLEIKRTV,

を有し、ここで、XはVまたはGである(配列番号80)。T S B ポリペプチドはまた、
その配列と 9 0 % 超または 9 5 % 超の配列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、T
S B ポリペプチドは、その配列と 9 6 % 超または 9 8 % 超の配列同一性を有する配列を含
み得る。

【 0 1 3 8 】

T S B ポリペプチドは、モノクローナル抗体 M T 2 0 1 およびアデカツムマブに関連す
る抗ヒト E p C A M s c F v (v L - v H) ポリペプチドを含んでもよく、配列：

【 化 1 7 】

ELQMTQSP
SSLSASVGDRVTITCRTS QS ISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYW
ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT I S S L Q P E D S A T Y Y C Q Q S Y D
I P Y T F G Q G T K L E I K R T V **G X G G S G G G G S G G G G S E**VQLLES
GGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA
KDMGWGSGWRPYYYYGMDVWGQGT T V T V S S

を有し、式中、XはVまたはGである(配列番号81)。T S B ポリペプチドはまた、そ
の配列と 9 0 % 超または 9 5 % 超の配列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、T S
B ポリペプチドは、その配列と 9 6 % 超または 9 8 % 超の配列同一性を有する配列を含
み得る。

【 0 1 3 9 】

T S B ポリペプチドは、以下の配列：

10

20

30

40

50

【化 1 8】

EIVLTQSPGTL^SLSLSPGERATL^SSCRASQSVGSSSYLAWYQQKPGQ
 APRLLIYGAFSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA
 VYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKR **GGGGSGGGGS**GGGGSQVQL
 VESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEW
 VTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDN^SSKNTLYLQMNSLRAED
 TAIYYCARTGWLGPFDYWGQGT^LVT^VSS (配列番号82)

を有する、イピリムマブに関連する抗ヒトCTLA-4 scFv (vL - vH) ポリペ
 プチドを含み得る。TSBポリペプチドはまた、その配列と90%超または95%超の配
 列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、TSBポリペプチドは、その配列と96%
 超または98%超の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0140】

TSBポリペプチドは、vLとvHの位置Q101CとK43C(示されるようにK1
 67C)の間にジスルフィド結合を有する、イピリムマブに関連する抗ヒトCTLA-4
 scFv (vL - vH) ポリペプチドを含んでいてもよく、配列:

【化 1 9】

EIVLTQSPGTL^SLSLSPG
 ERATL^SSCRASQSVGSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGI
 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGCG
 TKVEIKR **GGGGSGGGGS**GGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS
 CAASGFTFSSYTMHWVRQAPGCGLEWVTFISYDGNNKYYADSV
 KGRFTISRDN^SSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDY
 WGQGT^LVT^VSS (配列番号83)

を有する。TSBポリペプチドはまた、その配列と90%超または95%超の配列同一性
 を有する配列を含み得る。あるいは、TSBポリペプチドは、その配列と96%超または
 98%超の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0141】

TSBポリペプチドは、vLとvHの位置Q101CとG44C(示されるようにG1
 67C)の間にジスルフィド結合を有する、イピリムマブに関連する抗ヒトCTLA-4
 scFv (vL - vH) ポリペプチドを含んでいてもよく、配列:

【化 2 0】

IVLTQSPGTL^SLSLSPGE
 RATL^SSCRASQSVGSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIE
 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGCG
 TKVEIKR **GGGGSGGGGS**GGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLS
 CAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKCLEWVTFISYDGNNKYYADSV
 KGRFTISRDN^SSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDY
 WGQGT^LVT^VSS (配列番号84)

を有する。TSBポリペプチドはまた、その配列と90%超または95%超の配列同一性
 を有する配列を含み得る。あるいは、TSBポリペプチドは、その配列と96%超または
 98%超の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0142】

TSBポリペプチドは、vLとvHの位置G102CとK43C(示されるようにK1
 67C)の間にジスルフィド結合を有する、イピリムマブに関連する抗ヒトCTLA-4
 scFv (vL - vH) ポリペプチドを含んでいてもよく、配列:

10

20

30

40

50

【化 2 1】

E I V L T Q S P G T L S L S P G E
 R A T L S C R A S Q S V G S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A F S R A T G I P
 D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P W T F G Q C T
 K V E I K R **G G G G S G G G G S G G G G S** Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C
 A A S G F T F S S Y T M H W V R Q A P G C G L E W V T F I S Y D G N N K Y Y A D S V K
 G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A I Y Y C A R T G W L G P F D Y W
 G Q G T L V T V S S (配列番号 8 5)

を有する。腫瘍特異的結合剤ポリペプチドはまた、その配列と 90% 超または 95% 超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。あるいは、腫瘍特異的結合剤ポリペプチドは、その配列と 96% 超または 98% 超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

【0 1 4 3】

T S B ポリペプチドは、v L と v H の位置 G 1 0 2 C と G 4 4 C (示されるように G 1 6 8 C) の間にジスルフィド結合を有する、イピリムマブに関連する抗ヒト C T L A - 4 s c F v (v L - v H) ポリペプチドを含んでいてもよく、配列:

【化 2 2】

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V G S S Y L A W Y Q Q K P G Q
 A P R L L I Y G A F S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V
 Y Y C Q Q Y G S S P W T F G Q C T K V E I K R **G G G G S G G G G S G G G G S** Q V Q L V
 E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y T M H W V R Q A P G K C L E W V
 T F I S Y D G N N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T
 A I Y Y C A R T G W L G P F D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 8 6)

を有する。T S B ポリペプチドはまた、その配列と 90% 超または 95% 超の配列同一性を有する配列を含み得る。あるいは、T S B ポリペプチドは、その配列と 96% 超または 98% 超の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0 1 4 4】

配列番号 70 ~ 86 のリンカー配列は、太字斜字体で表記される。

【0 1 4 5】

E . 調製方法

本開示は、哺乳類細胞 (C H O 細胞)、酵母細胞 (例えば、ピカパストリス)、ソードプテラ細胞、または細菌細胞 (例えば、大腸菌細胞) におけるコンストラクトをコードする核酸の転写および翻訳による、本明細書に開示されるコンストラクトの調製を含み、それを提供する。コンストラクトの一部はまた、上述の細胞発現、化学合成などによって別々に調製され、その後、一つ以上の化学的または酵素的プロセスを使用して一緒にコンジュゲートされてもよい。実際に、酵素的手段、自己触媒タンパク質スプライシング、または化学的架橋 (例えば、ヘテロ二官能性架橋剤) を使用して、例えば A D を N B D に、T S B を N B D に、および / または N B D を免疫細胞エンゲージャーに連結 (例えば、共有結合) することができる。結合される構成要素が両方ともアミノ酸配列からなる場合、酵素的手段および自己触媒タンパク質スプライシングは、カップリング反応の化学量論および構造の両方を可能にする一方で、潜在的な二次カップリング反応を実質的に回避するカップリングオプションを表す。例えば、ソルターゼおよびスプリットインティンを利用して、N B D を含む配列を A D、T S B 結合剤、または免疫細胞エンゲージャーに付加してもよい。例えば、B h a g a w a t i e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 1 1 6 (4 4) : 2 2 1 6 4 - 2 2 1 7 2 (2 0 1 9) を参照。あるいは、化膿連鎖球菌 (S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s) 由来の F b a B タンパク質の C n a B 2 ドメインを用いてもよい酵素触媒 S p y T a g / S p y C a

tcher系は、ADをNBDを含むポリペプチドにコンジュゲートするために利用することができる。例えば、Reddington and Howarth, Curr. Opin. Chem. Biol., 29: 94-99 (2015)を参照。

【0146】

本明細書に記載されるコンストラクトの構成要素をカップリングするための純粋な酵素的および化学的コンジュゲーション方法に加えて、タンパク質間相互作用の特異性を化学的コンジュゲーションと組み合わせる親和性誘導方法を採用してもよい。親和性誘導化学コンジュゲーションは、効率的で、容易で、かつ特異的な化学コンジュゲーション反応を提供する。そのような方法の一つである、Peptide-Directed Photo-cross-linking (PEDIP)は、Park et al. (2018), Bioconj. Chem., 29: 3240-3244に記載されており、ポリペプチドを抗体重鎖定常領域に連結することが実証されている。Kishimoto et al. (2019), Bioconj. Chem., 30(3): 697-702も参照。

10

【0147】

ADが、生物学的系で翻訳され得るアミノ酸配列ではない場合（例えば、CpGオリゴデオキシヌクレオチドなどの核酸である）、例えば二官能性架橋剤（例えば、ホモ二官能性またはヘテロ二官能性架橋剤）を使用して分子の他の部分に結合されてもよい。

【0148】

コンストラクトは、当技術分野で公知の様々な方法を使用して精製されてもよい。例えば、コンストラクトがスクフォールドとしてIgFc領域を含む場合、プロテインAまたはプロテインGクロマトグラフィーによって精製され得る。コンストラクトは、Cibacron Blue F3GA、Procion Blue HB、またはReactive blue 2を親和性リガンドとして使用したヌクレオチド親和性クロマトグラフィーまたは染料リガンド親和性クロマトグラフィーによって精製され得る。サイズ排除クロマトグラフィーは、単独で、または親和性クロマトグラフィーと組み合わせて使用して、生成物を精製することもできる。

20

【0149】

F. 製剤および治療方法

本明細書に開示されるNBD含有コンストラクトおよび複合体（例えば、図2~4を参照）は、薬学的に許容可能な成分を含む組成物に製剤化されてもよい。

30

【0150】

組成物は、非経口および/または他の形態の投与のために調製されてもよい。コンストラクトまたはコンストラクトを含む組成物は、静脈内、筋肉内、皮下、腫瘍内、またはリンパ内などの任意の適切な経路によって投与され得る。コンストラクトはまた、コンストラクトと相乗的にまたは非相乗的に作用する一つ以上の他の薬剤と併せて投与されてもよい。例えば、本開示のコンストラクト（例えば、IL-12活性化ドメインを有するコンストラクト）は、ペンプロリズマブ（Keytruda（登録商標）、PD-1を標的とする）、アベルマブ（Bavencio（登録商標）、PD-L1を標的とする）、またはイピリムマブ（Yervoy（登録商標）、CTLA-4を標的とする）などの免疫チェックポイント阻害剤と共に投与されてもよい。

40

【0151】

正常組織と比較してATPレベルの上昇を含有する任意の固形腫瘍は、本開示のコンストラクトを利用して治療されてもよい。治療可能な腫瘍には、中皮腫、黒色腫、肉腫、癌腫、癌肉腫、リンパ腫、および生殖細胞腫瘍が含まれる。代表的な癌には、結腸直腸癌、乳癌、神経内分泌腫瘍、肺癌、および胃癌が含まれるが、これらに限定されない。例えば、腫瘍は、肺、肝臓、皮膚、胃腸、膵臓、脳、または生殖組織（例えば、卵巣肉腫）腫瘍であってもよい。

態様

1. ヌクレオチド結合ドメイン（NBD）アミノ酸（aa）配列、およびリンカーペプ

50

チド配列によって任意に連結された活性化ドメイン (AD) アミノ酸配列を含むポリペプチドコンストラクトであって、前記 NBD が、一つ以上のアデノシン三リン酸 (ATP) 結合部位を含み、ATP の存在下で同族の非同一の NBD (例えば、ヘテロ二量体化することができる TAP1 または TAP2 の NBD) とホモ二量体化またはヘテロ二量体化することができる、ポリペプチドコンストラクト。

2. コンストラクトが、(i) NBD、任意選択のリンカー、および AD アミノ酸配列、または (ii) AD、任意選択のリンカー、および NBD アミノ酸配列として、N 末端から C 末端の方向に組織化される、態様 1 に記載のポリペプチドコンストラクト。

3. NBD アミノ酸配列、スキファールドアミノ酸配列、および独立して選択されるリンカーアミノ酸配列によって任意に結合される AD 配列を含む、態様 1 または 2 に記載のポリペプチドコンストラクト。

10

4. コンストラクトが、N 末端から C 末端の方向に、NBD アミノ酸配列、スキファールドアミノ酸配列、および AD アミノ酸配列を含む、態様 3 に記載のポリペプチドコンストラクト。

5. コンストラクトが、N 末端から C 末端の方向に、NBD アミノ酸配列、AD アミノ酸配列、およびスキファールドアミノ酸配列を含む、態様 3 に記載のポリペプチドコンストラクト。

6. コンストラクトが、N 末端から C 末端の方向に、AD アミノ酸配列、スキファールドアミノ酸配列、および NBD アミノ酸配列を含む、態様 3 に記載のポリペプチドコンストラクト。

20

7. コンストラクトが、N 末端から C 末端の方向に、AD アミノ酸配列、NBD アミノ酸配列、およびスキファールドアミノ酸配列を含む、態様 3 に記載のポリペプチドコンストラクト。

8. コンストラクトが、N 末端から C 末端の方向に、スキファールド、AD、および NBD アミノ酸配列を含む、態様 3 に記載のポリペプチドコンストラクト。

9. コンストラクトが、N 末端から C 末端の方向に、スキファールドアミノ酸配列、NBD アミノ酸配列、および AD アミノ酸配列を含む、態様 3 に記載のポリペプチドコンストラクト。

10. 二つ以上 (例えば、三つ以上) の独立して選択される AD アミノ酸配列を含み、AD アミノ酸配列が任意選択的に縦一列に配置される、態様 1 ~ 9 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。

30

11. 任意選択的に縦一列に配置された、二つ以上 (例えば、三つ以上) の独立して選択される NBD アミノ酸配列を含む (同じ分子内の二つ以上の NBD が相互作用して ATP の存在下で複合体を形成することができないように制約される)、態様 1 ~ 10 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。

12. ATP の存在下での二つ以上の NBD アミノ酸配列間の相互作用を実質的に防止する剛直なリンカーをさらに含む、態様 11 に記載のポリペプチドコンストラクト。

13. 各 NBD アミノ酸配列が、ATP の存在下でホモ二量体形成し得る (例えば、同一のホモ二量体形成アミノ酸配列を含む)、態様 1 ~ 12 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。

40

14. コンストラクトが、NBD (例えば、単一の NBD) アミノ酸配列を含む、態様 13 に記載のポリペプチドコンストラクト。例えば、A、C、および E の図 2 を参照。

15. ATP の存在下でコンストラクトの二量体またはよりより高次の複合体を形成するためにホモ二量体形成され得る二つ以上の NBD アミノ酸配列を含む、態様 11 または 12 に記載のポリペプチドコンストラクト。例えば、図 4 A の A を参照。

16. 各 NBD アミノ酸配列が、同一または実質的に同一のホモ二量体形成アミノ酸配列を含む、態様 13 ~ 15 のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクト。

17. 各 NBD アミノ酸配列が、ATP の存在下で同族 NBD とヘテロ二量体形成し得る、態様 1 ~ 12 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。

18. コンストラクトが、NBD (例えば、単一の NBD) アミノ酸配列 (例えば、図

50

2のBおよびDのコンストラクトの各々を参照)、または一つまたは複数の(例えば、二つ以上の)NBDアミノ酸配列を含む、態様17に記載のポリペプチドコンストラクト。

19. 第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクトを含む組成物であって、第一のポリペプチドコンストラクトが、第一のNBDアミノ酸配列を含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、第二のNBDアミノ酸配列を含み、第一および第二のNBDアミノ酸配列が、ATPの存在下でホモ二量体化またはヘテロ二量体化してホモ二量体またはヘテロ二量体複合体を形成し得る同族配列である、態様13~18のいずれか一つに記載の組成物。例えば、図2のBおよびDを参照。

20. 態様19に記載の第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクトを含み、第一のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上(例えば、二つ以上)の第一のNBDアミノ酸配列を含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上の(例えば、二つ以上)第二のNBDアミノ酸配列を含み、第一および第二のNBDアミノ酸配列は、ATPの存在下でホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成してホモ二量体を、ヘテロ二量体またはより高次の複合体を形成し得る同族配列である、組成物。例えば、各構成体がNBD(例えば、単一のNBD)アミノ酸配列からなる図2のBおよびD、ならびに第一および第二(例えば、両方)の構成体の少なくとも一つが二つ以上のNBDアミノ酸配列からなる図4AのBを参照。

21. リンカーペプチド配列によって任意選択的に結合された、ヌクレオチド結合ドメイン(NBD)アミノ酸(aa)配列、および腫瘍特異的結合剤(TSB)アミノ酸配列を含むポリペプチドコンストラクトであって、前記NBDが、一つ以上のアデノシン三リン酸(ATP)結合部位を含み、ATPの存在下で同族の非同一のNBD(例えば、ヘテロ二量体形成することができるTAP1またはTAP2のNBD)とホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成することができ、前記ポリペプチドコンストラクトが、任意選択的に一つ以上のADを含む、ポリペプチドコンストラクト。

22. コンストラクトが、(i)NBD、任意選択のリンカー、およびTSBアミノ酸配列、または(ii)TSB、任意選択のリンカー、およびNBDアミノ酸配列として、N末端からC末端の方向に組織化される、態様21に記載のポリペプチドコンストラクト。

23. NBDアミノ酸配列、スキャフォールドアミノ酸配列、および独立して選択されるリンカーアミノ酸配列によって任意選択的に結合されるTSBアミノ酸配列を含む、態様21または22に記載のポリペプチドコンストラクト。

24. コンストラクトが、N末端からC末端の方向に、NBDアミノ酸配列、スキャフォールドアミノ酸配列、およびTSBアミノ酸配列を含む、態様23に記載のポリペプチドコンストラクト。

25. コンストラクトが、N末端からC末端の方向に、NBDアミノ酸配列、TSBアミノ酸配列、およびスキャフォールドアミノ酸配列を含む、態様23に記載のポリペプチドコンストラクト。

26. コンストラクトが、N末端からC末端の方向に、TSBアミノ酸配列、スキャフォールドアミノ酸配列、およびNBDアミノ酸配列を含む、態様23に記載のポリペプチドコンストラクト。

27. コンストラクトが、N末端からC末端の方向に、TSBアミノ酸配列、NBDアミノ酸配列、およびスキャフォールドアミノ酸配列を含む、態様23に記載のポリペプチドコンストラクト。

28. コンストラクトが、N末端からC末端の方向に、スキャフォールドアミノ酸配列、TSBアミノ酸配列、およびNBDアミノ酸配列を含む、態様23に記載のポリペプチドコンストラクト。

29. コンストラクトが、N末端からC末端の方向に、スキャフォールドアミノ酸配列、NBDアミノ酸配列、およびTSBアミノ酸配列を含む、態様23に記載のポリペプチドコンストラクト。

30. 二つ以上(例えば、三つ以上)の独立して選択されるTSBアミノ酸配列を含み

10

20

30

40

50

、 T S B アミノ酸配列が任意選択的に縦一列に配置される、態様 2 1 ~ 2 9 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。

3 1 . 任意選択的に縦一列に配置された、二つ以上（例えば、三つ以上）の独立して選択される N B D アミノ酸配列を含む（同じ分子内の二つ以上の N B D が相互作用して A T P の存在下で複合体を形成することができないように制約される）、態様 2 1 ~ 3 0 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。

3 2 . A T P の存在下での二つ以上の N B D アミノ酸配列間の相互作用を実質的に防止する剛直なリンカーをさらに含む、態様 3 1 に記載のポリペプチドコンストラクト。

3 3 . 各 N B D アミノ酸配列が、A T P の存在下でホモ二量体形成し得る（例えば、同一のホモ二量体形成アミノ酸配列を含む）、態様 2 1 ~ 3 2 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。

10

3 4 . コンストラクトが、N B D（例えば、単一の N B D）アミノ酸配列を含む、態様 3 3 に記載のポリペプチドコンストラクト。例えば、図 4 B の A ~ D を参照。

3 5 . A T P の存在下でコンストラクトの二量体またはより高次の複合体を形成するためにホモ二量体形成され得る二つ以上の N B D アミノ酸配列を含む、態様 3 1 または 3 2 に記載のポリペプチドコンストラクト。例えば、図 4 A を参照。

3 6 . 各 N B D アミノ酸配列が、同一または実質的に同一のホモ二量体形成アミノ酸配列を含む、態様 3 5 に記載のポリペプチドコンストラクト。

3 7 . 各 N B D アミノ酸配列が、A T P の存在下で同族 N B D とヘテロ二量体形成し得る、態様 2 1 ~ 3 2 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。

20

3 8 . コンストラクトが、N B D（例えば、単一の N B D）アミノ酸配列、または一つまたは複数の（例えば、二つ以上の）N B D アミノ酸配列を含む、態様 3 7 に記載のポリペプチドコンストラクト。

3 9 . 第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクトが、第一の N B D アミノ酸配列を含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、第二の N B D アミノ酸配列を含み、第一および第二の N B D アミノ酸配列が、A T P の存在下でホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成してホモ二量体またはヘテロ二量体複合体を形成し得る同族配列である、態様 3 3 ~ 3 8 のいずれかに記載の第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクトを含む組成物。

4 0 . 態様 3 9 に記載の第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクトを含む組成物であって、第一のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上（例えば、二つ以上）の第一の N B D アミノ酸配列を含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上の（例えば、二つ以上）第二の N B D アミノ酸配列、第一および第二の N B D アミノ酸配列は、A T P の存在下でホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成して、ホモ二量体もしくはヘテロ二量体またはより高次の複合体を形成し得る同族配列である、組成物。

30

4 1 . 第一のポリペプチドコンストラクトの T S B および第二のポリペプチドコンストラクトの T S B が、単一の腫瘍関連抗原（T A A）または異なる（非同一）T A A を認識する、態様 3 9 または態様 4 0 に記載の組成物。

4 2 . ヌクレオチド結合ドメイン（N B D）アミノ酸（a a）配列、およびリンカーペプチド配列によって任意選択的に結合された免疫細胞エンゲージャー（I C E）アミノ酸配列を含むポリペプチドコンストラクトであって、N B D が、一つ以上のアデノシン三リン酸（A T P）結合部位を含み、A T P の存在下で同族の非同一の N B D（例えば、ヘテロ二量体形成することができる T A P 1 または T A P 2 の N B D）とホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成することができ、ポリペプチドコンストラクトが、任意選択的に一つ以上の A D を含む、ポリペプチドコンストラクト。

40

4 3 . コンストラクトが、(i) N B D、任意選択のリンカー、および I C E アミノ酸配列、または (i i) I C E、任意選択のリンカー、および N B D アミノ酸配列として、N 末端から C 末端の方向に組織化される、態様 4 2 に記載のポリペプチドコンストラクト。

50

44. 選択されたリンカーアミノ酸配列によって任意選択的に独立して結合された NBDアミノ酸配列、スキャフォールドアミノ酸配列、および ICEアミノ酸配列を含む、態様 42 または 43 に記載のポリペプチドコンストラクト。

45. コンストラクトが、N 末端から C 末端の方向に、NBDアミノ酸配列、スキャフォールドアミノ酸配列、および ICEアミノ酸配列を含む、態様 43 に記載のポリペプチドコンストラクト。

46. コンストラクトが、N 末端から C 末端の方向に、NBDアミノ酸配列、ICEアミノ酸配列、およびスキャフォールドアミノ酸配列を含む、態様 43 に記載のポリペプチドコンストラクト。

47. コンストラクトが、N 末端から C 末端の方向に、ICEアミノ酸配列、スキャフォールドアミノ酸配列、および NBDアミノ酸配列を含む、態様 43 に記載のポリペプチドコンストラクト。 10

48. コンストラクトが、N 末端から C 末端の方向に、ICEアミノ酸配列、NBDアミノ酸配列、およびスキャフォールドアミノ酸配列を含む、態様 43 に記載のポリペプチドコンストラクト。

49. コンストラクトが、N 末端から C 末端の方向に、スキャフォールドアミノ酸配列、ICEアミノ酸配列、および NBDアミノ酸配列を含む、態様 43 に記載のポリペプチドコンストラクト。

50. コンストラクトが、N 末端から C 末端の方向に、スキャフォールドアミノ酸配列、NBDアミノ酸配列、および ICEアミノ酸配列を含む、態様 43 に記載のポリペプチドコンストラクト。 20

51. 独立して選択される二つ以上（例えば、3 つ以上）の ICEアミノ酸配列を含み、ICEアミノ酸配列が任意選択的に縦一列に配置される、態様 42 ~ 50 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。

52. 任意選択的に縦一列に配置された、二つ以上（例えば、三つ以上）の独立して選択される NBDアミノ酸配列を含む（同じ分子内の二つ以上の NBD が相互作用して ATP の存在下で複合体を形成することができないように制約される）、態様 42 ~ 51 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。

53. ATP の存在下で二つ以上の NBDアミノ酸配列間の相互作用を実質的に防止する剛直なリンカーをさらに含む、態様 52 に記載のポリペプチドコンストラクト。 30

54. 各 NBDアミノ酸配列が、ATP の存在下でホモ二量体形成し得る（例えば、同一のホモ二量体形成アミノ酸配列を含む）、態様 42 ~ 53 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。

55. コンストラクトが、NBD（例えば、単一の NBD）アミノ酸配列を含む、態様 54 に記載のポリペプチドコンストラクト。例えば、図 4A を参照。

56. ATP の存在下でコンストラクトの二量体またはより高次の複合体を形成するためにホモ二量体形成され得る二つ以上の NBDアミノ酸配列を含む、態様 53 または 54 に記載のポリペプチドコンストラクト。

57. 各 NBDアミノ酸配列が、ATP の存在下で同族 NBD とヘテロ二量体形成し得る、態様 42 ~ 53 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。 40

58. コンストラクトが、NBD（例えば、単一の NBD）アミノ酸配列、または一つまたは複数の（例えば、二つ以上の）NBDアミノ酸配列を含む、態様 57 に記載のポリペプチドコンストラクト。

59. 第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクトを含む組成物であって、コンストラクトが、第一の NBDアミノ酸配列を含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、第二の NBDアミノ酸配列を含み、第一および第二の NBDアミノ酸配列が、ATP の存在下でヘテロ二量体化してヘテロ二量体複合体を形成し得る同族配列である、態様 58 に記載の組成物。

60. 第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクトを含む組成物であって、第一のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上（例えば、二つ以 50

上)の第一のNBDアミノ酸配列を含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上(例えば、二つ以上)の第二のNBDアミノ酸配列を含み、第一および第二のNBDアミノ酸配列が、ATPの存在下でヘテロ二量体化してヘテロ二量体またはより高次の複合体を形成し得る同族配列である、態様59に記載の組成物。

61. 第一のポリペプチドコンストラクトのICEおよび第二のポリペプチドコンストラクトのICEが、単一の免疫細胞表面分子または異なる(非同一の)免疫細胞表面分子を認識する、態様59または態様60に記載の組成物。

62. 態様1~18のいずれか一つに記載の第一のポリペプチドコンストラクトと、態様42~58のいずれか一つに記載の第二のポリペプチドコンストラクトと、を含む、組成物であって、

(i) 第一のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上の(例えば、二つ以上の)第一のヘテロ二量体形成NBDアミノ酸配列を含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上の(例えば、二つ以上の)第二のヘテロ二量体形成NBDアミノ酸配列を含み、

(ii) 一つ以上の第一のヘテロ二量体形成NBDアミノ酸配列の各々が、一つ以上の第二のヘテロ二量体形成NBDアミノ酸配列の同族結合パートナーであり、

(iii) 第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクトが、ATPの存在下で、一つ以上の第一のヘテロ二量体形成NBDアミノ酸配列のうちの少なくとも一つと、一つ以上の第二のヘテロ二量体形成NBD配列のうちの少なくとも一つとの間の相互作用を介して互いに結合して、第一および第二のポリペプチドコンストラクトのヘテロ二量体またはより高次の複合体を形成する、組成物。

63. 第一のポリペプチドコンストラクトが、単一の第一のヘテロ二量体形成NBDを含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、単一のヘテロ二量体形成NBDを含む、態様62に記載の組成物。例えば、図3のJを参照。

64. 第一のポリペプチドコンストラクトが、二つ以上の第一のヘテロ二量体形成NBDを含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、単一のヘテロ二量体形成NBDを含む、態様62に記載の組成物。例えば、NBDは縦一列に配置された図3のKを参照。

65. 第一のポリペプチドコンストラクトが、単一の第一のヘテロ二量体形成NBDを含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、二つ以上の第二のヘテロ二量体形成NBDを含む、態様62に記載の組成物。

66. 第一のポリペプチドコンストラクトが、二つ以上の第一のヘテロ二量体形成NBDを含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、二つ以上の第二のヘテロ二量体形成NBDを含む、態様62に記載の組成物。

67. 第一および/または第二のポリペプチドコンストラクトが、スキャフォールド配列を含む、態様62~66のいずれか一つに記載の組成物。

68. 態様21~38のいずれか一つに記載の第一のポリペプチドコンストラクトと、態様1~18のいずれか一つに記載の第二のポリペプチドコンストラクトと、を含む、組成物であって、

(i) 第一のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上の(例えば、二つ以上の)第一のヘテロ二量体形成NBDアミノ酸配列を含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上の(例えば、二つ以上の)第二のヘテロ二量体形成NBDアミノ酸配列を含み、

(ii) 一つ以上の第一のヘテロ二量体形成NBDアミノ酸配列の各々が、一つ以上の第二のヘテロ二量体形成NBDアミノ酸配列の同族結合パートナーであり、

(iii) 第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクトが、ATPの存在下で、一つ以上の第一のヘテロ二量体形成NBDアミノ酸配列のうちの少なくとも一つと、一つ以上の第二のヘテロ二量体形成NBD配列のうちの少なくとも一つとの間の相互作用を介して互いに結合して、第一および第二のポリペプチドコンストラクトのヘテロ二量体またはより高次の複合体を形成する、組成物。

69. 第一のポリペプチドコンストラクトが、単一の第一のヘテロ二量体形成NBDを含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、単一のヘテロ二量体形成NBDを含む、態様68に記載の組成物。例えば、図3のAおよびEを参照。

10

20

30

40

50

70. 第一のポリペプチドコンストラクトが、二つ以上の第一のヘテロ二量体形成 N B D を含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、単一のヘテロ二量体形成 N B D を含む、態様 68 に記載の組成物。例えば、図 3 において、N B D が縦一列にある B、および N B D が縦一列にない N および O を参照。

71. 第一のポリペプチドコンストラクトが、単一の第一のヘテロ二量体形成 N B D を含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、二つ以上の第二のヘテロ二量体形成 N B D を含む、態様 68 に記載の組成物。

72. 第一のポリペプチドコンストラクトが、二つ以上の第一のヘテロ二量体形成 N B D を含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、二つ以上の第二のヘテロ二量体形成 N B D を含む、態様 68 に記載の組成物。例えば、図 4 A の G を参照。

73. 第一および/または第二のポリペプチドコンストラクトが、スキャフォールド配列を含む、態様 62 ~ 66 のいずれか一つに記載の組成物。

74. 態様 21 ~ 38 のいずれかに記載の第一のポリペプチドコンストラクトと、態様 42 ~ 58 のいずれかに記載の第二のポリペプチドコンストラクトと、を含む、組成物であって、

(i) 第一のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上の (例えば、二つ以上の) 第一のヘテロ二量体形成 N B D アミノ酸配列を含み、第二のポリペプチドコンストラクトが、一つ以上の (例えば、二つ以上の) 第二のヘテロ二量体形成 N B D アミノ酸配列を含み、

(i i) 一つ以上の第一のヘテロ二量体形成 N B D アミノ酸配列の各々が、一つ以上の第二のヘテロ二量体形成 N B D アミノ酸配列の同族結合パートナーであり、

(i i i) 第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクトが、A T P の存在下で、一つ以上の第一のヘテロ二量体形成 N B D アミノ酸配列のうちの少なくとも一つと、一つ以上の第二のヘテロ二量体形成 N B D 配列のうちの少なくとも一つとの間の相互作用を介して互いに結合して、第一および第二のポリペプチドコンストラクトのヘテロ二量体またはより高次の複合体を形成する、組成物。

75. 第一のポリペプチドコンストラクトが、単一の第一のヘテロ二量体形成 N B D を含み、第二の複合体が、単一のヘテロ二量体形成 N B D を含む、態様 74 に記載の組成物。例えば、図 3 の C、F、および G を参照。

76. 第一のポリペプチドコンストラクトが、二つ以上の第一のヘテロ二量体形成 N B D を含み、第二の複合体が、単一のヘテロ二量体形成 N B D を含む、態様 74 に記載の組成物。例えば、図 3 において、N B D が縦一列である M、F、G、および L ならびに、N B D が縦一列でない N および O を参照。

77. 第一のポリペプチドコンストラクトが、単一の第一のヘテロ二量体形成 N B D を含み、第二の複合体が、二つ以上の第二のヘテロ二量体形成 N B D を含む、態様 74 に記載の組成物。

78. 第一のポリペプチドコンストラクトが、二つ以上の第一のヘテロ二量体形成 N B D を含み、第二の複合体が、二つ以上の第二のヘテロ二量体形成 N B D を含む、態様 74 に記載の組成物。例えば、図 4 A の E を参照。

79. A D をさらに含む、態様 62 ~ 67 および 74 ~ 78 のいずれか一つに記載の組成物。例えば、図 3 の D および図 4 A の I を参照。

80. コンストラクトが、スキャフォールドを含む、態様 1 ~ 18、21 ~ 38、および 42 ~ 58 のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクト。

81. 第一および/または第二のポリペプチドコンストラクトが、独立して選択されるスキャフォールドを含む、態様 19 ~ 20、39 ~ 41、および 59 ~ 61 のいずれか一つに記載の組成物。

82. 第一および/または第二のポリペプチドコンストラクトが、独立して選択されるスキャフォールドを含む、態様 62 ~ 79 のいずれか一つに記載の組成物。

83. 少なくとも一つのスキャフォールド (例えば、各スキャフォールドが存在する) が、免疫グロブリンポリペプチドアミノ酸配列を含まない (例えば、免疫グロブリン F c、C H₁、C H₂、または C H₃ ドメインを含まない)、態様 80 ~ 82 のいずれか一つ

10

20

30

40

50

に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

84．少なくとも一つのスキファールド（例えば、各スキファールドが存在する）が、免疫グロブリンポリペプチドアミノ酸配列（例えば、IgFc、CH₂、またはCH₃アミノ酸配列）を含む、態様80～82のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

85．少なくとも一つ（例えば、各々）のスキファールドが、配列番号56もしくは57のIgG1 IgFcの独立して選択される免疫グロブリンポリペプチドアミノ酸配列、または配列番号56もしくは57と少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、態様84に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

86．少なくとも一つ（例えば、各々）のスキファールドが、独立して選択される非二量体化IgFcポリペプチドアミノ酸配列を含む、態様84に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

87．少なくとも一つ（例えば、各々）のスキファールドが、配列番号102のIgFcポリペプチドアミノ酸配列、または配列番号102と少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、態様86に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

88．少なくとも一つ（例えば、各々）のスキファールドが、配列番号58～60のうちのいずれか一つのIgG2、IgG3、もしくはIgG4 IgFcの独立して選択される免疫グロブリンポリペプチドアミノ酸配列、または配列番号58～60のうちのいずれか一つと少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、態様84に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

89．免疫グロブリンFc（IgFc）ポリペプチドアミノ酸配列が、抗体関連エフェクター機能（例えば、ADCC、ADCP、および/またはCDC）を誘導し得るか、またはIgFcポリペプチド配列が、ADCC、ADCP、およびCDCから選択される少なくとも一つの（例えば、すべて）抗体関連エフェクター機能を強化する（例えば、実質的に強化する）一つまたは複数の置換を含む、態様85～88のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。機能の変化は、一つ以上の置換を欠くポリペプチドコンストラクトと比較して評価され得る。

90．免疫グロブリンFcポリペプチドアミノ酸配列が、ADCC、ADCP、およびCDCから選択される少なくとも一つ（例えば、すべて）の抗体関連エフェクター機能を減少する（例えば、実質的に減少する）一つ以上の置換を含む（例えば、LALA置換）、態様85～88のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。機能の変化は、一つ以上の置換を欠くポリペプチドコンストラクトと比較して評価され得る。

91．一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つ（例えば、各々）のADが、CD40L、CD28、IFN-、TNFスーパーファミリーメンバー、TNF、リンホトキシン、リンホトキシン、BAFF（CD25）、B7スーパーファミリーメンバー、CD80、CD86、IL-15、IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、PD1、抗CD3、抗CTLA4、抗CD28のポリペプチドの全部または一部のアミノ酸配列からなる、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

92．少なくとも一つ（例えば、各々）のADが、IL-15、IL-12、またはIL-7に対して90%超または95%超の配列同一性（例えば、IL-15、IL-12、またはIL-7に対して97%超または99%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様91に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

93．少なくとも一つ（例えば、各々）のADが、(i)配列番号90の単鎖IL-12、または(ii)配列番号91の単鎖IL-12 p40サブユニットおよび/または配列番号92のp35サブユニット、またはそれらのIL-12配列のいずれかと95%超もしくは98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様91に記載のポリペ

10

20

30

40

50

プチドコンストラクトまたは組成物。

94．一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つの（例えば、各々の）ADが、PD1に結合するアミノ酸配列（例えば、PD1のアゴニストとして作用し得る抗PD1 s c F vまたはナノボディアミノ酸配列）またはPD1に結合するアミノ酸配列（例えば、抗PD L 1 s c F vまたはナノボディアミノ酸配列）を含む、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

95．一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つの（例えば、各々の）ADが、CD40に結合するアミノ酸配列（例えば、CD40シグナル伝達のアゴニストとして作用し得る抗CD40 s c F vまたはナノボディアミノ酸配列）またはCD40L（例えば、抗CD40L s c F vまたはナノボディアミノ酸配列）を含む、先行する態様のい
10

96．少なくとも一つ（例えば、各々の）ADが、配列番号96のCD40Lアミノ酸配列、配列番号95のCD40L三量体アミノ酸配列、または配列番号95もしくは96のいずれかと少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性（例えば、配列番号95もしくは96のいずれかと97%超もしくは99%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様95に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

97．一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つの（例えば、各々の）ADが、CD137/4-1BBに結合するアミノ酸配列（例えば、抗CD137 s c F vまたはナノボディアミノ酸配列）またはTGF に結合するアミノ酸配列（例えば、抗TGF s c F vまたはナノボディアミノ酸配列）を含む、先行する態様のいずれかに記載の
20

98．少なくとも一つ（例えば、各々の）ADが、配列番号94の4-1BBL配列、配列番号93の4-1BBL三量体アミノ酸配列、または配列番号93もしくは94のいずれかと少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性（例えば、配列番号93もしくは94のいずれかと97%超もしくは99%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様97に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

99．一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つ（例えば、各々の）ADが、IL-10に結合するアミノ酸配列（例えば、抗IL-10受容体に結合するアミノ酸配列（「IL-10R」）（例えば、抗IL-10R s c F vまたはナノボディアミノ酸配列）を含む、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物
30

100．一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つ（例えば、各々の）ADが、CTLA-4に結合するアミノ酸配列（例えば、抗CTLA-4 s c F vまたはナノボディアミノ酸配列）を含む、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

101．一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つの（例えば、それぞれ）ADが、CD3に結合するアミノ酸配列（例えば、抗CD3 s c F vまたはナノボディアミノ酸配列）を含む、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

102．一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つの（例えば、それぞれ）AD
40

103．少なくとも一つ（例えば、各々の）ADが、配列番号抗CD28 s c F v配列、または配列番号89と少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性（例えば、配列番号89と96%超もしくは配列番号89と99%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様102に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

104．一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つ（例えば、各々の）ADが、IFN- 受容体に結合するアミノ酸配列（例えば、抗IFN- 受容体 s c F vまたはナノボディアミノ酸配列）を含む、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンス
50

トラクトまたは組成物。

105. 少なくとも一つ（例えば、各々）のADが、配列番号97のs c I F N - ポリペプチド、または配列番号97と少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性（例えば、配列番号97と96%超もしくは99%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様104に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

106. 一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つの（例えば、それぞれ）ADが、CD16に結合するアミノ酸配列（例えば、抗CD16 s c F vまたはナノボディアミノ酸配列）を含む、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

107. 少なくとも一つ（例えば、各々）のADが、配列番号98もしくは103の抗CD16 V H Hポリペプチド、または配列番号98もしくは103のいずれかと少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性（例えば、配列番号98もしくは103のいずれかと96%超もしくは99%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様106に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。 10

108. 一つ以上のADが存在するとき、少なくとも一つ（例えば、各々）のADが、配列番号99のCD80アミノ酸配列、または配列番号99と少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性（例えば、配列番号99と96%超もしくは99%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

109. 一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つ（例えば、各々）のADが、配列番号100もしくは101のいずれかのCD86アミノ酸配列、または配列番号100もしくは101のいずれかと少なくとも90%もしくは少なくとも95%の配列同一性（例えば、配列番号100もしくは101のいずれかと96%超もしくは99%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。 20

110. 一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つ（例えば、各々）のADが、CpGリピート（例えば、CpGオリゴデオキシヌクレオチド配列）を有する核酸を含有する、前述の態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

111. 一つ以上のADが存在する場合、少なくとも一つ（例えば、各々）のADが、任意選択的に1、2、または3個のヌクレオチドの置換、欠失、または挿入を有する配列T C A T C A T T T T G T C A T T T T G T C A T T（配列番号69）を含む核酸を含む、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。 30

112. 一つ以上（例えば、二つ以上）TSBが、コンストラクトまたは組成物中に少なくとも一つ（例えば、少なくとも二つ、または各々）のTSBが、炭酸脱水酵素IX（CAIX）、カドヘリン、癌胎児性抗原（CEA）、細胞間葉上皮移行因子（c-MET）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）、上皮成長因子受容体（EGFR）ファミリーメンバー、上皮細胞接着分子（EPCAM）、エフリンA型受容体3（EphA3）、線維芽細胞活性化タンパク質アルファ（FAP）、葉酸結合タンパク質、葉酸受容体アルファ（FR-アルファ）、Er b - B 2受容体チロシンキナーゼ2（HER2）、Er b - B 2受容体チロシンキナーゼ3（HER3）、インスリン様成長因子1受容体（IGF-1R）、インテグリン V 3、インテグリン 5 1、溶質キャリアファミリー39メンバー6（Liv1）、黒色腫関連抗原ファミリーAメンバー（MAGEA）、黒色腫関連抗原ファミリーCメンバー（MAGEC）、メソテリン、ムチン（例えば、MUC1）、ニューヨーク食道扁平上皮細胞癌1タンパク質（NY-ESO-1）、癌/精巣抗原1A、癌/精巣抗原1B）、癌/精巣抗原2（NY-ESO-2、CTAG2）、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、核因子カッパBリガンドの受容体活性化因子（RANKL）、受容体チロシンキナーゼ様オーファン受容体1（ROR1）、テネイシン、TNF受容体スーパーファミリーメンバー10a（TRAILR1）、TNF受容体スーパーファミリーメンバー10b（TRAILR2）、および血管内皮成長因子受容体（VEGFR）からなる群から選択されるTAAについて親和性を示すように独立して選 40 50

択されるとき、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

113. 少なくとも一つ（例えば、少なくとも二つ、または各々）のTSBが、配列番号70の抗ヒトメソテリンscFv、または配列番号70と90%超もしくは95%超の配列同一性（例えば、配列番号70と96%超もしくは98%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様112に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

114. 少なくとも一つ（例えば、少なくとも二つ、または各々）のTSBが、配列番号71の抗ヒトメソテリンscFv(vH-vL)、または配列番号71と90%超もしくは95%超の配列同一性（例えば、配列番号71と96%超もしくは98%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様112または113に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

10

115. 少なくとも一つ（例えば、少なくとも二つ、または各々）のTSBが、配列番号72の抗ヒトメソテリンscFv(vL-vH)、または配列番号72と90%超もしくは95%超の配列同一性（例えば、配列番号72と96%超もしくは98%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様112~114のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

116. 少なくとも一つ（例えば、少なくとも二つ、または各々）のTSBが、配列番号73の抗ヒトメソテリンscFv(vH-vL)、または配列番号73と90%超もしくは95%超の配列同一性（例えば、配列番号73と96%超もしくは98%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様112~115のいずれか一つに記載のポリペ

20

プチドコンストラクトまたは組成物。
117. 少なくとも一つ（例えば、少なくとも二つ、または各々）のTSBが、配列番号74~78のいずれかの抗ヒトメソテリンscFv(vL-vH)、または配列番号74~78のいずれかと90%超もしくは95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様112~116のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

118. 抗ヒトメソテリンscFv(vL-vH)が、配列番号74~78のいずれかと96%超または98%超の配列同一性を有する、態様117に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

119. 少なくとも一つ（例えば、少なくとも二つ、または各々）のTSBが、配列番号79の抗ヒトメソテリンVHH(ナノボディ)、または配列番号79と90%超もしくは95%超の配列同一性（例えば、配列番号79と96%超もしくは98%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様112~118のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

30

120. 少なくとも一つ（例えば、少なくとも二つ、または各々）のTSBが、配列番号80の抗ヒトEpCAMscFv(vH-vL)、または配列番号80と90%超もしくは95%超の配列同一性（例えば、配列番号80と96%超もしくは98%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様112~119のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

121. 少なくとも一つ（例えば、少なくとも二つ、または各々）のTSBが、配列番号81の抗ヒトEpCAMscFv(vL-vH)、または配列番号81と90%超もしくは95%超の配列同一性（例えば、配列番号81と96%超もしくは98%超の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む、態様112~120のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

40

122. 少なくとも一つ（例えば、少なくとも二つ、または各々）のTSBが、配列番号82~86のいずれかの抗ヒトCTLA-4scFv(vL-vH)、または配列番号82~86のいずれかと90%超もしくは95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様112~121のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

123. 抗ヒトCTLA-4scFv(vL-vH)が、配列番号82~86のい

50

れかと96%超または98%超の配列同一性を有する、態様122に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

124. 一つ以上のTSBがコンストラクトまたは組成物中に存在する場合、少なくとも一つ(例えば、少なくとも二つ、または各々)のTSBが、チェックポイントタンパク質に対する親和性を示す、態様1~111のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

125. チェックポイントタンパク質が、T細胞活性化のVドメインIgサブレッサー(VISTA)、T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有-3(TIM-3)、PD-L1、CTLA-4、およびリンパ球活性化遺伝子3(LAG-3)からなる群より選択される、態様124に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

126. 一つ以上の免疫細胞エンゲージャー(ICE)がコンストラクトまたは組成物中に存在する場合、少なくとも一つ(例えば、少なくとも二つ、または各々)の独立して選択されたICEアミノ酸配列が、CD3、CD4、CD8、TCR、CD2、TCR鎖、TCR鎖、TCR鎖、TCR鎖、TCR鎖、TRGV9、CD84、CXCR1、CD13、CD33、CD34、およびCD16からなる群より選択されるタンパク質に対して親和性を有する(例えば、タンパク質に結合する)、態様1~125のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

127. 少なくとも一つのICEアミノ酸配列(例えば、少なくとも二つ、または各ICE配列)が、抗体、抗体の抗原結合断片(複数可)、Fab、Fab'、scFv、アプタマー、およびナノボディアミノ酸配列からなる群から独立して選択される、態様126に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

128. 少なくとも一つ(例えば、少なくとも二つ、または各々)のICEが、scFv、配列番号61もしくは62の配列を含む抗ヒトCD3、または配列番号61もしくは62のいずれかに対して90%超もしくは95%超の配列同一性を有する配列(例えば、配列番号61もしくは62のいずれかに対して96%超もしくは98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列)を含む、態様126もしくは127に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

129. 当該少なくとも一つ(例えば、少なくとも二つ、または各々)のICEが、配列番号63の配列を含む抗ヒトCD3 VHH、または配列番号63に対し90%超もしくは95%超の配列同一性を有する配列(例えば、配列番号63に対し96%超もしくは98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列)を含む、態様126~128のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

130. 少なくとも一つ(例えば、少なくとも二つ、または各々)のICEが、配列番号64~68のいずれか一つの配列、または配列番号64~68のいずれかと90%超もしくは95%超の配列同一性を有する配列(例えば、配列番号64~68のいずれかと96%超もしくは98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列)を含む抗ヒトCD3 scFv(vH-vL)を含む、態様126~129のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

131. 各NBDが、ATP結合カセット(ABC)トランスポーターのNBDである、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

132. ABCトランスポーターが、ABC1、MDR/TAP、MRP、ALD、OABP、GCN20、またはWhite ABCトランスポーターファミリーのメンバーである、態様131に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

133. ABCトランスポーターNBDが、ABCA1(配列番号1)、ABCB1(配列番号2)、ABCC1(配列番号3)、ABCD1(配列番号4)、ABCE1(配列番号5)、ABC F1(配列番号6)、ABCG2(配列番号7)、およびTAP1(配列番号9)から選択される配列、またはそれらの配列のいずれか一つと90%超もしくは95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様131に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

134. NBDが、配列番号1~7および9のアミノ酸配列のうちのいずれか一つと9

10

20

30

40

50

7%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様133に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

135. NBDが、aTAP2アミノ酸配列、配列番号11のTAP2アミノ酸配列、または配列番号11のアミノ酸配列と90%超もしくは95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様131に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

136. NBDが、配列番号11のアミノ酸配列と97%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様135に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

137. NBDが、TAP1 NBDアミノ酸配列を含む、態様131に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

138. NBDが、配列番号9の配列、または配列番号9の配列と90%超もしくは95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様137に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

139. NBDが、配列番号9のアミノ酸配列と97%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様138に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

140. NBDが、配列番号10、87、もしくは88のうちのいずれか一つのthe TAP1アミノ酸配列、またはそれらの配列のうちのいずれか一つと90%超もしくは95%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様131に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

141. NBDが、配列番号10、87、または88のTAP1アミノ酸配列と97%超または98%超の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、態様140に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

142. NBDが、配列番号88のTAP1アミノ酸配列、または配列番号88のTAP1アミノ酸配列と90%超もしくは95%超の配列同一性を有するTAP1アミノ酸配列を含む、態様140に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

143. NBDが、配列番号88のTAP1アミノ酸配列と97%超または98%超の配列同一性を有するTAP1アミノ酸配列を含む、態様142に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

144. NBDが、非ホモ二量体形成NBDを含む、態様131~143のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

145. NBDが、アミノ酸N185、S186、Q189、E191、およびQ192のうちの少なくとも一つ（例えば、少なくとも二つまたは少なくとも三つ）の置換を含む、態様144に記載のポリペプチドコンストラクト。

146. 少なくとも一つ（例えば、各々）のNBDが、少なくとも一つ（例えば、各々）のNBDを実質的にATP加水分解欠損にする置換を有する、態様131~145のいずれか一つに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

147. 少なくとも一つ（例えば、各々）のNBDが、配列番号8のように番号付けられたD668置換（例えば、D668N）、または少なくとも一つ（例えば、各々）のNBDを実質的にATP加水分解欠損にする対応する置換（例えば、配列番号9、10、87、もしくは88のいずれか）を有するTAP1 NBDを含む、態様146に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

148. 任意選択的に、NBDアミノ酸配列、スキヤフォールドアミノ酸配列、およびADアミノ酸配列のいずれかの間に位置する、一つ以上の独立して選択されるリンカー（例えば、可撓性または剛直なリンカー）を含む、先行する態様のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

149. 一つ以上の独立して選択されるリンカーが、配列番号16~35のいずれかから独立して選択されるアミノ酸配列を含む、態様148に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

150. 一つ以上の独立して選択される剛直なリンカーアミノ酸配列をさらに含む、態

10

20

30

40

50

様 1 4 8 または 1 4 9 に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

1 5 1 . 一つ以上の独立して選択される剛直なリンカーアミノ酸配列が、配列番号 3 6 ~ 5 5 のいずれかから独立して選択される、態様 1 5 0 に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

1 5 2 . 態様 1 ~ 1 5 1 のいずれかに記載の二つ以上のコンストラクト、または第一のポリペプチドコンストラクトおよび第二のポリペプチドコンストラクト（例えば、組成物）と、A T P の少なくとも一つの分子（例えば、少なくとも二つの分子）とを含む、コンストラクトの二量体またはより高次の複合体。

1 5 3 . 複合体中のコンストラクトの各々が、同一である、態様 1 5 2 に記載の二量体または他のより高次の複合体。

1 5 4 . 二量体または他のより高次の複合体が、ホモ二量体である、態様 1 5 3 に記載の二量体または他のより高次の複合体。

1 5 5 . 複合体中のコンストラクトの各々が、同一ではない、態様 1 5 2 に記載の二量体またはより高次の複合体。

1 5 6 . 二量体または他のより高次の複合体が、ヘテロ二量体である、態様 1 5 5 に記載の二量体または他のより高次の複合体。

1 5 7 . 態様 1 5 2 ~ 1 5 6 のいずれかのコンストラクトの二量体またはより高次の複合体のうちの少なくとも一つまたは少なくとも二つを含む、コンストラクトの集団（例えば、組成物としてのコンストラクトの群または集合体）。

1 5 8 . コンストラクトの二量体またはより高次の複合体のうちの少なくとも一つまたは少なくとも二つが、A D C C、A D C P、および / または C D C に影響を及ぼす免疫グロブリン定常領域を含む、態様 1 5 7 に記載の集団。

1 5 9 . コンストラクトの二量体またはより高次の複合体のうちの少なくとも一つまたは少なくとも二つが、独立して選択される A D を含む、態様 1 5 7 に記載の集団。

1 6 0 . コンストラクトの二量体またはより高次の複合体のうちの少なくとも一つまたは少なくとも二つが、独立して選択される I C E を含む、態様 1 5 7 または 1 5 9 に記載の集団。

1 6 1 . コンストラクトの二量体またはより高次の複合体のうちの少なくとも一つまたは少なくとも二つが、独立して選択される T S B を含む、態様 1 5 7 ~ 1 6 0 のいずれかに記載の集団。

1 6 2 . 図 2、3、4 A、または 4 B のいずれかに記載される構造を有する、態様 1 ~ 1 5 1 のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクト。

1 6 3 . 図 2、3、4 A、または 4 B のいずれかに示される構造を有する、態様 1 ~ 1 5 1 のいずれかに記載の一对のコンストラクト。

1 6 4 . 図 2 または 図 3 のいずれかに示される構造を有する、態様 1 5 2 ~ 1 5 6 のいずれかに記載の二量体またはより高次の複合体。

1 6 5 . 図 4 または 図 4 B のいずれかに記載の構造を有する、態様 1 5 2 ~ 1 5 6 のいずれかに記載の二量体またはより高次の複合体。

1 6 6 . 図 2、3、4 A、または 4 B のいずれかに示される構造を有する、態様 1 5 2 ~ 1 5 6 のいずれかに記載の二量体またはより高次の複合体。

1 6 7 . T A P 1 もしくは T A P 2 N B D アミノ酸配列のホモ二量体、または T A P 1 および T A P 2 N B D アミノ酸配列のヘテロ二量体を含む、態様 1 5 2 ~ 1 5 6 のいずれかに記載の二量体またはより高次の複合体。

1 6 8 . N B D に結合するのに十分な A T P の存在下で、C D 4 + T 細胞、T 細胞、NK 細胞、骨髄由来抑制細胞、および / または C D 8 + T 細胞を刺激する方法であって、細胞を態様 1 ~ 1 5 1 のいずれかに記載のコンストラクトまたは組成物と接触させることを含む、方法。

1 6 9 . インビトロで、または哺乳動物もしくは非哺乳動物の体外で実施される、態様 1 6 8 に記載の方法。

1 7 0 . 細胞または組織で実施される、態様 1 6 9 に記載の方法。

10

20

30

40

50

171. インビボで、または哺乳動物の体内で実施される、態様168に記載の方法。

172. 態様1~151のいずれか一つに記載のコンストラクトまたは組成物を患者または対象に投与することを含む、癌を治療する方法。

173. 哺乳動物がヒトである、態様169~172のいずれかに記載の方法。

174. 癌の治療のための医薬の調製のための、態様1~151のいずれかに記載のコンストラクトまたは組成物の使用。

175. 癌が、固形腫瘍を含む、態様172~174のいずれか一つに記載の方法または使用。

176. 癌の治療のための態様1~151のいずれかに記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

177. 癌が、固形腫瘍を含む、態様176に記載のポリペプチドコンストラクトまたは組成物。

178. 癌が、中皮腫、黒色腫、肉腫、癌、癌肉腫、リンパ腫、または生殖細胞腫瘍である、態様172~176のいずれかに記載の方法、使用、コンストラクト、または組成物。

179. 態様1~151のいずれかに記載の、一つ以上のコンストラクト、または組成物の一つ以上のコンストラクトをコードする配列を含む、核酸。

180. 任意選択的に、プロモーター（例えば、構成的プロモーター）または誘導性プロモーターの制御下にある、態様179の核酸を含むベクター。

181. 態様179または180のベクターまたは核酸を含む、細胞。

182. 細胞が、哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または細菌細胞である、態様181に記載の細胞。

【実施例】

【0152】

（実施例1）

溶液中でホモ二量体形成するTAP1 NBDの機能性を試験するために、(i) N676、S677、Q680、E682、およびQ683（例えば、N676G、S677N、Q680R、E682Q、およびQ683R置換）、(ii) 配列中に存在するシステインのセリン（配列番号10）での置換、および(iii) 精製のためのC末端Hisタグ、を含むヒトTAP1 NBDを、E. coli中で発現させ、その後精製した。分子量マーカーおよび精製されたタンパク質の試料を、図8に示される還元および非還元条件下でSDS-PAGEゲル分析に供した（レーン：M - 分子量マーカー、R - 還元タンパク質試料、NR - 非還元タンパク質試料）。

【0153】

精製されたTAP1 NBDの試料を、1mMのADPまたは1mMのATPに曝露し、サイズ排除クロマトグラフィーに供した。図9に示す結果は、ADPの存在下では37kDaの有効分子量を有するタンパク質クロマトグラフを示し、ATPの存在下では57kDaの有効分子量を有するタンパク質クロマトグラフを示す。結果は、ATPの存在下でTAP1タンパク質が二量体化することを示す。質量光度法および動的光散乱(DLS)を使用して二量体形成を確認し、分子量を決定した。質量測定は、クロマトグラフィーの結果と一致して、1mMのATPの存在下で62kDaの有効分子量を生じさせた（図10を参照）。1mMのADP（Aの図11）または1mMのATP（Bの図11）の存在下での20mMのTris（pH8.0）、50mMのNaCl、5mMのMgCl₂、10%のグリセロール中でのDLSは、ADPの存在下で5.517のサイズをもたらし、ATPの存在下で8.057のサイズをもたらし、1mMのATPの存在下でのタンパク質の二量体化と一致した。DLSの結果を以下の表に示す。

10

20

30

40

50

【表 2】

試料名	多分散度指数 (PI)	体積によるサイズ分布 (nm)
ADP 緩衝液中の NBD1	0.3356	5.157
ATP 緩衝液中の NBD1	0.6278	8.057

【0154】

(実施例 2)

SpyTag3、TEVプロテアーゼ、およびC末端に付加されたHisタグを含むペプチドを有する配列番号87のTAP1 NBDを、E. coli. で発現させ、細胞をペレット化し、分析まで凍結させた。TAP1 NBD断片を、細胞溶解、続いてHisTrapカラムでのクロマトグラフによって精製した。分析のために、セルペレットを解凍し、100 μg/mlのリゾチーム、二つのプロテアーゼ阻害剤錠剤 (Thermo Pierce A32965)、およびUniversal Nuclease (Thermo Pierce 88702) を補充した200 mlの溶解緩衝液 (20 mMのTris-Cl pH 8.0、500 mMのNaCl、5 mMのMgCl₂、10%のグリセロール、2 mMのATP) で再懸濁し、12.5 U/mlに添加した。細胞を、4で30分間撹拌しながらインキュベートし、次いで、80%強度で合計4分間の活性時間 (サイクル当たり、5秒オン、氷上で15秒静止) 超音波処理によって溶解した。次いで、溶解物を、4で1時間、12,000 × gで遠心分離することによって浄化し、次いで0.22-μmで濾過し、0.5 ml/分のHisTrap HPカラム (Cytiva) に0.5 ml/分でロードし、蠕動ポンプで一晩再循環させた。翌日、カラムをフロースルーに切り替え、1 ml/分で完全に可溶化物をロードした後、カラムを、7 mMの-メルカプトエタノールおよび20 mMのイミダゾールを補充した10カラム体積 (CV) の溶解緩衝液で洗浄した。次いで、カラムをAKTExpress FPLCに移し、結合タンパク質を、結合緩衝液 (20 mM Tris-Cl pH 8.0、200 mM NaCl、5 mM MgCl₂、10%グリセロール、2 mM ATP、0.5 mM PMSF) 中、40 CVにわたって0~500 mMのイミダゾール勾配で溶出した。カラム画分をSDS-PAGEによって評価し、標的タンパク質を含有する画分をプールし、10 mlに濃縮し (10 kDa MWCO)、その後、標的緩衝液 (20 mM Tris-Cl pH 8.0、50 mM NaCl、5 mM MgCl₂、10%グリセロール、1 mM ATP) 中で平衡化したSuperdex 200 16/600カラムに3回注入 (注入当たり約3.3 ml) としてローディングした。溶出ピーク画分をSDS-PAGEによって評価し、標的タンパク質含有画分をプールし、10 mg/mlに濃縮し (10 kDaの分子量カットオフ)、その後、分注し (500 μl/チューブ)、4で保存した。

【0155】

精製されたタンパク質を、分子量サンプルと共にSDS-PAGEに供した。クーマシーブルー染色ゲルを図12に提供し、左端のレーンは分子量サンプルであり、右端のレーンは精製タンパク質である。

【0156】

精製されたタンパク質の試料 (それぞれ1 mg) を、製造業者の指示に従ってPD-10カラム (Cytiva 17085101) 上で緩衝液交換した。緩衝液交換のために、PD-10脱塩カラムを、1 mMのATPまたは1 mMのADPのいずれかを含有する標的緩衝液 (20 mMのTris-Cl pH 8.0、50 mMのNaCl、5 mMのMgCl₂、10%のグリセロール) で平衡化した。1ミリグラム (100 μlの10 mg/mlストック) のタンパク質を、2.4 mlの標的緩衝液と共に各カラムに加え、カラムを50 mlの円錐管内で1000 × gで2分間遠心分離し、溶出液を収集した。次いで、緩衝液交換したタンパク質を0.5 ml (約60 μM) に濃縮し、ATPまたはADP

を含有する適切な緩衝液中で平衡化され、0.5 ml / 分で溶出された Superdex S200 Increase カラム (Cytiva) に装填した。ATP 含有試料は、およそ 65 kDa の分子量に対応する 15.75 ml の体積で溶出し、一方で ADP 試料は、およそ 38 kDa に対応する 16.81 ml で溶出した。クロマトグラフィー分析のトレースを、図 12 に示す。

【0157】

ADP および ATP の存在下でのサイズ排除クロマトグラフィーによる分子量の決定のために、精製されたタンパク質試料 (それぞれ 1 mg) を、製造業者の指示に従って PD-10 カラム (Cytiva 17085101) 上で緩衝液交換した。簡潔に述べると、PD-10 脱塩カラムを、1 mM の ATP または ADP のいずれかを含有する標的緩衝液 (20 mM の Tris-Cl pH 8.0、50 mM の NaCl、5 mM の MgCl₂、10% のグリセロール) で平衡化した。1 ミリグラム (100 μl の 10 mg/ml ストック) のタンパク質を、2.4 ml の標的緩衝液と共に各カラムに加え、カラムを 50 ml の円錐管内で 1000 × g で 2 分間遠心分離し、溶出液を収集した。次いで、緩衝液交換したタンパク質を 0.5 ml (約 60 μM) に濃縮し、Superdex S200 Increase カラム (Cytiva 社) にロードし、ATP または ADP を含有する適切な緩衝液中で 0.5 ml / 分で平衡化した。ATP 含有試料は、およそ 65 kDa の分子量に対応する 15.75 ml の体積で溶出し、一方で ADP 試料は、およそ 38 kDa に対応する 16.81 ml で溶出した。

【0158】

(実施例 3)

NBD ポリペプチドの非誘導性および誘導性発現の評価のために、E. coli BL21 (DE3) の試料を、SpyTag3、TEV プロテアーゼ部位、および C 末端でタグ付けされた His を含むペプチドを用いた、配列番号 87 または配列番号 88 の NBD のイソプロピル-β-D-チオガラクトシド (IPTG) 誘導性発現を可能にするベクターで形質転換した。非誘導画分および誘導画分の分析については、1 OD - ml (例えば、2.5 ml の 0.4 OD) に相当するアリコートが採取されたとき、0.4 OD の誘導まで、各培養物について 600 nm での光学密度 (OD) をモニタリングした。アリコート中の細胞を 6800 × g で 3 分間ペレット化し、ペレットを 300 μl の 1 × PBS 中に再懸濁し、その後、再懸濁した物質を -80°C で凍結した。80 μM の IPTG を用いた誘導後、細胞を増殖させ、1 OD - ml (例えば、0.25 ml の 4 OD) の同等の試料を、誘導後の最終収穫中に収集した。誘導の分析のために、凍結試料を解凍し、すべての試料中の細胞を、等体積の 2 × 溶解緩衝液 (0.2% Triton X-100、100 μg/ml リゾチーム、および Pierce からの 2 × 濃度のユニバーサルヌクレアーゼを含む 1 × PBS) と混合することによって溶解した。試料を、4 で 30 分間ロッカー上でインキュベートし、その後、溶解物を 21,000 × g で 10 分間回転させて、破片をペレット化した。上清の試料 (30 μl) を、10 μl の 4 × SDS-PAGE ローディング緩衝液と混合し、70 で約 5 分間加熱し、次いで SDS-PAGE ゲルにロードした。結果を図 13 の SDS-PAGE ゲル A に示す。

【0159】

サイズ排除クロマトグラフィーによる発現レベルおよび分子量を決定するために、配列番号 87 および 88 の NBD ポリペプチドの試料を E. coli 中で発現させ、実施例 2 のように SDS-PAGE およびクロマトグラフィー分析のために精製した。配列番号 87 のものと比較して、配列番号 88 の「キャップされた」NBD について約 2 桁 (90 倍) 高いクロマトグラフィー分子量決定およびタンパク質収率の結果を、以下の表に提供する。

10

20

30

40

50

【表 3】

TAP1 ポリペプチド	培養からの収量	1mM ADP 緩衝液中 の MW	1mM ATP 緩衝液中 の MW
配列番号 87	100 μ g/リットル	38kDa	65kDa
配列番号 88	9mg/リットル	38.1kDa	78kDa

【 0 1 6 0 】

図 1 3 は、A での誘導発現および非誘導発現の SDS PAGE 分析、ならびに B での精製タンパク質の分析を提供する。図 1 3 に提供される還元 SDS - PAGE ゲル画像のレーンは以下の通りである。 10

【表 4】

ゲル (A) 誘導発現対非誘導発現		ゲル (B) 配列番号 88 の精製された NBD ポリペプチドの評価	
レーン	試料	レーン	試料
1	分子量マーカー	1	分子量マーカー
2	誘導前の配列番号 87 の NBD ポリペプチドの発現	2	追加の精製された NBD ポリペプチド
3	誘導後の配列番号 87 の NBD ポリペプチドの発現 (白色のボックスおよび矢印を参照)	3	追加の精製された NBD ポリペプチド 20
4	誘導前の配列番号 88 の NBD ポリペプチドの発現	4	配列番号 88 の精製された NBD ポリペプチド
5	誘導後の配列番号 88 の NBD ポリペプチドの発現 (白色のボックスを参照)		

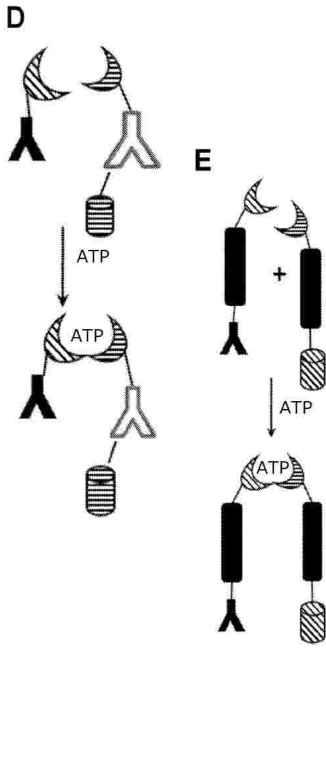
30

40

50

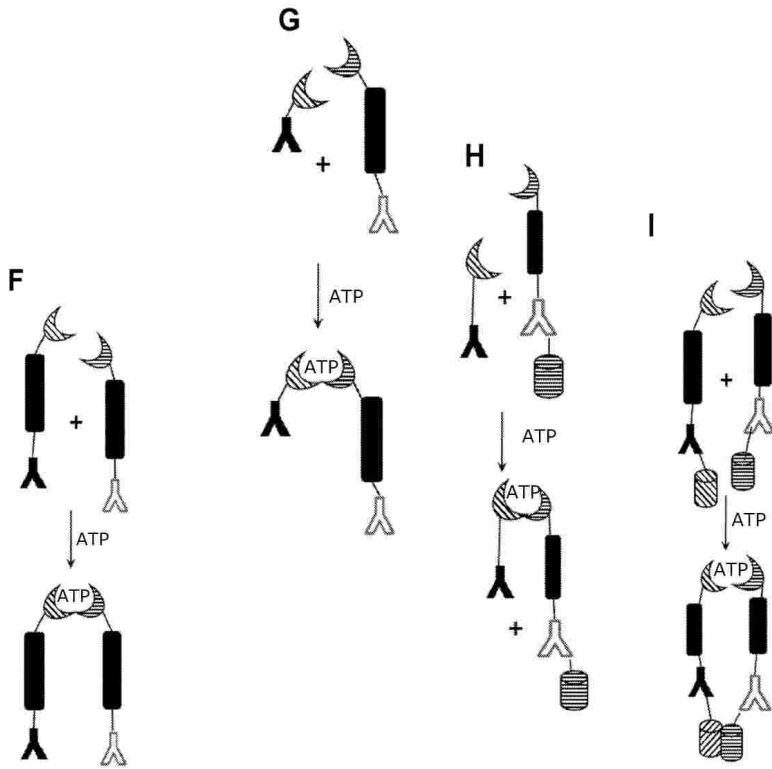
【 図 3 - 2 】

図 3 (続き)



【 図 3 - 3 】

図 3 (続き)

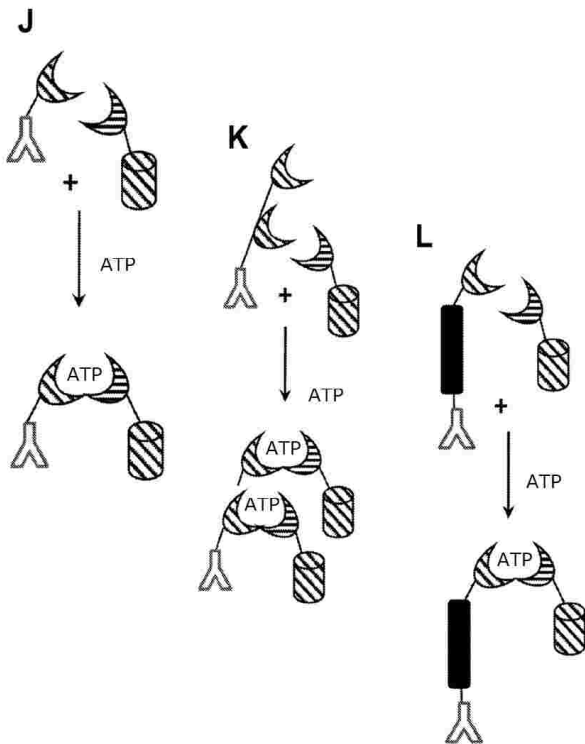


10

20

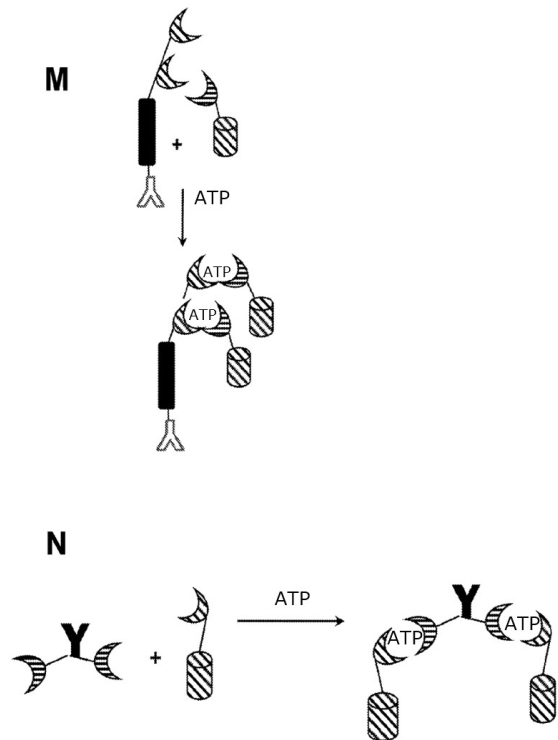
【 図 3 - 4 】

図 3 (続き)



【 図 3 - 5 】

図 3 (続き)



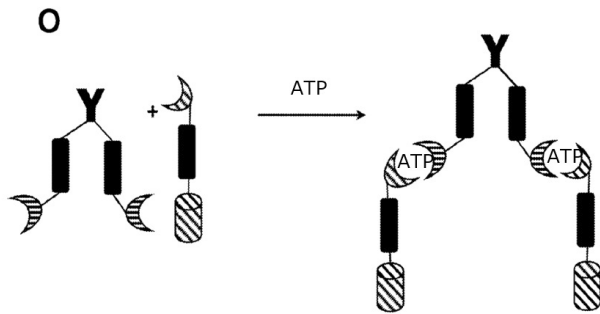
30

40

50

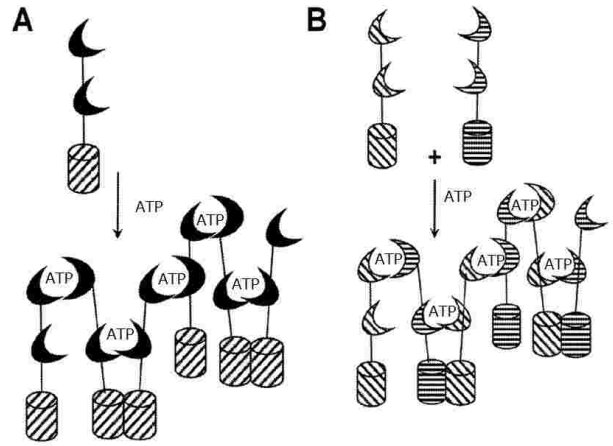
【 図 3 - 6 】

図 3 (続き)



【 図 4 A - 1 】

図 4A



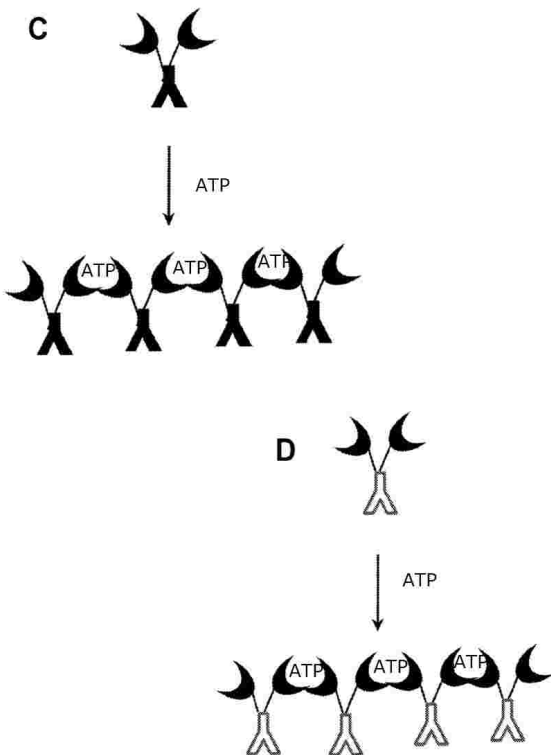
10

20

- / 任意のリンカー配列
- 第一のヘテロ二量体形成 NBD
- 第二のヘテロ二量体形成 NBD
- ホモ二量体形成 NBD
- 腫瘍特異的結合剤 (例えば、抗 HER2 または抗 PSMA)
- 免疫細胞エンゲージャーは概して一個である (例えば、T 細胞または NK 細胞エンゲージャー、例えば抗 CD3 Fab または VHH)
- 第一の免疫調節ドメイン (活性化ドメイン)
- 第二の免疫調節ドメイン (活性化ドメイン)
- スキャフォールド (例えば、非二量体化)

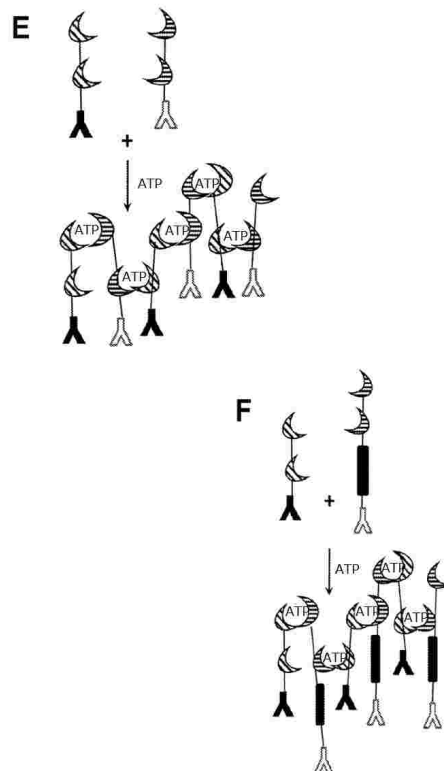
【 図 4 A - 2 】

図 4A (続き)



【 図 4 A - 3 】

図 4A (続き)



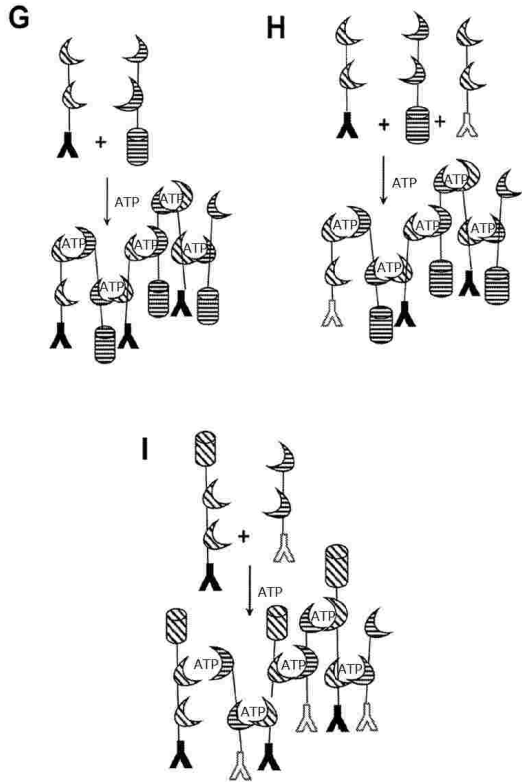
30

40

50

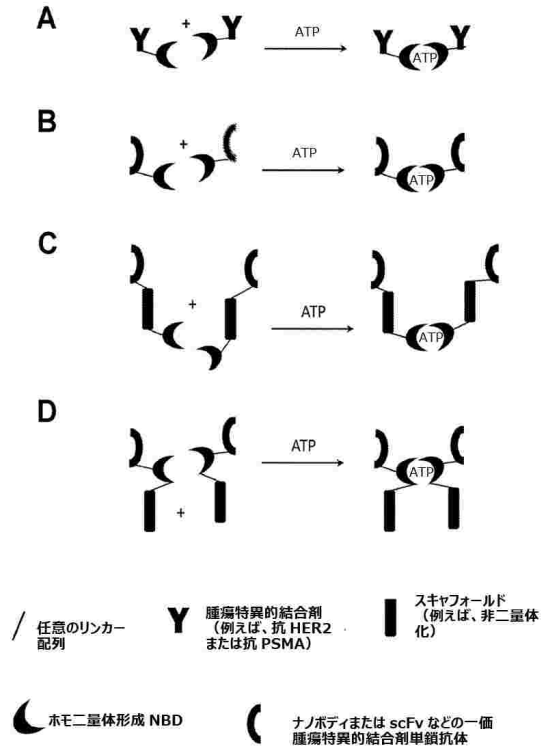
【 図 4 A - 4 】

図 4A (続き)



【 図 4 B 】

図 4B



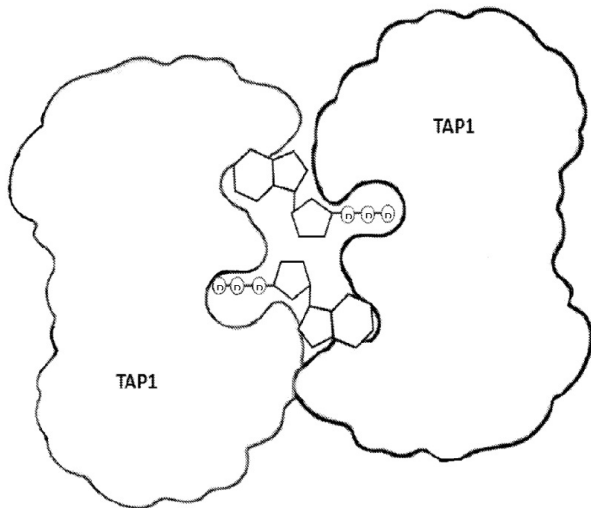
10

20

10

【 図 5 】

図 5

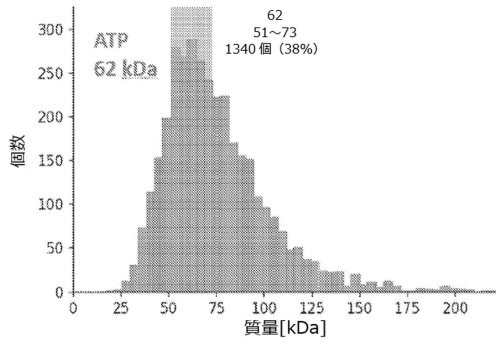


【 図 6 - 1 】

47	GLLTFELHL---EGLV---QFQDV---GFAYENRFDVLLQGLTFTLRREGVTVLVG	105	FNGSGKSTVAALLQNLVQFTGGQLLDGK--PLPQYEHRLHREVAAGQEPQVFGRSIQ	148	ENIAYGLTKET-MEETRAAVKSGHSFY---SG-----LPGYDTVEDEA	
46	--EI--LDGGQDIL--EIKEL-----VKIYRR-RRKPAVDRIQVLPBGCFCGLIG	106	VNGAGKSTFRGLTGDFTVTRSDAFLNKN--SLLS-NIHEVHQN-----	141	---MGFCQFDALTELTGRHVEFTALLRGVEKVG--KVGWAIKRLGKVKGRKY	
47	EGLMPNTL---EGNV---TFGEV---VFNYPFRFDLVQLGLSLEVKKQTLALVG	107	SSGCGKSTVQLLRFYDPLAGKVLIDGK--EIKELNVOMLRAHLGIVSQEELFDCSIA	149	ERIAYGDSKRVVQSBELVRAKGANIHAI---ES-----LPNKISIKVGDK	
47	--RPFYKDGSTNSI---TVENA---FTTW-ARSDPFTLNGITFSLPGGALVAVVG	102	QVGGCKSSLGALLAMBDKVEGHAIKGS--VAIVPQQAQLND--SLRENILFSCOLE	133	EFTRSYI-----QACALPFDL---EY-----LPSGDRIRLIGEK	
43	--GFLKIRGVVDVEQIICENI---FTI--VTPSGEVVVASLNRVREGHMLLITG	106	PNGCGKSSLFRILGSLWFTYGSVLYKPPQRMFYIQRPTMVG---SLRDQVLPDSVE	143	DQKRGHSRQD--DEAIL--DVHLEHLI---DSKDET--KTOALVCOQDLHLINEN	
49	GALSIYNL---FSLNLEK---T-----THRVC--ANAFKLHELPL-IPRGEHVLGIVG	94	TNGIGKSTALKILAGKQKLNKDDPPDQDEI---LTFPRGS---EL--QNVFTKILE	122	DOLKARFQI--VDQIFKAAKGL--EY-----QAKSKGLGKSGE	
41	PPLS-----PFVL---GLHGV---FTGV--QGGKLFENLFDGINDSRICIVG	51	PNGVGSSTLILLTGLTFTHEGMRNHR--IK-----IGFNGQYABQL-----RMEETFT	122	EILGKSTHLPF---QAKSKGLGKSGE	
54	--RFSLSLPRAAA-VNI---BFRDLSYVPEGPMWRKKGKTKLLKIGSKTNGSGLVALMG	54	PSGAGKSTLIMINILAGVREYGRKGAVLI-N--GLFR-DLRCFRKV-----	149	----SCYIWDMDLLEHLYVOENMMVSAHL-KLOBKDEGRRENVKELLTALGLLSCMTR	
					143	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	
					141	
					149	
					133	
					143	
					122	
					149	
					148	

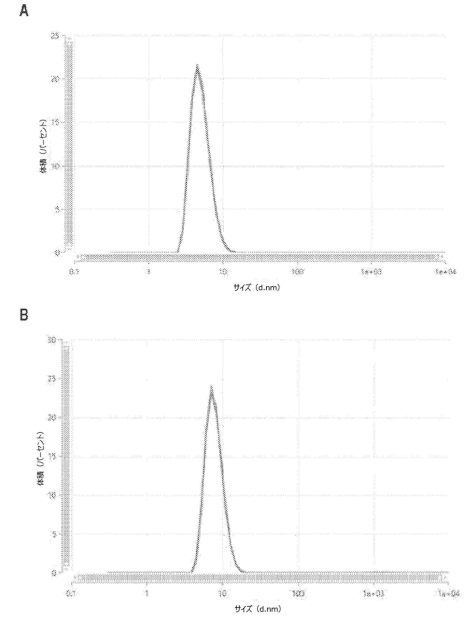
【 図 1 0 】

図 10



【 図 1 1 】

図 11

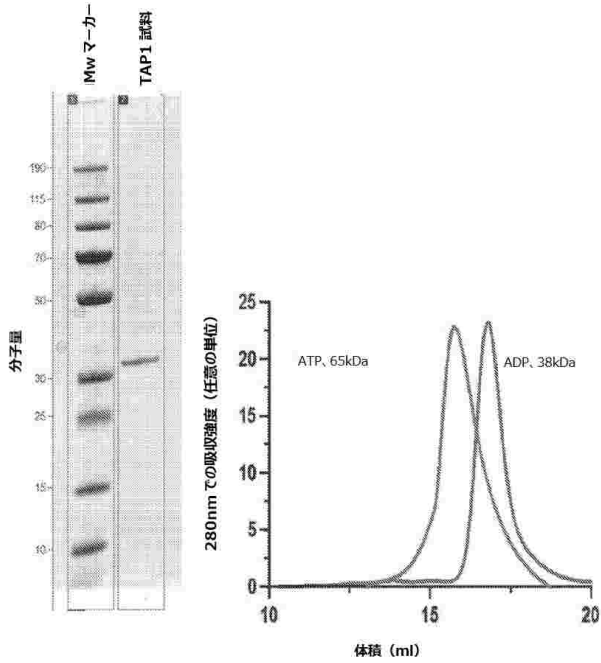


10

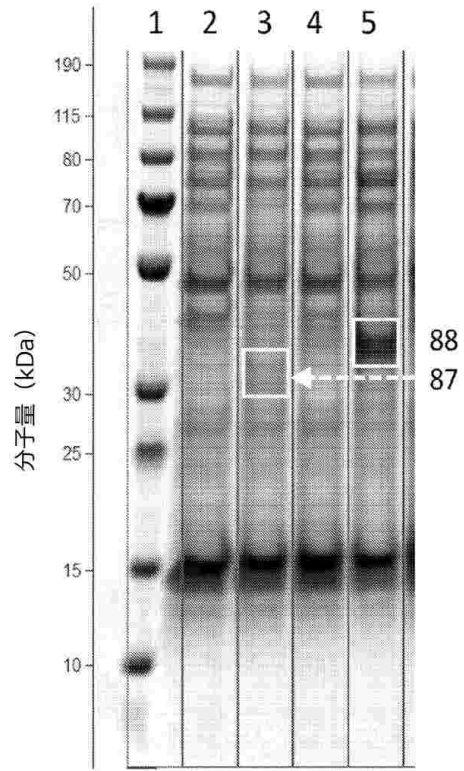
20

【 図 1 2 】

図 12



【 図 1 3 A 】



30

40

図 13A

50

【 図 1 3 B 】

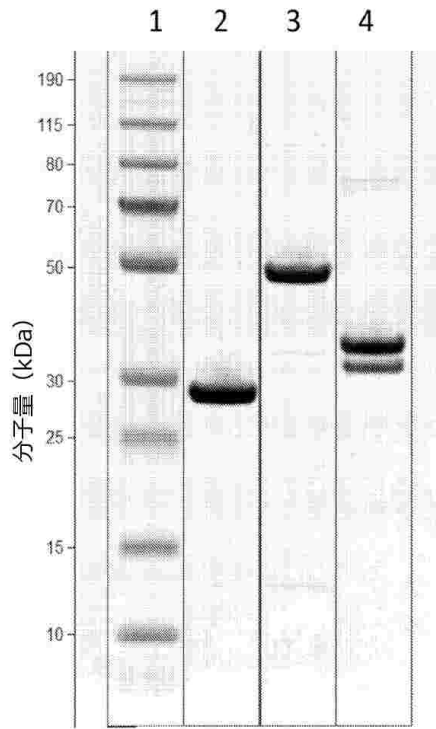


图 13B

【 配列表 】

2025508958000001.xml

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/14302

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - INV. A61K 47/64; A61K 38/00; A61K 39/00; A61K 39/395; A61P 35/00; C07K 14/705; C07K 14/725 (2023.01) ADD.		
CPC - INV. A61K 47/64; A61K 38/00; A61K 39/00; A61K 39/395; A61P 35/00; C07K 14/705; C07K 14/7051; C07K 14/70514; C07K 14/70535 ADD. C07K 2319/30; C07K 2319/40		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/051091 A1 (CUE BIOPHARMA INC) 14 March 2019; paragraphs [0035]-[0036], [00120] and [00170]	1-12
A	US 2019/0248855 A1 (UAB RESEARCH FOUNDATION) 15 August 2019; paragraph [0081]	1-12
A	LOCHER. "Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters" 239-245. Philosophical Transactions of the Royal Society B. Web. 28 October 2008; page 239. first-second column; figure 2; figure 3b; DOI: -10.1098/rstb.2008.0125	1-12
E.X	WO 2023/187947 A2 (CROSSLINK THERAPEUTICS INC) 07 September 2023; entire document	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 September 2023 (28.09.2023)		Date of mailing of the international search report OCT 27 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/14302

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. forming part of the international application as filed.
- b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:
An "Invitation to Furnish Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Listing and to Pay, Where Applicable, Late Furnishing Fee" (Form PCT/ISA/225), was mailed on 31 May 2023 (31.05.2023). The sequence listing filed with the ISA/US on 28 June 2023 (28.06.2023) in response to the Form PCT/ISA/225 was defective. Therefore, the international search was carried out only to the extent possible without a sequence listing.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/14302

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 20-29
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Supplemental Page

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I, Claims 1-12

30

40

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/14302

-Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, Claims 1-12 are directed toward a polypeptide construct comprising a nucleotide binding domain (NBD) amino acid (aa) sequence, and tumor-specific binder (TSB) aa sequence, optionally joined by a linker peptide sequence; wherein the NBD comprises one or more adenosine triphosphate (ATP) binding sites and can either homodimerize or heterodimerize with a cognate non-identical NBD in the presence of ATP (e.g., the NBD of TAP1 or TAP2 which can heterodimerize); and a composition comprising said constructs.

Group II, Claims 13-17 are directed toward a polypeptide construct comprising a nucleotide binding domain (NBD) amino acid (aa) sequence, and an activating domain (AD) aa sequence, optionally joined by a linker peptide sequence; wherein the NBD comprises one or more adenosine triphosphate (ATP) binding sites and can either homodimerize or heterodimerize with a cognate non-identical NBD in the presence of ATP; and a composition comprising said construct.

Group III, Claims 18-19 are directed toward a polypeptide construct comprising a nucleotide binding domain (NBD) amino acid (aa) sequence, and an immune cell engager (ICE) aa sequence, optionally joined by a linker peptide sequence; wherein the NBD comprises one or more adenosine triphosphate (ATP) binding sites and can heterodimerize with a cognate non-identical NBD in the presence of ATP (e.g., the NBD of TAP1 or TAP2 which can heterodimerize).

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include a tumor-specific binder, not present in Groups II-III; the special technical features of Group II include an activating domain, not present in Group I or III; the special technical features of Group III include an immune cell engager, not present in Groups I-II.

Groups I-III share the technical features including: a polypeptide construct comprising a nucleotide binding domain (NBD) amino acid (aa) sequence, optionally joined by a linker peptide sequence; wherein the NBD comprises one or more adenosine triphosphate (ATP) binding sites and can heterodimerize with a cognate non-identical NBD in the presence of ATP (e.g., the NBD of TAP1 or TAP2 which can heterodimerize); and a composition. Groups I and II share the technical features including: homodimerize or heterodimerize.

However, these shared technical features are previously disclosed by the publication entitled 'Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters' by Locher, et al. (hereinafter 'Locher') in view of US 2019/0248855 A1 to UAB Research Foundation, et al. (hereinafter 'UAB').

Locher discloses a polypeptide construct comprising a nucleotide binding domain (NBD) amino acid (aa) sequence (page 239, second column; figure 2), optionally joined by a linker peptide sequence; wherein the NBD comprises one or more adenosine triphosphate (ATP) binding sites and can either homodimerize or heterodimerize with a cognate NBD in the presence of ATP (e.g., the NBD of TAP1 or TAP2 which can heterodimerize) (when ATP is bound the interface closes and the nucleotides are sandwiched between the NBDs, wherein the NBD can homodimerize with a cognate NBD; page 239, second column; figure 3b).

Locher does not disclose a non-identical NBD or a composition.

UAB discloses a non-identical NBD (two non-identical nucleotide binding domains; paragraph [0061]) and a composition (paragraph [0065]).

It would have been a matter of obvious experimentation to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure Locher, to include a non-identical NBD, as disclosed by UAB, in order to provide a superior method for increasing the stability of the polypeptide construct.

Since none of the special technical features of the Groups I-III inventions are found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Locher and UAB references, unity of invention is lacking.

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	C 0 7 K 14/54	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 K 47/65 (2017.01)	A 6 1 K 47/65	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
	A 6 1 K 38/02	

(32)優先日 令和4年6月21日(2022.6.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

2 1 3 9 ケンブリッジ パール ストリート 2 4 4 シーノオー クロスリンク セラピューティック
ス インク .

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y
AB01 AC14 BA02 CA44 CA46
4C076 AA95 CC27 CC41 EE59
4C084 AA02 AA07 BA02 BA03 BA41 CA59 NA05 NA13 ZB261 ZB262
ZB271 ZB272
4C085 AA25
4H045 AA10 AA30 BA09 BA41 CA40 DA02 DA50 DA76 EA20 EA50
FA74