

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7082604号

(P7082604)

(45)発行日 令和4年6月8日(2022.6.8)

(24)登録日 令和4年5月31日(2022.5.31)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

A 6 1 K 38/19 (2006.01)

A 6 1 K 38/19

A 6 1 K 38/20 (2006.01)

A 6 1 K 38/20

A 6 1 K 38/21 (2006.01)

A 6 1 K 38/21

A 6 1 K 38/48 (2006.01)

A 6 1 K 38/48

請求項の数 25 (全307頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-500742(P2019-500742)

(86)(22)出願日 平成29年3月21日(2017.3.21)

(65)公表番号 特表2019-512272(P2019-512272
A)

(43)公表日 令和1年5月16日(2019.5.16)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/023483

(87)国際公開番号 WO2017/165464

(87)国際公開日 平成29年9月28日(2017.9.28)

審査請求日 令和2年3月23日(2020.3.23)

(31)優先権主張番号 62/310,929

(32)優先日 平成28年3月21日(2016.3.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/310,899

(32)優先日 平成28年3月21日(2016.3.21)

最終頁に続く

(73)特許権者 521131317

マレンゴ・セラピューティクス、インコ

ーポレーテッド

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02

139, ケンブリッジ, メモリアル・ド

ライブ 840, フォース・フロア

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100196508

弁理士 松尾 淳一

(74)代理人 100122644

弁理士 寺地 拓己

(72)発明者 ロウ, アンドレアス

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多重特異性および多機能性分子ならびにその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

多重特異性または多機能性のポリペプチド分子であって、隣接しない第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含み、第1のポリペプチドは二量体化モジュールの第1のメンバーを含み、第2のポリペプチドは二量体化モジュールの第2のメンバーを含み、
ここで：

(i) 第1のメンバーは、NKp30に結合する抗体分子またはその抗原結合ドメインに結合し、そして

多重特異性または多機能性のポリペプチド分子は、癌抗原に結合する抗体分子またはその抗原結合ドメインを含む腫瘍標的化部分をさらに含み、腫瘍標的化部分は、第1のメンバーまたは第2のメンバーに結合する；あるいは

(ii) 第1のメンバーは、NKp46に結合する抗体分子またはその抗原結合ドメインに結合し、そして

(a) 多重特異性または多機能性のポリペプチド分子は、第1の癌抗原に結合する第1の抗体分子またはその抗原結合ドメインを含む第1の腫瘍標的化部分、第2の癌抗原に結合する第2の抗体分子またはその抗原結合ドメインを含む第2の腫瘍標的化部分、およびサイトカインをさらに含むか、または

(b) 多重特異性または多機能性のポリペプチド分子は、サイトカイン分子、間質調節部分、および癌抗原に結合する抗体分子またはその抗原結合ドメインを含む腫瘍標的化部分をさらに含み、

第1の腫瘍標的化部分、第2の腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、間質調節部分、および腫瘍標的化部分のそれぞれは、第1のメンバーまたは第2のメンバーに結合する、前記ポリペプチド分子。

【請求項2】

第2の腫瘍標的化部分が、第1の腫瘍標的化部分と同じ癌抗原に結合する；

第2の腫瘍標的化部分が、第1の腫瘍標的化部分と同じ癌抗原における異なるエピトープに結合する；または

第2の腫瘍標的化部分および第1の腫瘍標的化部分が、異なる癌抗原に結合する、

請求項1に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項3】

サイトカイン分子が、インターロイキン2（IL-2）、インターロイキン7（IL-7）、インターロイキン12（IL-12）、インターロイキン15（IL-15）、インターロイキン18（IL-18）、インターロイキン21（IL-21）、およびインターフェロンγ、ならびにそれらの機能的変異体から成る群より選択され、

サイトカイン分子がモノマーまたは二量体である。

請求項1または2に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項4】

第1のメンバーが、免疫グロブリン鎖の第1の結晶化可能断片領域（Fc領域）であり、

第2のメンバーが、免疫グロブリン鎖の第2の結晶化可能断片領域（Fc領域）である、

請求項1～3のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項5】

第1のFc領域と第2のFc領域との二量体化が、非改変インターフェースと比べてヘテロ多量体：ホモ多量体のより高い比率が生じるように、第1のFc領域および第2のFc領域のFcインターフェースに、対になった空洞－突起（「ノブ・イン・ホール」）、静電相互作用、または鎖交換の1以上を提供することによって促進される、請求項4に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項6】

癌抗原、第1の癌抗原、第2の癌抗原、または第1の癌抗原および第2の癌抗原が：

（a）血液癌、固形腫瘍、転移癌、軟部組織腫瘍、転移性病変、またはそれらの組合せに存在する；

（b）腫瘍抗原もしくは間質抗原または血液抗原である；

（c）線維性または線維形成性固形腫瘍に存在する腫瘍抗原もしくは間質抗原である；または

（d）限定された腫瘍灌流、圧縮された血管、または線維性腫瘍間質の1以上を有することが特徴である種類の腫瘍に存在する、

請求項1～5のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項7】

（a）CD40リガンド（CD40L）もしくはCD70；CD40もしくはCD70に結合する抗体分子；OX40に結合する抗体分子；OX40リガンド（OX40L）；Toll様受容体のアゴニスト；41BB；CD2アゴニスト；CD47；またはSTINGアゴニスト、またはそれらの組合せの1以上から選択されるB細胞エンゲージャ、マクロファージ細胞エンゲージャ、および／または樹状細胞エンゲージャ；

（b）CD40L、OX40L、もしくはCD70、またはOX40、CD40、もしくはCD70に結合する抗体分子であるB細胞エンゲージャ；

（c）CD2アゴニスト；CD40L；OX40L；OX40、CD40、またはCD70に結合する抗体分子；Toll様受容体のアゴニスト；CD47；またはSTINGアゴニストであるマクロファージ細胞エンゲージャ；

（d）CD2アゴニスト、OX40抗体、OX40L、41BBアゴニスト、Toll様受容体アゴニスト、CD47アゴニスト、またはSTINGアゴニストである樹状細胞エンゲージャ；

10

20

30

40

50

(e) 環状ジヌクレオチドを含むSTINGアゴニスト；または
(f) CD3、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR ζ 、ICOS、CD28、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、SLAM、CD2またはCD226に結合するT細胞エンゲージャ、をさらに含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項8】

サイトカイン分子が受容体二量体化ドメインをさらに含み、サイトカイン分子および受容体二量体化ドメインは共有結合的に結合しているかまたは共有結合されない、請求項1～7のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項9】

間質調節部分が、ヒアルロニダーゼ、コラゲナーゼ、コンドロイチナーゼ、マトリックスメタロプロテイナーゼから選択される、請求項1～8のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項10】

第1のメンバーが、NKp30に結合する抗体分子またはその抗原結合ドメインに結合し；そして

腫瘍標的化部分が、第1のメンバーに結合し、第2のメンバーが、サイトカイン分子、間質調節部分、またはそれらの組合せにさらに結合するか；または

腫瘍標的化部分が、第2のメンバーに結合し、第1のメンバー、第2のメンバー、またはそれらの組合せが、サイトカイン分子、間質調節部分、またはその組合せにさらに結合する、

請求項1～9のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項11】

第1のメンバーが、NKp46に結合するに結合する抗体分子またはその抗原結合ドメインに結合し；そして

(a) 第1の腫瘍標的化部分が第1のメンバーに結合し、第2の腫瘍標的化部分が第2のメンバーに結合する；もしくは第1の腫瘍標的化部分および第2の腫瘍標的化部分が、第2のメンバーに結合する；または

(b) 腫瘍標的化部分が第1のメンバーに結合し、サイトカイン分子および間質調節部分が第2のメンバーに結合する；腫瘍標的化部分およびサイトカイン分子が第2のメンバーに結合し、間質調節部分が第1のメンバーに結合する；もしくは腫瘍標的化部分および間質調節部分が第2のメンバーに結合し、サイトカイン分子が第1のメンバーに結合する、請求項1～10のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項12】

第1の腫瘍標的化部分が第1のメンバーに結合し、第2の腫瘍標的化部分が第2のメンバーに結合し、第2のメンバーが、サイトカイン分子、間質調節部分、またはそれらの組合せにさらに結合するか；または

第1の腫瘍標的化部分および第2の腫瘍標的化部分が第2のメンバーに結合し、第1のメンバーが、サイトカイン分子、間質調節部分、またはそれらの組合せにさらに結合する、請求項11に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項13】

腫瘍標的化部分、第1の腫瘍標的化部分、第2の腫瘍標的化部分、または第1の腫瘍標的化部分および第2の腫瘍標的化部分に結合するサイトカイン分子をさらに含む、請求項1～12のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項14】

癌抗原、第1の癌抗原、第2の癌抗原、または第1の癌抗原および第2の癌抗原が：

(a) 膵臓癌、乳癌、大腸癌、肺癌、皮膚癌、卵巣癌、または肝臓癌の1以上から選択される固形腫瘍；または

(b) ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨

10

20

30

40

50

髓性白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、および急性リンパ球性白血病から成る群より選択されるいずれか1つであるB細胞またはT細胞悪性腫瘍の1以上から選択される血液癌、

に存在する、請求項1～13のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項15】

非ホジキンリンパ腫が、B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、有毛細胞白血病から成る群より選択される、請求項14に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

10

【請求項16】

癌抗原、第1の癌抗原、第2の癌抗原、または第1の癌抗原および第2の癌抗原が：

(a) PDL1、メソテリン、CD47、ガングリオシド2(GD2)、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、前立腺特異的膜抗原(PMSA)、前立腺特異的抗原(PSA)、癌胎児性抗原(CEA)、Ronキナーゼ、c-Met、未熟ラミニン受容体、TAG-72、BING-4、カルシウム活性化塩素イオンチャネル2、サイクリン-B1、9D7、Ep-CAM、EphA3、Her2/neu、テロメラゼ、SAP-1、サバイビン、NY-ESO-1/LAGE-1、PRAME、SSX-2、メラン-A/MART-1、Gp100/pmel17、チロシナーゼ、MC1R、β-カテニン、BRCA1/2、CDK4、CML66、フィブロネクチン、p53、Ras、TGF-β受容体、AFP、ETA、MAGE、CA-125、BAGE、GAGE、CDC27、αアクチニン-4、TRP1/gp75、TRP2、ガングリオシド、WT1、上皮成長因子受容体(EGFR)、CD20、MART-2、MART-1、MUC1、MUC2、MUM1、MUM2、MUM3、NA88-1、NPM、OA1、OGT、RCC、RU11、RU12、SAGE、TRG、TSTA、葉酸受容体α、L1-CAM、CAIX、EGFRvIII、gpA33、GD3、GM2、VEGFR、インテグリン、炭水化物、IGF1R、TRAILR1、TRAILR2、およびRANKLから選択される腫瘍抗原；

20

(b) 線維芽細胞活性化プロテアーゼ(FAP)、TGF-β、ヒアルロン酸、コラーゲン、テネイシンC、およびテネイシンW選択される間質抗原；または

(c) CD19、CD33、CD47、CD123、CD20、CD99、CD30、B220、CD38、CD22、SLAMF7、およびNY-ESO1から成る群より選択される血液抗原、

30

である、請求項1～15のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項17】

腫瘍標的化部分、第1の腫瘍標的化部分、第2の腫瘍標的化部分、または第1の腫瘍標的化部分および第2の腫瘍標的化部分が、メソテリン、PDL1、HER3、IGF1R、FAP、CD47、およびCD123から成る群より選択されるいずれか1つに結合する抗体分子またはその抗原結合ドメインを含む、請求項1～16のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

40

【請求項18】

第1および第2の腫瘍標的化部分がそれぞれ：

- (a) 抗メソテリン抗体分子および抗PDL1抗体分子；
- (b) 抗PDL1抗体分子および抗メソテリン抗体分子；
- (c) 抗HER3抗体分子および抗IGF1R抗体分子；
- (d) 抗IGF1R抗体分子および抗HER3抗体分子；
- (e) 抗メソテリン抗体分子および抗IGF1R抗体分子；
- (f) 抗IGF1R抗体分子および抗メソテリン抗体分子；
- (g) 抗FAP抗体分子および抗PDL1抗体分子；
- (h) 抗PDL1抗体分子および抗FAP抗体分子；

50

(i) 抗CD123抗体分子および抗CD47抗体分子；または
 (j) 抗CD47抗体分子および抗CD123抗体分子、
 を含む、請求項17に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項19】

NKp30またはNKp46に結合する抗体分子またはその抗原結合ドメイン、抗体分子またはその抗原結合ドメイン、第1の抗体分子またはその抗原結合ドメイン、および／または第2の抗体分子またはその抗原結合ドメインが、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメイン、または単ドメイン抗体を含む、請求項1～18のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項20】

NKp30またはNKp46に結合する抗体分子またはその抗原結合ドメイン、抗体分子またはその抗原結合ドメイン、第1の抗体分子またはその抗原結合ドメイン、および／または第2の抗体分子またはその抗原結合ドメインが、それぞれ、NKp30またはNKp46に結合する抗体分子またはその抗原結合ドメイン、抗体分子またはその抗原結合ドメイン、第1の抗体分子またはその抗原結合ドメイン、および／または第2の抗体分子またはその抗原結合ドメインの第1の部分を含み；そして

多重特異性または多機能性のポリペプチド分子が、NKp30またはNKp46に結合する抗体分子またはその抗原結合ドメイン、抗体分子またはその抗原結合ドメイン、第1の抗体分子またはその抗原結合ドメイン、および／または第2の抗体分子またはその抗原結合ドメインの第2の部分を含み第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを有する非隣接ポリペプチドをさらに含む、

請求項1～19のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項21】

第1のメンバーとNKp30またはNKp46に結合する抗体分子またはその抗原結合ドメインとのあいだのリンカー、

第1のメンバーと腫瘍標的化部分とのあいだのリンカー、

第1のメンバーと第1の腫瘍標的化部分とのあいだのリンカー、

第1のメンバーとサイトカイン分子とのあいだのリンカー、

第1のメンバーと間質調節部分とのあいだのリンカー、

第2のメンバーと腫瘍標的化部分とのあいだのリンカー、

第2のメンバーと第2の腫瘍標的化部分とのあいだのリンカー、

第2のメンバーとサイトカイン分子とのあいだのリンカー、

第2のメンバーと間質調節部分とのあいだのリンカー、

サイトカイン分子と受容体二量体化ドメインとのあいだのリンカー、

サイトカイン分子と腫瘍標的化部分とのあいだのリンカー、

サイトカイン分子と第1の腫瘍標的化部分とのあいだのリンカー、

サイトカイン分子と第2の腫瘍標的化部分とのあいだのリンカー、

NKp30またはNKp46に結合する抗体分子またはその抗原結合ドメイン、抗体分子またはその抗原結合ドメイン、第1の抗体分子またはその抗原結合ドメイン、第2の抗体分子またはその抗原結合ドメイン、またはそれらの組合せの重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとのあいだのリンカー、または

それらの組合せ、

をさらに含む、請求項1～20のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子。

【請求項22】

請求項1～21のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子をコードする、単離核酸分子。

【請求項23】

請求項1～21のいずれか1項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子を含む、医薬。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載の多重特異性または多機能性のポリペプチド分子を含む、それを必要とする対象において癌の治療に使用するための医薬組成物。

【請求項 25】

癌が：

- (a) 固形腫瘍癌または転移性病変；
- (b) 膵臓癌、乳癌、大腸癌、肺癌、皮膚癌、卵巣癌、または肝臓癌の 1 以上；または
- (c) 血液癌、

である、請求項 24 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2016 年 3 月 21 日に出願された米国仮特許出願第 62/310,929 号明細書、および 2016 年 3 月 21 日に出願された米国仮特許出願第 62/310,899 号明細書に対する優先権を主張するものであり、これらのそれぞれの内容は、全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

腫瘍標的化部分と、免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子または間質調節因子 (stromal modifier) の 1 つ、2 つまたは全てとを含む多重特異性分子およびそれを使用する方法が開示される。間質調節部分 (stromal modifying moiety) および腫瘍標的化部分を含む多機能性分子も本明細書に開示され、それを使用する方法が開示される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本開示は、特に (i) 腫瘍標的化部分と；(ii) 免疫細胞エンゲージャ（例えば、NK 細胞エンゲージャ、T 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される）；(iii) サイトカイン分子；および／または (iv) 間質調節部分の 1 つ、2 つまたは全てとを含む新規な多重特異性または多機能性分子に関する。ある実施形態において、多重特異性分子は、(i) 間質調節部分および (ii) 腫瘍抗原または間質抗原に結合する腫瘍標的化部分（例えば、抗体分子、リガンド分子または受容体分子）を含む。「多重特異性」または「多機能性」という用語は、本明細書において同義的に使用される。

【0004】

理論に制約されることを望むものではないが、本明細書に開示される多重特異性または多機能性分子は、癌細胞において、免疫細胞（例えば、NK 細胞、T 細胞、B 細胞、樹枝状細胞またはマクロファージから選択される免疫エフェクター細胞）を標的化（例えば、局在化、架橋および／または活性化）し、および／または腫瘍間質を変化させ、例えば、癌部位の近くの腫瘍微小環境を変化させることが予想される。本明細書に記載される多重特異性分子を用いて免疫細胞の近接および／または活性を増大させることは、癌細胞に対する免疫応答を促進し、それにより、より有効な癌治療を提供することが予想される。理論に制約されるものではないが、癌細胞に対する標的化され、局在化された免疫応答は、本明細書に記載される多重特異性分子の全身毒性の作用を低減するものと考えられる。したがって、特に上記の部分を含む多重特異性分子（例えば、多重特異性または多機能性抗体分子）、それをコードする核酸、上記の分子を生成する方法、および上記の分子を用いて癌を治療する方法が本明細書において提供される。

【課題を解決するための手段】

【0005】

したがって、一態様において、本開示は、

- (i) 癌抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば第 1 の腫瘍標的化部分と；

(i i) NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される免疫細胞エンゲージャ；

(i i i) サイトカイン分子；および

(i v) 間質調節部分

の1つ、2つまたは全てと

を含む多重特異性または多重特異性分子（例えば、ポリペプチドまたはそれをコードする核酸）を特徴とする。

【0006】

上記の分子のある実施形態において、

(i i) および (i i i) が存在しない場合、(i) および (i v) が存在し、

1つの (i) および 1つの (i i) が存在する場合、(i i i) もしくは (i v) または両方が存在し、または

1つの (i) および 1つの (i i i) が存在する場合、(i i) もしくは (i v) または両方が存在する。

【0007】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、(i)、(i i) ならびに (i i i) および (i v) の一方または両方を含む。

【0008】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、(i)、(i i i) ならびに (i i) および (i v) の一方または両方を含む。

【0009】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、(i)、(i i) および (i i i) を含む。他の実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、(i)、(i i) および (i v) を含む。

【0010】

さらに別の実施形態において、多重特異性または多機能性分子ポリペプチドは、(i)、(i i)、(i i i) および (i v) を含む。

【0011】

別の態様において、

(i) 1つまたは複数の癌抗原に結合する少なくとも2つの腫瘍標的化部分、例えば第1および第2の腫瘍標的化部分と；

(i i) NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される免疫細胞エンゲージャ；

(i i i) 間質調節部分；および

(i v) 例えば、少なくとも2つの非隣接ポリペプチドを含むサイトカイン分子（例えば、多連鎖サイトカイン）

の1つ、2つまたは全てと

を含む多重特異性または多機能性分子ポリペプチドが本明細書において提供される。ある実施形態において、サイトカイン分子は、2つの鎖、例えば α および β 鎖（例えば、IL-12）を含む。

【0012】

ある実施形態において、少なくとも2つの腫瘍標的化部分、例えば第1および第2の腫瘍標的化部分は、同じかまたは異なる癌抗原に結合する。

【0013】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、本明細書に記載される1つまたは2つの免疫細胞エンゲージャを含む。一実施形態において、1つまたは2つの免疫細胞エンゲージャは、CTLA4、PD1、PD-L1、PD-L2、TIM3、LAG3、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（

10

20

30

40

50

VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、BTLA、KIR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1またはA2aRの1つまたは2つから選択されるチェックポイント分子に結合し、および／またはそれを阻害する抗体分子を含む。一実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、1つの免疫細胞エンゲージャ、例えばチェックポイントバインダーに対する2つの腫瘍標的化部分を含む。一実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、2つの免疫細胞エンゲージャ、例えば2つのチェックポイントバインダー（例えば、同じかまたは異なるチェックポイントバインダー）に対する2つの腫瘍標的化部分を含む。

【0014】

ある実施形態において、第1の腫瘍標的化部分は、CD123に結合し、第2の腫瘍標的化部分は、CD47に結合し、かつT細胞エンゲージャは、CD3アゴニストであるかまたはそれを含む。

【0015】

さらに別の態様において、多機能性（例えば、二機能性）分子は、間質調節部分と、腫瘍抗原または間質抗原に結合する腫瘍標的化部分（例えば、抗体分子、リガンド分子または受容体分子）とを含む。

【0016】

上記の多重特異性または多機能性分子のいずれかの実施形態において、分子は、第2の腫瘍標的化部分をさらに含み得る。実施形態において、第2の腫瘍標的化部分は、第1の腫瘍標的化部分、例えば(i)の腫瘍標的化部分と同じかまたは異なる癌抗原に結合する。第2の腫瘍標的化部分は、第1の腫瘍標的化部分と同じ癌抗原における異なるエピトープに結合する。他の実施形態において、第2の腫瘍標的化部分および第1の腫瘍標的化部分は、異なる癌抗原に結合する。異なる癌抗原は、同じ細もしくは腫瘍組織に存在し得るか、または異なる細胞もしくは腫瘍組織に存在し得る。

【0017】

理論に制約されることを望むものではないが、本明細書に記載される多重特異性分子などの免疫療法薬の全身毒性は、免疫応答を引き起こす前に免疫療法薬を主に腫瘍および／または間質に指向させることにより、管理、例えば減少され得るものと考えられる。この効果は、1つまたは複数の腫瘍標的化部分の親和性が免疫細胞エンゲージャおよび／またはサイトカインの親和性より高いようにバランスをとることによって達成され得る。ある実施形態において、1つまたは複数の腫瘍標的化部分の親和性、例えば複合親和性は、対応する免疫エフェクター細胞に対する多重特異性分子（例えば、免疫細胞エンゲージャおよび／またはサイトカイン）の親和性、例えば複合親和性と比較して腫瘍および／または間質細胞に対して少なくとも10倍高い。複合親和性は、当該技術分野において公知の技術を用いて測定され得る。例えば、Meschendoerfer, W. et al. (2017) J Pharm Biomed Anal. 5;132:141-147. doi:10.1016/j.jpba.2016.09.028. Epub 2016 Sep 26に記載されるように、単一の設備で二価二重特異性分子の結合活性の評価を可能にする、例えばSPRに基づくアッセイを用いる。

【0018】

したがって、多重特異性または多機能性分子のある実施形態において、第1の腫瘍標的化部分および第2の腫瘍標的化部分の癌抗原に対する親和性、例えば複合親和性は、その対応する結合メンバーに対する(ii)、(iii)または(iv)（単独でまたは多重特異性分子の一部としてのいずれかで）の親和性と等しいかまたはそれを超える。例えば、第1の腫瘍標的化部分および第2の腫瘍標的化部分の癌抗原に対する親和性、例えば複合親和性は、その対応する結合メンバーに対する(ii)、(iii)または(iv)（単独でまたは多重特異性分子の一部としてのいずれかで）の親和性より少なくとも2、5、10、20、30、40、50、75または100倍高い。

【0019】

多重特異性または多機能性分子のさらに他の実施形態において、腫瘍、例えば癌細胞また

10

20

30

40

50

は間質細胞に対する第1の腫瘍標的化部分および第2の腫瘍標的化部分の親和性、例えば複合親和性は、腫瘍標的化部分または第2の腫瘍標的化部分の1つのみを有する同様の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドの親和性と等しいかまたはそれを超える。例えば、腫瘍、例えば癌細胞または間質細胞に対する第1の腫瘍標的化部分および第2の腫瘍標的化部分の親和性、例えば複合親和性は、腫瘍標的化部分または第2の腫瘍標的化部分の1つのみを有する同様の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドの親和性より少なくとも2、5、10、20、30、40、50、75または100倍高い。

【0020】

別の態様において、

A、B - [二量体化モジュール] - C、- D

10

(式中、

(1) 二量体化モジュールは、免疫グロブリン定常ドメイン、例えば重鎖定常ドメイン（例えば、ホモ二量体またはヘテロ二量体重鎖定常領域、例えばFc領域）、または免疫グロブリン可変領域の定常ドメイン（例えば、Fab領域）を含み；および

(2) A、B、CおよびDは、独立して、存在しないか；(i) 腫瘍標的化部分、例えば第1および／もしくは第2の腫瘍標的化部分；(ii) NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャもしくはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される免疫細胞エンゲージャ；(iii) サイトカイン分子または(iv) 間質調節部分である)

を含む多重特異性または多機能性分子ポリペプチドが本明細書において提供される。

20

【0021】

ある実施形態において、前記多重特異性または多機能性分子ポリペプチドは、

(i) 癌抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば第1の腫瘍標的化部分と；

(ii) NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される免疫細胞エンゲージャ；

(iii) サイトカイン分子；および

(iv) 間質調節部分

の1つ、2つまたは全てとを含む。ある実施形態において、

(ii) および(iii)が存在しない場合、(i) および(iv)は、存在し、1つの(i) および1つの(ii)が存在する場合、(iii)もしくは(iv)または両方は、存在し、または1つの(i) および1つの(iii)が存在する場合、(ii)もしくは(iv)または両方は、存在する。

30

【0022】

例示的な多重特異性または多機能性分子は、以下を含む：

(i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、第1の免疫細胞エンゲージャを含み、かつDは、第2の免疫細胞エンゲージャを含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み、かつCおよびDは、同じかまたは異なる免疫細胞エンゲージャを含み）；

40

(ii) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、第1のサイトカイン分子を含み、かつDは、第2のサイトカイン分子を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み、かつCおよびDは、同じかまたは異なるサイトカイン分子を含み）；

(iii) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、第1の間質調節部分を含み、かつDは、第2の間質調節部分を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み、かつCおよびDは、同じかまたは異なる間質調節部分を含み）；

(iv) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、免疫細胞エンゲージャを含み、かつDは、サイトカイン分子を含み（例えば、Aおよび

50

Bは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(v) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、サイトカイン分子を含み、かつDは、免疫細胞エンゲージャを含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(v i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、免疫細胞エンゲージャを含み、かつDは、間質調節部分を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(v i i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、間質調節部分を含み、かつDは、免疫細胞エンゲージャを含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(v i i i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、サイトカイン分子を含み、かつDは、間質調節部分を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(i x) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、間質調節部分を含み、かつDは、サイトカイン分子を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(x) Aは、腫瘍標的化部分を含み、かつB、CおよびDの少なくとも1つ、2つまたは3つは、第2の腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子、間質調節部分を含むかまたは存在せず、ただし、(i i) および (i i i) が存在しない場合、(i) および (i v) は、存在し；

(x i) Bは、腫瘍標的化部分を含み、かつA、CおよびDの少なくとも1つ、2つまたは3つは、第2の腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子、間質調節部分を含むかまたは存在せず、ただし、(i i) および (i i i) が存在しない場合、(i) および (i v) は、存在し；

(x i i) Cは、腫瘍標的化部分を含み、かつA、BおよびDの少なくとも1つ、2つまたは3つは、第2の腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子、間質調節部分を含むかまたは存在せず、ただし、(i i) および (i i i) が存在しない場合、(i) および (i v) は、存在し；

(x i i i) Dは、腫瘍標的化部分を含み、かつA、BおよびCの少なくとも1つ、2つまたは3つは、第2の腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子、間質調節部分を含むかまたは存在せず、ただし、(i i) および (i i i) が存在しない場合、(i) および (i v) は、存在し；

(x i v) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ免疫細胞エンゲージャおよび非存在であり；

(x v) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ非存在および免疫細胞エンゲージャであり；

(x v i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれサイトカイン分子および非存在であり；

(x v i i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ非存在およびサイトカイン分子であり；

(x v i i i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ間質調節部分および非存在であり；

(x i x) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ非存在および間質調節部分であり；

(x x) Aは、腫瘍標的化部分を含み、かつB、CまたはDの1つは、間質調節部分を含み；

(x x i) Bは、腫瘍標的化部分を含み、かつA、CまたはDの1つは、間質調節部分を含み；

(x x i i) Cは、腫瘍標的化部分を含み、かつA、BまたはDの1つは、間質調節部分を含み；

10

20

30

40

50

(x x i i i) Dは、腫瘍標的化部分を含み、かつA、BまたはCの1つは、間質調節部分を含み；

(x i v) AまたはBは、腫瘍標的化部分を含み、かつCは、免疫細胞エンゲージヤを含み、かつDは、サイトカイン分子を含み；

(x v) AまたはBは、腫瘍標的化部分を含み、かつDは、免疫細胞エンゲージヤを含み、かつCは、サイトカイン分子を含み；

(x v i) Aおよび／またはBは、1つまたは2つの免疫細胞エンゲージヤを含み、かつDは、腫瘍標的化部分を含み、かつCは、サイトカイン分子を含み；

(x v i i) Aおよび／またはBは、1つまたは2つの免疫細胞エンゲージヤを含み、かつCは、腫瘍標的化部分を含み、かつBは、サイトカイン分子を含み；

(x v i i i) Aおよび／またはBは、1つまたは2つのサイトカインを含み、かつDは、腫瘍標的化部分を含み、かつCは、免疫細胞エンゲージヤを含み；または

(x i x) Aおよび／またはBは、1つまたは2つのサイトカインを含み、かつCは、腫瘍標的化部分を含み、かつDは、免疫細胞エンゲージヤを含む。

【0023】

例示的な分子の選択は、以下を含む：

(i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、免疫細胞エンゲージヤ（例えば、樹枝状細胞エンゲージヤ）を含み、かつDは、サイトカイン分子を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(i i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、サイトカイン分子を含み、かつDは、免疫細胞エンゲージヤを含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(i i i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ免疫細胞エンゲージヤおよび非存在であり；

(i v) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ非存在および免疫細胞エンゲージヤ、例えばT細胞エンゲージヤであり；

(v) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれサイトカイン分子および非存在であり；

(v i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ非存在およびサイトカイン分子であり；

(v i i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ間質調節部分および非存在であり；

(v i i i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ非存在および間質調節部分であり；または

(i x) Aは、腫瘍標的化部分を含み、かつB、CまたはDの1つは、間質調節部分を含む。

【0024】

上記の分子のいずれかのある実施形態において、第1および第2の腫瘍標的化部分は、同じ癌抗原における異なるエピトープまたは異なる癌抗原に結合する。

【0025】

他の実施形態において、異なる癌抗原は、同じ細胞または腫瘍組織または異なる細胞または腫瘍組織に存在する。

【0026】

上記の分子のいずれかの他の実施形態において、第1および第2の腫瘍標的化部分の癌抗原に対する親和性、例えば複合親和性は、その対応する結合メンバーに対する(i i)、

(i i i)または(i v)（単独でまたは多重特異性分子の一部としてのいずれかで）の親和性と等しいかまたはそれを超える。例えば、第1および第2の腫瘍標的化部分の癌抗原に対する親和性、例えば複合親和性は、その対応する結合メンバーに対する(i i)、

(i i i)または(i v)（単独でまたは多重特異性分子の一部としてのいずれかで）の

10

20

30

40

50

親和性より少なくとも2、5、10、20、30、40、50、75または100倍高い。

【0027】

上記の分子のいずれかのさらに他の実施形態において、腫瘍、例えば癌細胞または間質細胞に対する第1および第2の腫瘍標的化部分の親和性、例えば複合親和性は、腫瘍標的化部分または第2の腫瘍標的化部分の1つのみを有する同様の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドの親和性と等しいかまたはそれを超える。例えば、腫瘍、例えば癌細胞または間質細胞に対する第1および第2の腫瘍標的化部分の親和性、例えば複合親和性は、腫瘍標的化部分または第2の腫瘍標的化部分の1つのみを有する同様の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドの親和性より少なくとも2、5、10、20、30、40、50、75または100倍高い。

10

【0028】

ある実施形態において、腫瘍標的化部分は、癌抗原に結合するが、それを活性化または調節しない。他の実施形態において、腫瘍標的化部分は、癌抗原に結合し、かつそれを活性化または調節する。

【0029】

他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、免疫細胞、例えばエフェクター細胞に結合するが、それを活性化しない。他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、免疫細胞、例えばエフェクター細胞に結合し、かつそれを活性化する。

【0030】

他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、免疫細胞、例えばエフェクター細胞に結合するが、それを活性化しない。他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、免疫細胞、例えばエフェクター細胞に結合し、かつそれを活性化する。

20

【0031】

ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、T細胞に結合し、かつそれを活性化するT細胞エンゲージャを含む。他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、T細胞に結合し、かつそれを活性化しないT細胞エンゲージャを含む。

【0032】

ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、樹枝状細胞に結合し、かつそれを活性化する樹枝状細胞エンゲージャを含む。他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、樹枝状細胞に結合し、かつそれを活性化しない樹枝状細胞エンゲージャを含む。

30

【0033】

ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、マクロファージ細胞に結合し、かつそれを活性化するマクロファージ細胞エンゲージャを含む。他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、マクロファージ細胞に結合し、かつそれを活性化しないマクロファージ細胞エンゲージャを含む。

【0034】

さらに他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャおよび／または腫瘍標的化部分は、チェックポイント阻害剤（例えば、チェックポイント阻害剤を発現する細胞、例えば免疫細胞）に結合するが、それを阻害しない。他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャおよび／または腫瘍標的化部分は、チェックポイント阻害剤（例えば、チェックポイント阻害剤を発現する細胞、例えば免疫細胞）に結合し、かつそれを阻害する。例示的なチェックポイント分子としては、限定はされないが、CTLA4、PD1、PD-L1、PD-L2、TIM3、LAG3、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、HVEM（TNFRSF14またはCD270）、BTLA、KIR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1およびA2aRが挙げられる。一実施形態において、免疫細胞エンゲージャおよび／または腫瘍標的化部分は、PD1-PDL1相互作用に結合するが、それを阻害しない。別の実施形態において、免疫細胞エンゲージャおよび／または腫瘍標的化部分は、PD1-PDL1相互作用に結合し、かつそれを阻害する。

40

【0035】

50

本明細書に開示される実施形態のいずれかにおいて、例えば、多重特異性分子との関連外で（または個々の成分、例えば個々の免疫細胞エンゲージャを有する多重特異性分子に関連して）成分が個別に示されるとき、開示される多重特異性分子は、免疫細胞を活性化しないが、2つ以上の成分、例えば2つ以上の免疫細胞エンゲージャを含む多重特異性分子に関連して示されるとき、多重特異性分子は、免疫細胞を活性化する。2つの異なる受容体が多重特異性分子の異なる部分によって結合されるとき、またはエフェクター細胞の同じ受容体における2つの異なるエピトープが多重特異性分子によって結合されるとき（例えば、免疫細胞における対応する受容体の活性化または阻害）、例えば、多重特異性分子は、免疫細胞に結合するときに活性化され得る。活性レベルは、例えば、多重特異性分子中の個別に示される成分を、多重特異性分子中で組み合わせて示される2つ以上の成分と例えば比較することにより、本明細書に記載されるアッセイのいずれかによって評価され得る。理論に制約されることを望むものではないが、多重特異性分子の2つ以上の異なる部分の結合は、物理的状態、例えば、立体構造、凝集の変化を引き起こすものと考えられ、これは、癌細胞に対する免疫応答の、調節され、標的化された活性化をもたらし、このような調節された活性化は、本明細書に記載される多重特異性分子の全身毒性の作用を低減するものと考えられる。

【0036】

他の実施形態において、腫瘍標的化部分は、癌抗原に結合する抗体分子、受容体分子（例えば、受容体、受容体断片もしくはその機能的変異体）またはリガンド分子（例えば、リガンド、リガンド断片もしくはその機能的変異体）、あるいはその組合せを含む。例えば、腫瘍標的化部分は、血液癌、固形腫瘍、転移性癌、軟部組織腫瘍、転移性病変またはその組合せに存在する癌抗原に結合し得る。他の実施形態において、癌抗原は、腫瘍抗原もしくは間質抗原または血液抗原である。腫瘍抗原または間質抗原は、線維性または線維形成性固形腫瘍に存在し得る。例えば、腫瘍抗原または間質抗原は、腫瘍、例えば限定された腫瘍灌流、圧縮された血管または線維性腫瘍間質の1つまたは複数を有することを特徴とする種類の腫瘍に存在する。

【0037】

標的化され得る例示的な癌としては、限定はされないが、腫瘍、例えば固形腫瘍、膵臓癌（例えば、膵臓腺癌）、乳癌、大腸癌、肺癌（例えば、小細胞または非小細胞肺癌）、皮膚癌、卵巣癌または肝臓癌が挙げられる。癌はまた、限定はされないが、B細胞またはT細胞悪性腫瘍、例えばホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（例えば、B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、有毛細胞白血病）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫および急性リンパ球性白血病を含む血液癌であり得る。

【0038】

ある実施形態において、癌抗原、例えば固形腫瘍抗原は、PD L 1、CD 4 7、メソテリン、ガングリオシド2（GD 2）、前立腺幹細胞抗原（PSCA）、前立腺特異的膜抗原（PMSA）、前立腺特異的抗原（PSA）、癌胎児性抗原（CEA）、Ronキナーゼ、c-Met、未熟ラミニン受容体、TAG-72、BING-4、カルシウム活性化塩素イオンチャネル2、サイクリン-B1、9D7、EphA3、Her2/neu、テロメラゼ、SAP-1、サバイビン、NY-ESO-1/LAGE-1、PRAME、SSX-2、メラニン-A/MART-1、Gp100/pmel17、チロシナーゼ、TRP-1/-2、MC1R、β-カテニン、BRCA1/2、CDK4、CML66、フィブロネクチン、p53、Ras、TGF-β受容体、AFP、ETA、MAGE、MUC-1、CA-125、BAGE、GAGE、NY-ESO-1、β-カテニン、CDK4、CDC27、CD47、αアクチニン-4、TRP1/gp75、TRP2、gp100、メラニン-A/MART1、ガングリオシド、WT1、EphA3、上皮成長因子受容体（EGFR）、CD20、MART-2、MART-1、MUC1、MUC2、MUM1、MUM2、MUM3、NA88-1、NPM、OA1、OGT、RC

C、RUI1、RUI2、SAGE、TRG、TRP1、TSTA、葉酸受容体 α 、L1-CAM、CAIX、EGFRvIII、gpA33、GD3、GM2、VEGFR、インテグリン（インテグリン α V β 3、インテグリン α 5 β 1）、炭水化物（Le）、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2またはRANKLから選択される。他の実施形態において、癌抗原は、線維芽細胞活性化プロテアーゼ（FAP）、TGF- β 、ヒアルロン酸、コラーゲン、例えばコラーゲンIV、テネイシンCまたはテネイシンWから選択され得る間質抗原である。癌抗原が血液抗原である実施形態において、癌抗原は、CD19、CD33、CD47、CD123、CD20、CD99、CD30、B2MA、CD38、CD22、SLAMF7またはNY-ESO1から選択され得る。

【0039】

本明細書に開示される多重特異性または多機能性分子のいずれかのある実施形態において、腫瘍標的化部分は、メソテリン、PDL1、HER3、IGF1R、FAP、CD47またはCD123から選択される癌抗原に対する抗体分子から選択される。例えば、腫瘍標的化部分は、メソテリンまたはPDL1に結合する抗体分子（例えば、FabまたはscFv）を含み得る。ある実施形態において、腫瘍標的化部分は、PDL1に結合し、かつPD1とのPDL1の相互作用を阻害する。他の実施形態において、腫瘍標的化部分は、PDL1に結合し、かつPD1とのPD L1の相互作用を阻害しない。

【0040】

実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、メソテリン、PDL1、HER3、IGF1R、FAP、CD123またはCD47から選択される2つまたは3つの癌抗原に対する2つまたは3つの抗体分子を含み得る。例えば、第1および第2の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗メソテリン抗体分子および抗PDL1抗体分子であり；または第2および第1の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗メソテリン抗体分子および抗PDL1抗体分子である。他の組合せとしては、限定はされないが、第1および第2の腫瘍標的化部分が、それぞれ抗FAP抗体分子および抗PDL1抗体分子であり；または第2および第1の腫瘍標的化部分が、それぞれ抗FAP抗体分子および抗PDL1抗体分子であることが挙げられる。他の実施形態において、第1および第2の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗HER3抗体分子および抗IGF1R抗体分子であり；または第2および第1の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗HER3抗体分子および抗IGF1R抗体分子である。他の実施形態において、第1および第2の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗CD123抗体分子および抗CD47抗体分子であり；または第2および第1の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗CD123抗体分子および抗CD47抗体分子である。

【0041】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャもしくはマクロファージ細胞エンゲージャまたはその組合せから選択される免疫細胞エンゲージャを含み得る。ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、NK細胞への結合およびNK細胞の活性化を媒介するNK細胞エンゲージャを含む。他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、NK細胞への結合を媒介するが、NK細胞の活性化を媒介しないNK細胞エンゲージャを含む。例示的なNK細胞エンゲージャは、NKp30、NKp40、NKp44、NKp46、NKG2D、DNAM1、DAP10、CD16（例えば、CD16a、CD16bまたは両方）、CRTAM、CD27、PSGL1、CD96、CD100（SEMA4D）、NKp80、CD244（SLAMF4または2B4としても知られている）、SLAMF6、SLAMF7、KIR2DS2、KIR2DS4、KIR3DS1、KIR2DS3、KIR2DS5、KIR2DS1、CD94、NKG2C、NKG2EまたはCD160に結合する（例えば、それを活性化する、抗体分子、例えば抗原結合ドメインまたはリガンドから選択され得る。ある実施形態において、NK細胞エンゲージャは、NKp30またはNKp46に結合する抗体分子、例えば抗原結合ドメインである。

【0042】

ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、T細胞への結合およびT細胞の活性化

10

20

30

40

50

を媒介するT細胞エンゲージャを含む。ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、T細胞への結合を媒介するが、T細胞の活性化を媒介しないT細胞エンゲージャを含む。

【0043】

多重特異性または多機能性分子の他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、リガンドであり、任意選択的に、リガンドは、免疫グロブリン定常領域、例えばFc領域をさらに含む。例えば、NKp44またはNKp46のリガンドは、ウイルスHAであり；DAP10のリガンドは、NKG2Dの補助受容体（coreceptor）であり；CD16のリガンドは、CD16a/bリガンド、例えば抗体Fc領域をさらに含むCD16a/bリガンドである。

【0044】

他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、B細胞、T細胞、マクロファージおよび／もしくは樹枝状細胞またはそれらの両方、それらの1つもしくは複数への結合またはそれらの活性化を媒介する。

【0045】

多重特異性または多機能性分子の他の実施形態において、T細胞エンゲージャは、CD3、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR ζ 、ICOS、CD28、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、SLAM、CD2またはCD226のアゴニストである。他の実施形態において、T細胞エンゲージャは、CD3、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR ζ 、ICOS、CD28、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、SLAM、CD2またはCD226に結合するが、それを活性化しない。

【0046】

ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、CD40リガンド（CD40L）もしくはCD70リガンド；CD40もしくはCD70に結合する抗体分子；OX40に対する抗体分子；OX40リガンド（OX40L）；Toll様受容体のアゴニスト（例えば、TLR4、例えば構成的活性型TLR4（caTLR4）もしくはTLR9アゴニスト）；41BB；CD2アゴニスト；CD47またはSTINGアゴニストあるいはその組合せの1つまたは複数から選択されるB細胞、マクロファージおよび／または樹枝状細胞エンゲージャを含む。

【0047】

ある実施形態において、B細胞エンゲージャは、CD40L、OX40LもしくはCD70リガンドまたはOX40、CD40もしくはCD70に結合する抗体分子である。

【0048】

他の実施形態において、マクロファージ細胞エンゲージャは、CD2アゴニスト；CD40L；OX40L；OX40、CD40もしくはCD70に結合する抗体分子；Toll様受容体（TLR）のアゴニスト（例えば、TLR4、例えば構成的活性型TLR4（caTLR4）もしくはTLR9アゴニスト）；CD47またはSTINGアゴニストである。

【0049】

さらに他の実施形態において、樹枝状細胞エンゲージャは、CD2アゴニスト、OX40抗体、OX40L、41BBアゴニスト、Toll様受容体アゴニストもしくはその断片（例えば、TLR4、例えば構成的活性型TLR4（caTLR4））、CD47アゴニストまたはSTINGアゴニストである。例えば、STINGアゴニストは、任意選択的に、2'，5'または3'，5'リン酸塩結合とともに環状ジヌクレオチド、例えば環状ジGMP（cdGMP）、環状ジAMP（cdAMP）またはその組合せを含み得る。STINGアゴニストは、例えば、当該技術分野において公知の技術により、多重特異性または多機能性分子に共有結合され得る。

【0050】

他の実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、インターロイキン-2（IL

10

20

30

40

50

ー２）、インターロイキンー７（ＩＬー７）、インターロイキンー１２（ＩＬー１２）、インターロイキンー１５（ＩＬー１５）、インターロイキンー１８（ＩＬー１８）、インターロイキンー２１（ＩＬー２１）、またはインターフェロンγ、またはその断片もしくは変異体、あるいは上記のサイトカインのいずれかの組合せから選択される。サイトカインは、モノマーまたは二量体であり得る。例えば、サイトカイン分子は、受容体二量体化ドメイン、例えばＩＬ１５Ｒα二量体化ドメインをさらに含み得る。他の実施形態において、サイトカイン分子（例えば、ＩＬー１５）および受容体二量体化ドメイン（例えば、ＩＬ１５Ｒα二量体化ドメイン）は、共有結合されず、例えば非共有結合的に結合される。

【００５１】

他の実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、間質または細胞外基質（ＥＣＭ）成分のレベルもしくは生産の減少；腫瘍線維化の減少；間質腫瘍輸送の増加；腫瘍灌流の改善；腫瘍微小血管系の拡張；腫瘍における間質液圧（ＩＦＰ）の低下または腫瘍もしくは腫瘍血管系への薬剤、例えば癌治療薬もしくは細胞療法薬の浸透もしくは拡散の減少もしくは促進の１つまたは複数を引き起こす間質調節部分を含み得る。例えば、減少される間質またはＥＣＭ成分は、グリコサミノグリカンもしくは細胞外タンパク質またはその組合せから選択される。グリコサミノグリカンは、ヒアルロナン（ヒアルロン酸またはＨＡとしても知られている）、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、エンタクチン、テネイシン、アグリカンまたはケラチン硫酸から選択され得る。例示的な細胞外タンパク質としては、限定はされないが、コラーゲン、ラミニン、エラスチン、フィブリノゲン、フィブロネクチンまたはビトロネクチンが挙げられる。

【００５２】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、腫瘍間質または細胞外基質（ＥＣＭ）を分解する酵素分子を含む間質調節部分を含む。酵素分子は、ヒアルロニダーゼ分子、コラゲナーゼ分子、コンドロイチナーゼ分子、マトリックスメタロプロテイナーゼ分子（例えば、マクロファージメタロエラスターゼ）または上記のいずれかの変異体（例えば、断片）から選択され得る。

【００５３】

ある実施形態において、間質調節部分は、ヒアルロン酸のレベルまたは生産を減少させる。例えば、間質調節部分は、ヒアルロナン分解酵素、ヒアルロナン合成を阻害する薬剤またはヒアルロン酸に対する抗体分子を含む。

【００５４】

さらに他の実施形態において、ヒアルロナン分解酵素は、ヒアルロニダーゼ分子またはその変異体（例えば、その断片）である。ヒアルロナン分解酵素は、中性または酸性ｐＨ、例えば約４～５のｐＨで活性であり得る。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、哺乳動物ヒアルロニダーゼ分子、例えば組み換えヒトヒアルロニダーゼ分子またはその変異体（例えば、その切断型）である。例えば、ヒアルロニダーゼ分子は、ＨＹＡＬ１、ＨＹＡＬ２もしくはＰＨ－２０／ＳＰＡＭ１またはその変異体（例えば、その切断型）から選択され得る。さらに他の実施形態において、切断型は、Ｃ末端グリコシルホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）付着部位またはＧＰＩ付着部位の一部を欠いている。

【００５５】

さらに他の実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、グリコシル化され、例えば少なくとも１つのＮ－結合グリカンを含む。

【００５６】

一実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、配列番号６１のアミノ酸配列またはその断片、あるいはそれと実質的に同一である（例えば、それと９５％～９９．９％同一であるか、または配列番号６１のアミノ酸配列に対する少なくとも１つのアミノ酸改変であるが、５、１０もしくは１５個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【００５７】

10

20

30

40

50

ある実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、

(i) 配列番号 61 の 36-464 のアミノ酸配列；

(ii) 配列番号 61 に記載されるアミノ酸の配列を有する PH20 の 36-481、36-482 または 36-483 のアミノ酸配列；または

(iii) 配列番号 61 に記載されるアミノ酸の配列のポリペプチドまたは切断型に対する少なくとも 95%~100% の配列同一性を有するアミノ酸配列；または

(iv) 配列番号 61 に記載されるアミノ酸配列に対する 30、20、10、5 個またはそれよりも少ないアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む。

【0058】

ある実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、配列番号 61 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95%（例えば、少なくとも 95%、96%、97%、98%、99%、100%）同一のアミノ酸配列を含み；または配列番号 61 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 95%（例えば、少なくとも 96%、97%、98%、99%、100%）同一のヌクレオチド配列によってコードされる。

【0059】

他の実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、PH20、例えば rHuPH20 である。

【0060】

一実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、HYAL1 であり、かつアミノ酸配列：配列番号 62 またはその断片、あるいはそれと実質的に同一である（例えば、それと 95%~99.9% 同一であるか、または配列番号 62 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 もしくは 15 個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0061】

ある実施形態において、ヒアルロナン分解酵素、例えばヒアルロニダーゼ分子は、ポリマーをさらに含み、例えば、ポリマー、例えば PEG にコンジュゲートされる。例えば、ヒアルロナン分解酵素は、PEG 化 PH20 酵素（PEGPH20）であり得る。

【0062】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子ポリペプチド、ヒアルロナン分解酵素、例えばヒアルロニダーゼ分子は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3 および IgG4 の重鎖定常領域、より特定のヒト IgG1、IgG2、IgG3 または IgG4 の重鎖定常領域から選択される免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc 領域）をさらに含む。

【0063】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域（例えば、Fc 領域）は、ヒアルロナン分解酵素、例えばヒアルロニダーゼ分子に結合され、例えば共有結合される。ある実施形態において、免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc 領域）は、Fc 受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基の数、エフェクター細胞機能または補体機能の 1 つまたは複数を増加または減少させるように改変され、例えば変異される。ある実施形態において、ヒアルロナン分解酵素、例えばヒアルロニダーゼ分子は、二量体を形成する。

【0064】

ある実施形態において、間質調節部分は、ヒアルロナン、例えば HA シンターゼの合成の阻害剤を含む。ある実施形態において、阻害剤は、HA シンターゼに対するセンスもしくはアンチセンス核酸分子を含むか、または小分子薬剤である。ある実施形態において、阻害剤は、4-メチルウンベリフェロン（MU）もしくはその誘導体（例えば、6,7-ジヒドロキシ-4-メチルクマリニンもしくは 5,7-ジヒドロキシ-4-メチルクマリニン）またはレフルノミドもしくはその誘導体である。ある実施形態において、間質調節部分は、コラゲナーゼ分子、例えば哺乳動物コラゲナーゼ分子またはその変異体（例えば、断片）を含む。ある実施形態において、コラゲナーゼ分子は、例えば、配列番号 63 のアミノ

10

20

30

40

50

酸配列またはその断片、あるいはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号63のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含むコラゲナーゼ分子IVである。

【0065】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子ポリペプチドは、2つの結合特異性または機能を含み、例えば、例として、i) 腫瘍標的化部分および免疫細胞エンゲージャであって、ただし、多重特異性分子が腫瘍標的化部分および免疫細胞エンゲージャのみを含む場合、免疫細胞エンゲージャは、NK細胞抗原に対する抗体分子でない、腫瘍標的化部分および免疫細胞エンゲージャ；またはii) 腫瘍標的化部分および間質調節部分を含む二重特異性または二機能性分子である。

10

【0066】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子ポリペプチドは、3つまたは4つの結合特異性または機能を含み、例えば、三重特異性または四重特異性分子である。ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子ポリペプチドは、(i) 少なくとも2つの腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子；(ii) 腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャおよび間質調節部分；または(iii) メソテリン、PD L 1、HER 3、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)もしくはインスリン成長因子1R(IGF1R)、CD 47またはCD 123から選択される2つの癌抗原であって、ただし、FAPおよびIGF1Rでない2つの癌抗原に結合する少なくとも2つの腫瘍標的化部分およびサイトカイン分子を含む。

20

【0067】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子ポリペプチドは、(i) 1つの腫瘍標的化部分と；(ii) 2つの免疫細胞エンゲージャ（例えば、同じかまたは異なる免疫細胞エンゲージャ）と；(iii) 1つのサイトカイン分子、または(iv) 1つの間質調節部分の一方または両方とを含む。ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子ポリペプチドは、(i) 2つの腫瘍標的化部分（例えば、同じかまたは異なる標的化部分）と；(ii) 1つの免疫細胞エンゲージャと；(iii) 1つのサイトカイン分子、または(iv) 1つの間質調節部分の一方または両方とを含む。ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子ポリペプチドは、(i) 1つの腫瘍標的化部分と；(ii) 1つの免疫細胞エンゲージャと；(iii) 2つのサイトカイン分子（例えば、同じかまたは異なるサイトカイン分子）の一方または両方とを含む。

30

【0068】

ある実施形態において、2つの腫瘍標的化部分の1つが、PD L 1に結合し；2つの腫瘍標的化部分の1つは、メソテリンに結合し；免疫細胞エンゲージャは、NK p 46またはNK p 30に結合し；かつサイトカイン分子は、IL 2である。

【0069】

ある実施形態において、腫瘍標的化部分もしくは免疫細胞エンゲージャまたは両方は、(i) 抗体分子、例えば少なくとも1つの免疫グロブリンドメインおよび／あるいは(ii) 受容体もしくはリガンドまたはその断片を含む。

40

【0070】

ある実施形態において、腫瘍標的化抗体分子は、約10 nM未満、より典型的には10～100 pMの解離定数で固形腫瘍抗原および／または間質抗原に結合する。

【0071】

ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、約10 nM未満、より典型的には10～100 pMの解離定数でNK細胞抗原、B細胞抗原、樹枝状細胞抗原および／またはマクロファージ細胞抗原に結合する。

【0072】

ある実施形態において、腫瘍標的化抗体分子は、腫瘍抗原または間質抗原上の立体構造または線形エピトープに結合する。

50

【0073】

ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、NK細胞抗原、B細胞抗原、樹枝状細胞抗原および／またはマクロファージ細胞抗原上の立体構造または線形エピトープに結合する。

【0074】

ある実施形態において、腫瘍標的化抗体分子は、単一特異性抗体分子、二重特異性抗体分子または三重特異性抗体分子である。

【0075】

ある実施形態において、腫瘍標的化抗体分子は、一価抗体分子、二価抗体分子または三価抗体分子である。

【0076】

ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、単一特異性、二重特異性抗体分子または三重特異性抗体である。

【0077】

ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、一価、二価または三価抗体である。

【0078】

ある実施形態において、腫瘍標的化抗体分子および／または免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、完全抗体（例えば、少なくとも1つ、好ましくは2つの完全な重鎖および少なくとも1つ、好ましくは2つの完全な軽鎖を含む抗体）または抗原結合断片（例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、一本鎖Fv、単ドメイン抗体、ダイアボディ（dAb）、二価抗体もしくは二重特異性抗体またはその断片、その単ドメイン変異体、あるいはラクダ科抗体）である。

【0079】

ある実施形態において、腫瘍標的化抗体分子および免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、独立して、完全抗体（例えば、少なくとも1つ、好ましくは2つの完全な重鎖および少なくとも1つ、好ましくは2つの完全な軽鎖を含む抗体）または抗原結合断片（例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、一本鎖Fv断片、単ドメイン抗体、ダイアボディ（dAb）、二価抗体もしくは二重特異性抗体またはその断片、その単ドメイン変異体、あるいはラクダ科抗体）である。

【0080】

ある実施形態において、腫瘍標的化抗体分子および／または免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、IgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4から選択される重鎖定常領域またはその断片を含む。

【0081】

ある実施形態において、腫瘍標的化抗体分子および／または免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、κもしくはλの軽鎖定常領域から選択される軽鎖定常領域またはその断片を含む。

【0082】

ある実施形態において、腫瘍標的化部分もしくは免疫細胞エンゲージャまたは両方は、腫瘍抗原および／もしくは間質抗原、またはNK細胞抗原、B細胞抗原、樹枝状細胞抗原および／もしくはマクロファージ細胞抗原に結合する受容体もしくは受容体断片またはリガンドもしくはリガンド断片を含む。

【0083】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子ポリペプチドは、IgG1、IgG2およびIgG4の重鎖定常領域、より特定のヒトIgG1、IgG2またはIgG4の重鎖定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域（例えば、Fc領域）をさらに含む。ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域（例えば、Fc領域）は、腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャまたはサイトカイン分子の1つまたは複数に結合され、例えば共有結合される。ある実施形態において、免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）は、Fc受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基の数、エフェクター細

10

20

30

40

50

胞機能または補体機能の1つまたは複数を増加または減少させるように改変され、例えば変異される。

【0084】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、少なくとも2つの非隣接ポリペプチド鎖を含む。

【0085】

ある実施形態において、腫瘍標的化部分または免疫細胞エンゲージャは、 κ もしくは λ の軽鎖定常領域から選択される軽鎖定常領域またはその断片を含む。

【0086】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、第1の腫瘍標的化部分および第2の腫瘍標的化部分を含み、第1の腫瘍標的化部分は、 κ 軽鎖定常領域またはその断片を含み、かつ第2の腫瘍標的化部分は、 λ 軽鎖定常領域またはその断片を含む。

10

【0087】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、第1の腫瘍部分および第2の腫瘍標的化部分を含み、第1の腫瘍標的化部分および第2の腫瘍標的化部分は、共通の軽鎖可変領域を含む。

【0088】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域（例えば、Fc領域）は、腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子または間質調節部分の1つまたは複수에結合され、例えば共有結合される。

20

【0089】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、例えば、非改変インターフェースと比べて二量体化を増加または減少させるように改変され、例えば変異される第1および第2の免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）のインターフェースを含む。

【0090】

ある実施形態において、免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）の二量体化は、例えば、非改変インターフェースと比べてヘテロ多量体：ホモ多量体のより高い比率が生じるように、第1および第2のFc領域のFcインターフェースに、対になった空洞－突起（「ノブ・イン・ホール（knob-in-hole）」）、静電相互作用または鎖交換の1つまたは複数を提供することによって促進される。

30

【0091】

ある実施形態において、免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）は、例えば、ヒトIgG1のFc領域の347、349、350、351、366、368、370、392、394、395、397、398、399、405、407または409の1つまたは複数から選択される位置にアミノ酸置換を含む。

【0092】

ある実施形態において、免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）は、T366S、L368AもしくはY407V（例えば、空洞もしくはホールに対応する）またはT366W（例えば、突起もしくはノブに対応する）あるいはその組合せから選択されるアミノ酸置換を含む。

40

【0093】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、リンカー、例えば標的化部分およびサイトカイン分子もしくは間質調節部分、標的化部分および免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子もしくは間質調節部分および免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子もしくは間質調節部分および免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）、標的化部分および免疫グロブリン鎖定常領域、または免疫細胞エンゲージャおよび免疫グロブリン鎖定常領域の1つまたは複数間のリンカーをさらに含む。

【0094】

ある実施形態において、リンカーは、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、ペプ

50

チドリンカー、フレキシブルリンカー、剛性リンカー、らせん状リンカーまたは非らせん状リンカーから選択される。ある実施形態において、リンカーは、ペプチドリンカーである。ある実施形態において、ペプチドリンカーは、G l yおよびS e rを含む。

【0095】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、第1および第2の非隣接ポリペプチドを含む二重特異性分子であり、

(i) 第1のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、サイトカイン分子、間質調節部分または免疫細胞エンゲージャに連結される、例えば癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば抗体分子（例えば、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えばF a b分子の第1のV H - C H 1）、例えば抗体分子、例えば免疫細胞抗原に結合するs c F vを含み；および

(i i) 第2のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、例えば癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原（例えば、第1のV H - C H 1によって結合される同じ腫瘍または間質抗原）に結合する第1の抗原ドメインの第2の部分、例えばF a bの第1のV L - C Lを含む。

【0096】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、第1および第2の非隣接ポリペプチドを含む二重特異性分子であり、

(i) 第1のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1および第2のポリペプチド間の結合を促進する第1のドメイン（例えば、第1の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第1のF c分子）に連結される、例えば癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば抗体分子（例えば、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えばF a b分子の第1のV H - C H 1）を含み；

(i i) 第2のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1および第2のポリペプチド間の結合を促進する第2のドメイン（例えば、第2の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第2のF c分子）に連結されるサイトカイン分子、間質調節部分または免疫細胞エンゲージャ（例えば、抗体分子、例えば免疫細胞抗原に結合するs c F v）を含み；および

(i i i) 第3のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、癌抗原に結合する第1の抗原ドメインの第2の部分、例えばF a bの第1のV L - C Lを含む。

【0097】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、第1、第2および第3の非隣接ポリペプチドを含む三重特異性分子であり、

(i) 第1のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1および第2のポリペプチド間の結合を促進する第1のドメイン（例えば、第1の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第1のF c分子）に連結される、例えば癌抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば抗体分子（例えば、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えばF a b分子の第1のV H - C H 1）を含み；

(i i) 第2のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1および第2のポリペプチド間の結合を促進する第2のドメイン（例えば、第2の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第2のF c分子）に連結されるサイトカイン分子、間質調節部分または免疫細胞エンゲージャ（例えば、抗体分子、例えば免疫細胞抗原に結合するs c F v）を含み；および

(i i i) 第3のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、癌抗原に結合する第1の抗原ドメインの第2の部分、例えばF a bの第1のV L - C Lを含み、

第1または第2のポリペプチドのいずれかは、第1または第2の免疫グロブリン定常ドメインのC末端に任意選択的に共有結合されるサイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャをさらに含む。

【0098】

10

20

30

40

50

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、第1、第2および第3の非隣接ポリペプチドを含む四重特異性分子であり、

(i) 第1のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1および第2のポリペプチド間の結合を促進する第1のドメイン（例えば、第1の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第1のFc分子）に連結される、例えば癌抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば抗体分子（例えば、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えばFab分子の第1のVH-CH1）を含み；

(ii) 第2のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1および第2のポリペプチド間の結合を促進する第2のドメイン（例えば、第2の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第2のFc分子）に連結されるサイトカイン分子、間質調節部分または免疫細胞エンゲージャ（例えば、抗体分子、例えば免疫細胞抗原に結合するscFv）を含み；および

(iii) 第3のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、癌抗原に結合する第1の抗原ドメインの第2の部分、例えばFabの第1のVL-CLを含み、第1および第2のポリペプチドは、第1または第2の免疫グロブリン定常ドメインのC末端に任意選択的に共有結合されるサイトカイン分子および／または免疫細胞エンゲージャをさらに含む。

【0099】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、a) 第1のポリペプチドであって、第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子と；腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャ；間質調節部分およびサイトカイン分子から選択される2つのポリペプチドとを含む第1のポリペプチドと、b) 第2のポリペプチドであって、第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子と；腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子から選択される2つのポリペプチドとを含む第2のポリペプチドとを含み、多重特異性または多機能性分子ポリペプチドは、腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャ；間質調節部分およびサイトカイン分子を含む。

【0100】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャおよび2つのサイトカイン分子または2つの間質調節部分；

腫瘍標的化部分；2つの免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子または間質調節部分；または

2つの腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子または間質調節部分を含む。

【0101】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、2つの腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子を含み、2つの腫瘍標的化部分の1つは、PD-L1に結合する抗体分子であり；2つの腫瘍標的化部分の1つは、メソテリンに結合し；免疫細胞エンゲージャは、NKp46またはNKp30に結合し；かつサイトカインは、IL2である。

【0102】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、

i) 第1のポリペプチドは、例えば、N-CまたはC-N方向に、腫瘍標的化部分；第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子ならびに免疫細胞エンゲージャを含むこと；

ii) 第1のポリペプチドは、例えば、N-CまたはC-N方向に、腫瘍標的化部分；第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子ならびにサイトカイン分子または間質調節部分を含むこと；または

iii) 第1のポリペプチドは、例えば、N-CまたはC-N方向に、サイトカイン；第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子ならびに免疫細胞

10

20

30

40

50

胞エンゲージャを含むこと；

i v) 第2のポリペプチドは、例えば、N－CまたはC－N方向に、腫瘍標的化部分；第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子ならびに免疫細胞エンゲージャを含むこと；

i i) 第2のポリペプチドは、例えば、N－CまたはC－N方向に、腫瘍標的化部分；第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子ならびにサイトカイン分子または間質調節部分を含むこと；または

i i i) 第2のポリペプチドは、例えば、N－CまたはC－N方向に、サイトカイン；第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子ならびに免疫細胞エンゲージャを含むこと

を含む。

【0103】

ある実施形態において、(i) 腫瘍標的化部分は、

(i a) PDL1、メソテリン、HER3、IGF－1R、GD2、PMSA、CEA、Ronキナーゼもしくはc－Metから選択される固形腫瘍抗原に対する抗体分子；および／または

(i b) FAP、ヒアルロン酸、コラーゲンIV、テネイシンCもしくはテネイシンWから選択される間質抗原に対する抗体分子；あるいは

固形腫瘍抗原に対する抗体分子と、間質抗原に対する抗体分子との組合せと；

(i i)

(i i a) CD40LもしくはCD70リガンド；CD40もしくはCD70に結合する抗体分子；OX40に対する抗体分子；OX40L；B7－H6またはSTINGアゴニストあるいはその組合せの1つ、2つ、3つまたは全てから選択される免疫細胞エンゲージャ；

(i i b) IL－2、IL－12、IL－15、IL－18もしくはIL－21、その断片もしくは変異体または上記のサイトカイン分子のいずれかの組合せから選択されるサイトカイン分子；

(i i c) ヒアルロニダーゼまたはゼラチナーゼから選択される間質調節部分の1つ、2つまたは全てと

を含む。

【0104】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、メソテリン、例えばヒトメソテリンに対する抗体分子；CD40LポリペプチドおよびIL－15またはIL－2分子を含む。

【0105】

ある実施形態において、抗体分子は、軽鎖および重鎖を有する、メソテリンに対するFabを含む。

【0106】

ある実施形態において、メソテリンに対するFabの重鎖は、IL－15またはIL－2分子、例えばヒトIL－15分子をさらに含み、任意選択的に、FabおよびIL－15またはIL－2分子は、例えば、GlyおよびSerを含むリンカーを介して結合される。

【0107】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、以下の立体配置：N末端からC末端に、メソテリンに対するFabの重鎖（例えば、VH－CH1）からIL－15またはIL－2を有し、任意選択的に、FabおよびIL－15またはIL－2間のGly－Serリンカーを含む。

【0108】

ある実施形態において、メソテリンに対するFabの軽鎖は、CD40Lをさらに含み、任意選択的に、FabおよびCD40Lは、例えば、GlyおよびSerを含むリンカーを介して結合される。

10

20

30

40

50

【0109】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、以下の立体配置：N末端からC末端に、CD40Lに融合されたメソテリンに対するFabの軽鎖（例えば、VL-CL1）を有し、任意選択的に、FabおよびCD40L間のGly-Serリンカーを含む。

【0110】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性分子は、FAP、例えばヒトFAPに対する抗体分子およびIL-15またはIL-2分子を含む。ある実施形態において、抗体分子は、軽鎖および重鎖を有する、FAPに対するFabを含む。ある実施形態において、FAPに対するFabの重鎖は、第1のFc領域のFcインターフェース中の対になった空洞-突起（ノブ・イン・ホール）のメンバーを有する第1のFc領域をさらに含む。

10

【0111】

ある実施形態において、多機能性または多重特異性分子は、以下の立体配置：N末端からC末端に、第1のFc領域（例えば、CH2からCH3）に融合されたFAPのFabの重鎖（例えば、VH-CH1）を有する。

【0112】

ある実施形態において、IL-15またはIL-2分子、例えばヒトIL-15またはIL-2分子は、例えば、GlyおよびSerを含むリンカーを介して連結される、第2のFc領域のFcインターフェース中の対になった空洞-突起（ノブ・イン・ホール）の第2のメンバーを有する第2のFc領域をさらに含む。

20

【0113】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、以下の立体配置：N末端からC末端に、IL-15またはIL-2分子-第2のFc領域（例えば、CH2からCH3）を有し、例えば、IL-15またはIL-2分子および第2のFc領域は、GlyおよびSerを含むリンカーを介して連結される。

【0114】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、免疫細胞エンゲージャをさらに含む。ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、CD40リガンドを含む。ある実施形態において、免疫細胞エンハンサーは、対になった空洞-突起（ノブ・イン・ホール）の第2のメンバーおよびIL-15またはIL-2分子、例えばヒトIL-15またはIL-2分子を有する第2のFc領域に結合され、例えば共有結合され、任意選択的に、IL-15もしくはIL-2分子と第2のFc領域との間および／または第2のFc領域と免疫細胞エンハンサーとの間に、GlyおよびSerを含むリンカーを含む。

30

【0115】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、以下の立体配置：N末端からC末端に、IL-15またはIL-2分子-第2のFc領域（例えば、CH2からCH3）-免疫細胞エンハンサーを有し、任意選択的に、IL-15もしくはIL-2分子と第2のFc領域との間および／または第2のFc領域と免疫細胞エンハンサーとの間に、GlyおよびSerを含むリンカーを含む。

40

【0116】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、第2の免疫細胞エンハンサーをさらに含む。ある実施形態において、第2の免疫細胞エンハンサーは、B7H6分子を含む。ある実施形態において、第2の免疫細胞エンハンサーは、第1のFc領域のFcインターフェース中の対になった空洞-突起（ノブ・イン・ホール）の第1のメンバーおよびFabの重鎖を有する第1のFc領域に結合され、例えば共有結合され、任意選択的に、B7H6分子および第1のFc領域間に、GlyおよびSerを含むリンカーを含む。

【0117】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、固形腫瘍抗原または

50

間質抗原に対する標的化抗体分子および少なくとも2つの免疫細胞エンハンサーを含む。ある実施形態において、抗体分子は、メソテリンまたはFAPに結合する。ある実施形態において、免疫細胞エンハンサーは、TLRアゴニスト（例えば、TLR9アゴニスト）またはSTINGアゴニストおよびOX40に対する抗体分子である。ある実施形態において、STINGアゴニストは、任意選択的に、2'，5'または3'，5'リン酸塩結合とともに環状ジヌクレオチド、例えば環状ジ-GMP（cdGMP）、環状ジ-AMP（cdAMP）またはその組合せを含み、任意選択的に、STINGアゴニストは、標的化抗体または免疫細胞エンハンサーに結合される（例えば、直接コンジュゲートされる）。ある実施形態において、TLRアゴニストは、非メチル化CpG配列を含む。

【0118】

ある実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、メソテリンまたはFAPに対する第1の結合特異性およびOX40に対する第2の結合特異性を有する二重特異性抗体を含む。

【0119】

上記の多重特異性分子のいずれかのある実施形態において、腫瘍標的化部分は、メソテリン、PD L1、HER3、IGF1RまたはFAPから選択される癌抗原に対する抗体分子から選択される。ある実施形態において、多重特異性分子は、メソテリン、PD L1、HER3、IGF1RまたはFAPから選択される2つまたは3つの癌抗原に対する2つまたは3つの抗体分子を含む。ある実施形態において、腫瘍標的化部分は、PD L1に結合し、かつPD L1と、そのリガンド、例えばPD1との相互作用を阻害する。他の実施形態において、腫瘍標的化部分は、PD L1に結合し、かつPD L1と、そのリガンド、例えばPD1との相互作用を阻害しない。

【0120】

ある実施形態において、第1および第2の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗メソテリン抗体分子および抗PD L1抗体分子である。ある実施形態において、第2および第1の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗メソテリン抗体分子および抗PD L1抗体分子である。

【0121】

ある実施形態において、第1および第2の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗FAP抗体分子および抗PD L1抗体分子である。ある実施形態において、第2および第1の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗FAP抗体分子および抗PD L1抗体分子である。

【0122】

ある実施形態において、第1および第2の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗HER3抗体分子および抗IGF1R抗体分子である。ある実施形態において、第2および第1の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗HER3抗体分子および抗IGF1R抗体分子である。

【0123】

上記の多重特異性分子のいずれかのある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、NKp30に対する抗体分子、NKp46、CD40Lまたは41BB Lに対する抗体分子から選択される。

【0124】

上記の多重特異性分子のいずれかのある実施形態において、サイトカイン分子は、IL-2分子（例えば、IL-2もしくはその機能的変異体）、IL-15分子（例えば、IL-15もしくはその機能的変異体）またはIL-21分子（例えば、IL-21もしくはその機能的変異体）である。

【0125】

上記の多重特異性分子のいずれかのある実施形態において、間質調節分子は、ヒアルロニダーゼ（例えば、ヒアルロニダーゼ1）もしくはその機能的変異体またはゼラチナーゼもしくはその機能的変異体から選択される。

【0126】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分（例えば、抗メソテリンFab）およびIL-2（またはその機能的変異体）を含む。

10

20

30

40

50

【0127】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分（例えば、抗メソテリン Fab）、IL-2（またはその機能的変異体）および抗NKp30 NK細胞エンゲージャ部分（例えば、抗NKp30 FabまたはscFv）を含む。

【0128】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分（例えば、抗メソテリン Fab）および抗NKp30 NK細胞エンゲージャ部分（例えば、抗NKp30 FabまたはscFv）を含む。

【0129】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分（例えば、抗メソテリン Fab）および抗PDL1腫瘍標的化部分（例えば、抗PDL1 Fab）を含む。

10

【0130】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分（例えば、抗メソテリン Fab）、抗PDL1腫瘍標的化部分（例えば、抗PDL1 Fab）およびIL-2（またはその機能的変異体）を含む。

【0131】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分（例えば、抗メソテリン Fab）、抗PDL1腫瘍標的化部分（例えば、抗PDL1 Fab）および抗NKp46 NK細胞エンゲージャ部分（例えば、抗NKp46 FabまたはscFv）を含む。

20

【0132】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分（例えば、抗メソテリン Fab）、抗PDL1腫瘍標的化部分（例えば、抗PDL1 Fab）、抗NKp46 NK細胞エンゲージャ部分（例えば、抗NKp46 FabまたはscFv）およびIL-2（またはその機能的変異体）を含む。

【0133】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗HER3腫瘍標的化部分（例えば、抗HER3 Fab）、抗IGF1R腫瘍標的化部分（例えば、抗IGF1R Fab）およびIL-2（またはその機能的変異体）を含む。

【0134】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗HER3腫瘍標的化部分（例えば、抗HER3 Fab）、抗IGF1R腫瘍標的化部分（例えば、抗IGF1R Fab）、抗NKp46 NK細胞エンゲージャ部分（例えば、抗NKp46 FabまたはscFv）およびIL-2（またはその機能的変異体）を含む。

30

【0135】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗HER3腫瘍標的化部分（例えば、抗HER3 Fab）および抗IGF1R腫瘍標的化部分（例えば、抗IGF1R Fab）を含む。

【0136】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗FAP腫瘍標的化部分（例えば、抗FAP Fab）およびヒアルロニダーゼ1（またはその機能的変異体）を含む。

40

【0137】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗FAP腫瘍標的化部分（例えば、抗FAP Fab）、IL-2（またはその機能的変異体）およびヒアルロニダーゼ1（またはその機能的変異体）を含む。

【0138】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗FAP腫瘍標的化部分（例えば、抗FAP Fab）、抗PDL1腫瘍標的化部分（例えば、抗PDL1 Fab）およびヒアルロニダーゼ1（またはその機能的変異体）を含む。

【0139】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗FAP腫瘍標的化部分（例えば、抗FAP

50

F a b)、抗 P D L 1 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 P D L 1 F a b)、I L - 2 (またはその機能的変異体) およびヒアルロニダーゼ 1 (またはその機能的変異体) を含む。

【 0 1 4 0 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 P D L 1 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 P D L 1 F a b)、抗 N K p 4 6 N K 細胞エンゲージャ部分 (例えば、抗 N K p 4 6 F a b または s c F v)、I L - 2 (またはその機能的変異体) およびヒアルロニダーゼ 1 (またはその機能的変異体) を含む。

【 0 1 4 1 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 F A P 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 F A P F a b) およびゼラチナーゼ (またはその機能的変異体) を含む。

【 0 1 4 2 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 F A P 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 F A P F a b)、抗 P D L 1 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 P D L 1 F a b)、I L - 2 (またはその機能的変異体) およびゼラチナーゼ (またはその機能的変異体) を含む。

【 0 1 4 3 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分、I L - 2 1 またはその機能的変異体、4 1 B B - L および C D 4 0 L を含む。

【 0 1 4 4 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 F A P 腫瘍標的化部分および C D 4 0 L を含む。

【 0 1 4 5 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 F A P 腫瘍標的化部分および I L - 1 5 を含む。

【 0 1 4 6 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分 (例えば、抗メソテリン F a b) および I L - 2 (またはその機能的変異体) を含む。

【 0 1 4 7 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分 (例えば、抗メソテリン F a b)、I L - 2 (またはその機能的変異体) および抗 N K p 3 0 N K 細胞エンゲージャ部分 (例えば、抗 N K p 3 0 F a b または s c F v) を含む。

【 0 1 4 8 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分 (例えば、抗メソテリン F a b) および抗 N K p 3 0 N K 細胞エンゲージャ部分 (例えば、抗 N K p 3 0 F a b または s c F v) を含む。

【 0 1 4 9 】

一実施形態において、多重特異性分子は、I L - 2 (またはその機能的変異体) を含む。

【 0 1 5 0 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分 (例えば、抗メソテリン F a b) および抗 P D L 1 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 P D L 1 F a b) を含む。

【 0 1 5 1 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分 (例えば、抗メソテリン F a b)、抗 P D L 1 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 P D L 1 F a b) および I L - 2 (またはその機能的変異体) を含む。

【 0 1 5 2 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分 (例えば、抗メソテリン F a b)、抗 P D L 1 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 P D L 1 F a b) および抗 N K p 4 6 N K 細胞エンゲージャ部分 (例えば、抗 N K p 4 6 F a b または s c F v) を含む。

【 0 1 5 3 】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗メソテリン腫瘍標的化部分 (例えば、抗メソ

10

20

30

40

50

テリン Fab)、抗 PDL1 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 PDL1 Fab)、抗 NKp46 NK細胞エンゲージャ部分 (例えば、抗 NKp46 Fab または scFv) および IL-2 (またはその機能的変異体) を含む。

【0154】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 HER3 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 HER3 Fab)、抗 IGF1R 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 IGF1R Fab) および IL-2 (またはその機能的変異体) を含む。

【0155】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 HER3 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 HER3 Fab)、抗 IGF1R 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 IGF1R Fab) および抗 NKp46 NK細胞エンゲージャ部分 (例えば、抗 NKp46 Fab または scFv) を含む。

10

【0156】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 HER3 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 HER3 Fab)、抗 IGF1R 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 IGF1R Fab) および抗 CD3 T細胞エンゲージャ部分 (例えば、抗 CD3 Fab または scFv) を含む。

【0157】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 HER3 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 HER3 Fab)、抗 IGF1R 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 IGF1R Fab)、抗 NKp46 NK細胞エンゲージャ部分 (例えば、抗 NKp46 Fab または scFv) および IL-2 (またはその機能的変異体) を含む。

20

【0158】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 HER3 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 HER3 Fab)、抗 IGF1R 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 IGF1R Fab)、抗 CD3 T細胞エンゲージャ部分 (例えば、抗 CD3 Fab または scFv) および IL-2 (またはその機能的変異体) を含む。

【0159】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 HER3 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 HER3 Fab) および抗 IGF1R 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 IGF1R Fab) を含む。

【0160】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 HER3 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 HER3 Fab)、抗 IGF1R 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 IGF1R Fab) および IL-7 (またはその機能的変異体) を含む。

30

【0161】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 HER3 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 HER3 Fab)、抗 IGF1R 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 IGF1R Fab)、抗 CD3 T細胞エンゲージャ部分 (例えば、抗 CD3 Fab または scFv) および IL-7 (またはその機能的変異体) を含む。

【0162】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 HER3 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 HER3 Fab)、抗 IGF1R 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 IGF1R Fab)、抗 NKp46 NK細胞エンゲージャ部分 (例えば、抗 NKp46 Fab または scFv) および IL-7 (またはその機能的変異体) を含む。

40

【0163】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 FAP 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 FAP Fab) およびヒアルロニダーゼ1 (またはその機能的変異体) を含む。

【0164】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗 FAP 腫瘍標的化部分 (例えば、抗 FAP Fab)、IL-2 (またはその機能的変異体) およびヒアルロニダーゼ1 (またはその機能的変異体) を含む。

50

【0165】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗FAP腫瘍標的化部分（例えば、抗FAP Fab）、抗PDL1腫瘍標的化部分（例えば、抗PDL1 Fab）、IL-2（またはその機能的変異体）およびヒアルロニダーゼ1（またはその機能的変異体）を含む。

【0166】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗FAP腫瘍標的化部分（例えば、抗FAP Fab）、抗PDL1腫瘍標的化部分（例えば、抗PDL1 Fab）およびヒアルロニダーゼ1（またはその機能的変異体）を含む。

【0167】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗PDL1腫瘍標的化部分（例えば、抗PDL1 Fab）、抗NKp46 NK細胞エンゲージャ部分（例えば、抗NKp46 FabまたはscFv）、IL-2（またはその機能的変異体）およびヒアルロニダーゼ1（またはその機能的変異体）を含む。

10

【0168】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗FAP腫瘍標的化部分（例えば、抗FAP Fab）およびゼラチナーゼ（またはその機能的変異体）を含む。

【0169】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗FAP腫瘍標的化部分（例えば、抗FAP Fab）、抗PDL1腫瘍標的化部分（例えば、抗PDL1 Fab）、IL-2（またはその機能的変異体）およびゼラチナーゼ（またはその機能的変異体）を含む。

20

【0170】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載される任意の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドをコードする単離核酸分子を提供する。

【0171】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載される多重特異性もしくは多機能性分子のいずれかをコードするヌクレオチド配列またはそれと実質的に相同である（例えば、それと少なくとも95%～99.9%同一である）ヌクレオチド配列を含む単離核酸分子を提供する。

【0172】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載される任意の核酸分子の1つまたは複数を含むベクター、例えば発現ベクターを提供する。

30

【0173】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載される核酸分子またはベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0174】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載される多重特異性または多機能性分子ポリペプチドを作製、例えば生成する方法であって、好適な条件、例えば遺伝子発現および／またはホモ二量体化もしくはヘテロ二量体化に好適な条件下において、本明細書に記載される宿主細胞を培養することを含む方法を提供する。

【0175】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載される多重特異性または多機能性分子ポリペプチドと、薬学的に許容できる担体、賦形剤または安定剤とを含む医薬組成物を提供する。

40

【0176】

別の態様において、本開示は、癌を治療する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に記載される多重特異性または多機能性分子ポリペプチドを投与することを含み、多重特異性抗体は、癌を治療するのに有効な量で投与される、方法を提供する。

【0177】

ある実施形態において、癌は、固形腫瘍癌または転移性病変である。ある実施形態において、固形腫瘍癌は、膵臓癌（例えば、膵臓腺癌）、乳癌、大腸癌、肺癌（例えば、小細胞

50

または非小細胞肺癌)、皮膚癌、卵巣癌または肝臓癌の1つまたは複数である。ある実施形態において、癌は、血液癌である。

【0178】

ある実施形態において、本方法は、第2の治療処置を投与することをさらに含む。ある実施形態において、第2の治療処置は、治療剤(例えば、化学療法剤、生物剤、ホルモン療法)、放射線または手術を含む。ある実施形態において、治療剤は、化学療法剤または生物剤から選択される。

【0179】

特に定義されない限り、本明細書において使用される全ての専門用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様のまたは均等な方法および材料が本発明の実施または試験に使用され得るが、好適な方法および材料が後述される。全ての刊行物、特許出願、特許および本明細書において言及される参考文献は、全体が参照により援用される。抵触する場合、定義を含む本明細書が優先されるものとする。さらに、材料、方法および実施例は、例示的なものであるに過ぎず、限定的であることは意図されていない。

【0180】

本発明の他の特徴および利点が、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかであろう。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

多重特異性または多機能性分子ポリペプチドであって、

(i) 癌抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば第1の腫瘍標的化部分と；

(ii) NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される免疫細胞エンゲージャ；

(iii) サイトカイン分子；および

(iv) 間質調節部分

の2つまたは全てと

を含む多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目2)

(i)、(ii)ならびに(iii)および(iv)の一方または両方を含む、項目1に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目3)

(i)、(iii)ならびに(ii)および(iv)の一方または両方を含む、項目1に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目4)

(i)、(ii)および(iii)または(i)、(ii)および(iv)を含む、項目1に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目5)

(i)、(ii)、(iii)および(iv)を含む、項目1に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目6)

多重特異性または多機能性分子ポリペプチドであって、

(i) 1つまたは複数の癌抗原に結合する少なくとも2つの腫瘍標的化部分、例えば第1および第2の腫瘍標的化部分と；

(ii) NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される免疫細胞エンゲージャ；および

(iii) 間質調節部分

の一方または両方と

10

20

30

40

50

を含む多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 7)

間質調節部分と、腫瘍抗原または間質抗原に結合する腫瘍標的化部分（例えば、抗体分子、リガンド分子または受容体分子）とを含む多機能性（例えば、二機能性）分子ポリペプチド。

(項目 8)

第 2 の腫瘍標的化部分をさらに含み、前記第 2 の腫瘍標的化部分は、前記第 1 の腫瘍標的化部分、例えば (i) の前記腫瘍標的化部分と同じかまたは異なる癌抗原に結合する、項目 1 ～ 5 または 7 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 9)

前記第 2 の腫瘍標的化部分は、前記第 1 の腫瘍標的化部分と同じ癌抗原における異なるエピトープに結合する、項目 6 または 8 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 10)

前記第 2 の腫瘍標的化部分および前記第 1 の腫瘍標的化部分は、異なる癌抗原に結合する、項目 6 または 8 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 11)

前記異なる癌抗原は、同じ細胞または腫瘍組織に存在する、項目 10 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 12)

前記異なる癌抗原は、異なる細胞または腫瘍組織に存在する、項目 10 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 13)

前記第 1 の腫瘍標的化部分および前記第 2 の腫瘍標的化部分の前記癌抗原に対する親和性、例えば複合親和性は、その対応する結合メンバーに対する (i i)、(i i i) または (i v)（単独でまたは多重特異性分子の一部としてのいずれかで）の親和性と等しいかまたはそれを超える、項目 11 または 12 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 14)

前記第 1 の腫瘍標的化部分および前記第 2 の腫瘍標的化部分の前記癌抗原に対する前記親和性、例えば前記複合親和性は、その対応する結合メンバーに対する (i i)、(i i i) または (i v)（単独でまたは前記多重特異性分子の一部としてのいずれかで）の前記親和性より少なくとも 2、5、10、20、30、40、50、75 または 100 倍高い、項目 13 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 15)

腫瘍、例えば癌細胞または間質細胞に対する前記第 1 の腫瘍標的化部分および前記第 2 の腫瘍標的化部分の親和性、例えば複合親和性は、前記腫瘍標的化部分または前記第 2 の腫瘍標的化部分の 1 つのみを有する同様の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドの親和性と等しいかまたはそれを超える、項目 11 または 12 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 16)

前記腫瘍、例えば癌細胞または間質細胞に対する前記第 1 の腫瘍標的化部分および前記第 2 の腫瘍標的化部分の前記親和性、例えば前記複合親和性は、前記腫瘍標的化部分または前記第 2 の腫瘍標的化部分の 1 つのみを有する同様の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドの親和性より少なくとも 2、5、10、20、30、40、50、75 または 100 倍高い、項目 15 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 17)

少なくとも 2 つの非隣接ポリペプチド鎖を含む、項目 1 ～ 16 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 18)

10

20

30

40

50

A、B－「二量体化モジュール」－C、－D

(式中、

(1) 前記二量体化モジュールは、免疫グロブリン定常ドメイン、例えば重鎖定常ドメイン（例えば、ホモ二量体またはヘテロ二量体重鎖定常領域、例えばFc領域）または免疫グロブリン可変領域（例えば、Fab領域）の定常ドメインを含み；および

(2) A、B、CおよびDは、独立して、存在しないか；(i) 腫瘍標的化部分、例えば第1および／もしくは第2の腫瘍標的化部分；(ii) NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャもしくはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される免疫細胞エンゲージャ；(iii) サイトカイン分子または(iv) 間質調節部分である)

を含む多重特異性または多機能性分子ポリペプチドであって、

(i) 癌抗原に結合する前記腫瘍標的化部分、例えば第1の腫瘍標的化部分と；

(ii) NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される免疫細胞エンゲージャ；

(iii) サイトカイン分子；および

(iv) 間質調節部分

の1つ、2つまたは全てと

を含み、ただし、

(ii) および(iii) が存在しない場合、(i) および(iv) は、存在し、

1つの(i) および1つの(ii) が存在する場合、(iii) もしくは(iv) または両方は、存在し、または

1つの(i) および1つの(iii) が存在する場合、(ii) もしくは(iv) または両方は、存在する、多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目19)

(i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、第1の免疫細胞エンゲージャを含み、かつDは、第2の免疫細胞エンゲージャを含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み、かつCおよびDは、同じかまたは異なる免疫細胞エンゲージャを含み）；

(ii) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、第1のサイトカイン分子を含み、かつDは、第2のサイトカイン分子を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み、かつCおよびDは、同じかまたは異なるサイトカイン分子を含み）；

(iii) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、第1の間質調節部分を含み、かつDは、第2の間質調節部分を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み、かつCおよびDは、同じかまたは異なる間質調節部分を含み）；

(iv) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、免疫細胞エンゲージャを含み、かつDは、サイトカイン分子を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(v) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、サイトカイン分子を含み、かつDは、免疫細胞エンゲージャを含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(vi) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、免疫細胞エンゲージャを含み、かつDは、間質調節部分を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(vii) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、間質調節部分を含み、かつDは、免疫細胞エンゲージャを含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(viii) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み

10

20

30

40

50

、Cは、サイトカイン分子を含み、かつDは、間質調節部分を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

（i x）Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、間質調節部分を含み、かつDは、サイトカイン分子を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

（x）Aは、腫瘍標的化部分を含み、かつB、CおよびDの少なくとも1つ、2つまたは3つは、第2の腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子、間質調節部分を含むかまたは存在せず、ただし、（i i）および（i i i）が存在しない場合、（i）および（i v）は、存在し；

（x i）Bは、腫瘍標的化部分を含み、かつA、CおよびDの少なくとも1つ、2つまたは3つは、第2の腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子、間質調節部分を含むかまたは存在せず、ただし、（i i）および（i i i）が存在しない場合、（i）および（i v）は、存在し；

（x i i）Cは、腫瘍標的化部分を含み、かつA、BおよびDの少なくとも1つ、2つまたは3つは、第2の腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子、間質調節部分を含むかまたは存在せず、ただし、（i i）および（i i i）が存在しない場合、（i）および（i v）は、存在し；

（x i i i）Dは、腫瘍標的化部分を含み、かつA、BおよびCの少なくとも1つ、2つまたは3つは、第2の腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子、間質調節部分を含むかまたは存在せず、ただし、（i i）および（i i i）が存在しない場合、（i）および（i v）は、存在し；

（x i v）Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ免疫細胞エンゲージャおよび非存在であり；

（x v）Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ非存在および免疫細胞エンゲージャであり；

（x v i）Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれサイトカイン分子および非存在であり；

（x v i i）Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ非存在およびサイトカイン分子であり；

（x v i i i）Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ間質調節部分および非存在であり；

（x i x）Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ非存在および間質調節部分であり；

（x x）Aは、腫瘍標的化部分を含み、かつB、CまたはDの1つは、間質調節部分を含み；

（x x i）Bは、腫瘍標的化部分を含み、かつA、CまたはDの1つは、間質調節部分を含み；

（x x i i）Cは、腫瘍標的化部分を含み、かつA、BまたはDの1つは、間質調節部分を含み；

（x x i i i）Dは、腫瘍標的化部分を含み、かつA、BまたはCの1つは、間質調節部分を含み；

（x i v）AまたはBは、腫瘍標的化部分を含み、かつCは、免疫細胞エンゲージャを含み、かつDは、サイトカイン分子を含み；

（x v）AまたはBは、腫瘍標的化部分を含み、かつDは、免疫細胞エンゲージャを含み、かつCは、サイトカイン分子を含み；

（x v i）Aおよび／またはBは、1つまたは2つの免疫細胞エンゲージャを含み、かつDは、腫瘍標的化部分を含み、かつCは、サイトカイン分子を含み；

（x v i i）Aおよび／またはBは、1つまたは2つの免疫細胞エンゲージャを含み、かつCは、腫瘍標的化部分を含み、かつBは、サイトカイン分子を含み；

（x v i i i）Aおよび／またはBは、1つまたは2つのサイトカインを含み、かつD

10

20

30

40

50

は、腫瘍標的化部分を含み、かつCは、免疫細胞エンゲージヤを含み；または

(x i x) Aおよび／またはBは、1つまたは2つのサイトカインを含み、かつCは、腫瘍標的化部分を含み、かつDは、免疫細胞エンゲージヤを含む、項目18に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目20)

(i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、免疫細胞エンゲージヤ（例えば、樹枝状細胞エンゲージヤ）を含み、かつDは、サイトカイン分子を含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(i i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、Cは、サイトカイン分子を含み、かつDは、免疫細胞エンゲージヤを含み（例えば、AおよびBは、同じかまたは異なる標的化部分を含み）；

(i i i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ免疫細胞エンゲージヤおよび非存在であり；

(i v) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ非存在および免疫細胞エンゲージヤ、例えばT細胞エンゲージヤであり；

(v) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれサイトカイン分子および非存在であり；

(v i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ非存在およびサイトカイン分子であり；

(v i i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ間質調節部分および非存在であり；

(v i i i) Aは、第1の腫瘍標的化部分を含み、Bは、第2の腫瘍標的化部分を含み、CおよびDは、それぞれ非存在および間質調節部分であり；または

(i x) Aは、腫瘍標的化部分を含み、かつB、CまたはDの1つは、間質調節部分を含む、項目18に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目21)

前記第1および第2の腫瘍標的化部分は、同じ癌抗原における異なるエピトープに結合する、項目19または20に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目22)

前記第1および第2の腫瘍標的化部分は、異なる癌抗原に結合する、項目19または20に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目23)

前記異なる癌抗原は、同じ細胞または腫瘍組織に存在する、項目22に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目24)

前記異なる癌抗原は、異なる細胞または腫瘍組織に存在する、項目22に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目25)

前記第1および第2の腫瘍標的化部分の前記癌抗原に対する親和性、例えば複合親和性は、その対応する結合メンバーに対する(i i)、(i i i)または(i v)（単独または多重特異性分子の一部としてのいずれかで）の親和性と等しいかまたはそれを超える、項目21または22に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目26)

前記第1および第2の腫瘍標的化部分の前記癌抗原に対する前記親和性、例えば前記複合親和性は、その対応する結合メンバーに対する(i i)、(i i i)または(i v)（単独または前記多重特異性分子の一部としてのいずれかで）の前記親和性より少なくとも2、5、10、20、30、40、50、75または100倍高い、項目25に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目27)

腫瘍、例えば癌細胞または間質細胞に対する前記第 1 および第 2 の腫瘍標的化部分の親和性、例えば複合親和性は、前記腫瘍標的化部分または前記第 2 の腫瘍標的化部分の 1 つのみを有する同様の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドの親和性と等しいかまたはそれを超える、項目 2 1 または 2 2 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 2 8)

前記腫瘍、例えば癌細胞または間質細胞に対する前記第 1 および第 2 の腫瘍標的化部分の前記親和性、例えば前記複合親和性は、前記腫瘍標的化部分または前記第 2 の腫瘍標的化部分の 1 つのみを有する同様の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドの親和性より少なくとも 2、5、10、20、30、40、50、75 または 100 倍高い、項目 2 7 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

10

(項目 2 9)

前記免疫細胞エンゲージャは、免疫細胞、例えばエフェクター細胞に結合するが、それを活性化しない、項目 1 ～ 2 8 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 3 0)

前記免疫細胞エンゲージャは、免疫細胞、例えばエフェクター細胞に結合し、かつそれを活性化する、項目 1 ～ 2 8 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 3 1)

前記腫瘍標的化部分は、前記癌抗原に結合する抗体分子、受容体分子（例えば、受容体、受容体断片もしくはその機能的変異体）またはリガンド分子（例えば、リガンド、リガンド断片もしくはその機能的変異体）、あるいはその組合せを含む、項目 1 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

20

(項目 3 2)

前記腫瘍標的化部分は、血液癌、固形腫瘍、転移性癌、軟部組織腫瘍、転移性病変またはその組合せに存在する癌抗原に結合する、項目 1 ～ 3 1 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 3 3)

前記癌抗原は、腫瘍抗原もしくは間質抗原または血液抗原である、項目 1 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

30

(項目 3 4)

前記腫瘍抗原または間質抗原は、線維性または線維形成性固形腫瘍に存在する、項目 3 3 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 3 5)

前記腫瘍抗原または間質抗原は、腫瘍、例えば限定された腫瘍灌流、圧縮された血管または線維性腫瘍間質の 1 つまたは複数を有することを特徴とする種類の腫瘍に存在する、項目 3 3 または 3 4 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 3 6)

前記腫瘍、例えば固形腫瘍は、腺癌（例えば、腺癌）、乳癌、大腸癌、肺癌（例えば、小細胞または非小細胞肺癌）、皮膚癌、卵巣癌または肝臓癌の 1 つまたは複数から選択される、項目 3 2 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

40

(項目 3 7)

前記血液癌は、B 細胞または T 細胞悪性腫瘍、例えばホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（例えば、B 細胞リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、辺縁帯 B 細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、有毛細胞白血病）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫または急性リンパ球性白血病の 1 つまたは複数から選択される、項目 3 2 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 3 8)

50

前記癌抗原、例えば固形腫瘍抗原は、P D L 1、メソテリン、C D 4 7、ガングリオシド 2 (G D 2)、前立腺幹細胞抗原 (P S C A)、前立腺特異的膜抗原 (P M S A)、前立腺特異的抗原 (P S A)、癌胎児性抗原 (C E A)、R o n キナーゼ、c - M e t、未熟ラミニン受容体、T A G - 7 2、B I N G - 4、カルシウム活性化塩素イオンチャネル 2、サイクリン - B 1、9 D 7、E p - C A M、E p h A 3、H e r 2 / n e u、テロメラゼ、S A P - 1、サバイビン、N Y - E S O - 1 / L A G E - 1、P R A M E、S S X - 2、メラニン - A / M A R T - 1、G p 1 0 0 / p m e l 1 7、チロシナーゼ、T R P - 1 / - 2、M C 1 R、β - カテニン、B R C A 1 / 2、C D K 4、C M L 6 6、フィブロネクチン、p 5 3、R a s、T G F - B 受容体、A F P、E T A、M A G E、M U C - 1、C A - 1 2 5、B A G E、G A G E、N Y - E S O - 1、β - カテニン、C D K 4、C D C 2 7、C D 4 7、α アクチニン - 4、T R P 1 / g p 7 5、T R P 2、g p 1 0 0、メラニン - A / M A R T 1、ガングリオシド、W T 1、E p h A 3、上皮成長因子受容体 (E G F R)、C D 2 0、M A R T - 2、M A R T - 1、M U C 1、M U C 2、M U M 1、M U M 2、M U M 3、N A 8 8 - 1、N P M、O A 1、O G T、R C C、R U I 1、R U I 2、S A G E、T R G、T R P 1、T S T A、葉酸受容体 α、L 1 - C A M、C A I X、E G F R v I I I、g p A 3 3、G D 3、G M 2、V E G F R、インテグリン (インテグリン α V β 3、インテグリン α 5 β 1)、炭水化物 (L e)、I G F 1 R、E P H A 3、T R A I L R 1、T R A I L R 2 または R A N K L から選択される、項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

10

(項目 3 9)

前記癌抗原は、P D L 1、メソテリン、G D 2、P M S A、C E A、R o n キナーゼまたは c - M e t から選択される、項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

20

(項目 4 0)

前記癌抗原は、線維芽細胞活性化プロテアーゼ (F A P)、T G F - β、ヒアルロン酸、コラーゲン、例えばコラーゲン I V、テネイシン C または テネイシン W から選択される間質抗原である、項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 4 1)

前記癌抗原は、C D 1 9、C D 3 3、C D 4 7、C D 1 2 3、C D 2 0、C D 9 9、C D 3 0、B C M A、C D 3 8、C D 2 2、S L A M F 7 または N Y - E S O 1 から選択される血液抗原である、項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

30

(項目 4 2)

前記腫瘍標的化部分は、メソテリン、P D L 1、H E R 3、I G F 1 R、F A P、C D 4 7 または C D 1 2 3 から選択される癌抗原に対する抗体分子から選択される、項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 4 3)

前記腫瘍標的化部分は、メソテリンに結合する抗体分子 (例えば、F a b または s c F v) を含む、項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

40

(項目 4 4)

前記腫瘍標的化部分は、P D L 1 に結合する抗体分子 (例えば、F a b または s c F v) を含む、項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 4 5)

メソテリン、P D L 1、H E R 3、I G F 1 R、F A P、C D 1 2 3 または C D 4 7 から選択される 2 つまたは 3 つの癌抗原に対する 2 つまたは 3 つの抗体分子を含む、項目 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 4 6)

50

前記腫瘍標的化部分は、P D L 1に結合し、かつP D 1とのP D L 1の相互作用を阻害する、項目4 2、4 4または4 5のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目4 7)

前記腫瘍標的化部分は、P D L 1に結合し、かつP D 1とのP D L 1の相互作用を阻害しない、項目4 2、4 4または4 5のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目4 8)

前記第1および第2の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗メソテリン抗体分子および抗P D L 1抗体分子である、項目1～3 7のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目4 9)

前記第2および第1の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗メソテリン抗体分子および抗P D L 1抗体分子である、項目1～3 7のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目5 0)

前記第1および第2の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗F A P抗体分子および抗P D L 1抗体分子である、項目1～3 7のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目5 1)

前記第2および第1の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗F A P抗体分子および抗P D L 1抗体分子である、項目1～3 7のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目5 2)

前記第1および第2の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗H E R 3抗体分子および抗I G F 1 R抗体分子であり；または

前記第2および第1の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗H E R 3抗体分子および抗I G F 1 R抗体分子である、項目1～3 7のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目5 3)

前記第1および第2の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗C D 1 2 3抗体分子および抗C D 4 7抗体分子であり；または

前記第2および第1の腫瘍標的化部分は、それぞれ抗C D 1 2 3抗体分子および抗C D 4 7抗体分子である、項目1～3 7のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目5 4)

前記免疫細胞エンゲージャは、N K細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャもしくはマクロファージ細胞エンゲージャまたはその組合せから選択される、項目1～5 3のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目5 5)

前記免疫細胞エンゲージャは、N K細胞への結合およびN K細胞の活性化を媒介するN K細胞エンゲージャを含む、項目1～5 4のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目5 6)

前記免疫細胞エンゲージャは、N K細胞への結合を媒介するが、N K細胞の活性化を媒介しないN K細胞エンゲージャを含む、項目1～5 4のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目5 7)

前記N K細胞エンゲージャは、N K p 3 0、N K p 4 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N

10

20

30

40

50

K G 2 D、D N A M 1、D A P 1 0、C D 1 6（例えば、C D 1 6 a、C D 1 6 bまたは両方）、C R T A M、C D 2 7、P S G L 1、C D 9 6、C D 1 0 0（S E M A 4 D）、N K p 8 0、C D 2 4 4（S L A M F 4または2 B 4としても知られている）、S L A M F 6、S L A M F 7、K I R 2 D S 2、K I R 2 D S 4、K I R 3 D S 1、K I R 2 D S 3、K I R 2 D S 5、K I R 2 D S 1、C D 9 4、N K G 2 C、N K G 2 EまたはC D 1 6 0に結合する（例えば、それを活性化する）抗体分子、例えば抗原結合ドメインまたはリガンドから選択される、項目1～56のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

（項目58）

前記NK細胞エンゲージャは、抗体分子、例えば抗原結合ドメインである、項目1～56のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

10

（項目59）

前記NK細胞エンゲージャは、N K p 3 0またはN K p 4 6に結合する抗体分子、例えば抗原結合ドメインである、項目58に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

（項目60）

前記NK細胞エンゲージャは、リガンドであり、任意選択的に、前記リガンドは、免疫グロブリン定常領域、例えばF c領域をさらに含む、項目1～54のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

（項目61）

N K p 4 4またはN K p 4 6の前記リガンドは、ウイルスH Aである、項目60に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

20

（項目62）

D A P 1 0の前記リガンドは、N K G 2 Dの補助受容体である、項目60に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

（項目63）

C D 1 6の前記リガンドは、C D 1 6 a／bリガンド、例えば抗体F c領域をさらに含むC D 1 6 a／bリガンドである、項目60に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

（項目64）

前記免疫細胞エンゲージャは、B細胞、マクロファージおよび／もしくは樹枝状細胞の1つもしくは複数への結合もしくはその活性化または両方を媒介する、項目1～54のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

30

（項目65）

前記免疫細胞エンゲージャは、C D 4 0リガンド（C D 4 0 L）もしくはC D 7 0リガンド；C D 4 0もしくはC D 7 0に結合する抗体分子；O X 4 0に対する抗体分子；O X 4 0リガンド（O X 4 0 L）；T o l l様受容体のアゴニスト（例えば、T L R 4、例えば構成的活性型T L R 4（c a T L R 4）もしくはT L R 9アゴニスト）；4 1 B B；C D 2アゴニスト；C D 4 7またはS T I N Gアゴニストあるいはその組合せの1つまたは複数から選択されるB細胞、マクロファージおよび／または樹枝状細胞エンゲージャを含む、項目64に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

40

（項目66）

前記B細胞エンゲージャは、C D 4 0 L、O X 4 0 LもしくはC D 7 0リガンドまたはO X 4 0、C D 4 0もしくはC D 7 0に結合する抗体分子である、項目64に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

（項目67）

前記マクロファージ細胞エンゲージャは、C D 2アゴニスト；C D 4 0 L；O X 4 0 L；O X 4 0、C D 4 0もしくはC D 7 0に結合する抗体分子；T o l l様受容体（T L R）のアゴニスト（例えば、T L R 4、例えば構成的活性型T L R 4（c a T L R 4）もしくはT L R 9アゴニスト）；C D 4 7またはS T I N Gアゴニストである、項目64に記

50

載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 6 8)

前記樹枝状細胞エンゲージャは、C D 2 アゴニスト、O X 4 0 抗体、O X 4 0 L、4 1 B B アゴニスト、T o l l 様受容体アゴニストもしくはその断片（例えば、T L R 4、例えば構成的活性型 T L R 4 (c a T L R 4)）、C D 4 7 アゴニストまたは S T I N G アゴニストである、項目 6 4 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 6 9)

前記 S T I N G アゴニストは、任意選択的に 2'、5' または 3'、5' リン酸塩結合とともに環状ジヌクレオチド、例えば環状ジ-GMP (c d GMP)、環状ジ-AMP (c d AMP) またはその組合せを含み、例えば、前記 S T I N G アゴニストは、前記多重特異性または多機能性分子ポリペプチドに共有結合される、項目 6 7 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

10

(項目 7 0)

前記サイトカイン分子は、インターロイキン-2 (I L - 2)、インターロイキン-7 (I L - 7)、インターロイキン-12 (I L - 12)、インターロイキン-15 (I L - 15)、インターロイキン-18 (I L - 18)、インターロイキン-21 (I L - 21)、またはインターフェロン γ 、またはその断片もしくは変異体、あるいは上記のサイトカインのいずれかの組合せから選択される、項目 1 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 7 1)

前記サイトカイン分子は、モノマーまたは二量体である、項目 7 0 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

20

(項目 7 2)

前記サイトカイン分子は、受容体二量体化ドメイン、例えば I L 1 5 R α 二量体化ドメインをさらに含む、項目 7 0 または 7 1 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 7 3)

前記サイトカイン分子（例えば、I L - 1 5）および受容体二量体化ドメイン（例えば、I L 1 5 R α 二量体化ドメイン）は、共有結合されず、例えば非共有結合的に結合される、項目 7 0 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

30

(項目 7 4)

前記間質調節部分は、間質または細胞外基質 (E C M) 成分のレベルもしくは産生の減少；腫瘍線維化の減少；間質腫瘍輸送の増加；腫瘍灌流の改善；腫瘍微小血管系の拡張；腫瘍における間質液圧 (I F P) の低下または腫瘍もしくは腫瘍血管系への薬剤、例えば癌治療薬もしくは細胞療法薬の浸透もしくは拡散の減少もしくは促進の 1 つまたは複数を引き起こす、項目 1 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 7 5)

減少される前記間質または E C M 成分は、グリコサミノグリカンもしくは細胞外タンパク質またはその組合せから選択される、項目 7 4 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

40

(項目 7 6)

前記グリコサミノグリカンは、ヒアルロナン（ヒアルロン酸または H A としても知られている）、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、エンタクチン、テネシシン、アグリカンおよびケラチン硫酸から選択される、項目 7 5 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 7 7)

前記細胞外タンパク質は、コラーゲン、ラミニン、エラスチン、フィブリノゲン、フィブロネクチンまたはビトロネクチンから選択される、項目 7 5 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

50

(項目 7 8)

前記間質調節部分は、腫瘍間質または細胞外基質（E C M）を分解する酵素分子を含む、項目 1 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 7 9)

前記酵素分子は、ヒアルロニダーゼ分子、コラゲナーゼ分子、コンドロイチナーゼ分子、マトリックスメタロプロテイナーゼ分子（例えば、マクロファージメタロエラスターゼ）または上記のいずれかの変異体（例えば、断片）から選択される、項目 1 ～ 7 8 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 8 0)

前記間質調節部分は、ヒアルロン酸のレベルまたは産生を減少させる、項目 1 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

10

(項目 8 1)

前記間質調節部分は、ヒアルロナン分解酵素、ヒアルロナン合成を阻害する薬剤またはヒアルロン酸に対する抗体分子を含む、項目 1 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 8 2)

前記ヒアルロナン分解酵素は、ヒアルロニダーゼ分子またはその変異体（例えば、その断片）である、項目 8 1 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 8 3)

前記ヒアルロナン分解酵素は、中性または酸性 p H、例えば約 4 ～ 5 の p H で活性である、項目 8 1 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

20

(項目 8 4)

前記ヒアルロニダーゼ分子は、哺乳動物ヒアルロニダーゼ分子、例えば組み換えヒトヒアルロニダーゼ分子またはその変異体（例えば、その切断型）である、項目 8 2 または 8 3 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 8 5)

前記ヒアルロニダーゼ分子は、H Y A L 1、H Y A L 2 もしくは P H - 2 0 / S P A M 1 またはその変異体（例えば、その切断型）から選択される、項目 8 4 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 8 6)

前記切断型は、C 末端グリコシルホスファチジルイノシトール（G P I）付着部位または前記 G P I 付着部位の一部を欠いている、項目 8 4 または 8 5 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

30

(項目 8 7)

前記ヒアルロニダーゼ分子は、グリコシル化され、例えば少なくとも 1 つの N - 結合グリカンを含む、項目 8 2 ～ 8 6 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 8 8)

前記ヒアルロニダーゼ分子は、配列番号 6 1 のアミノ酸配列またはその断片、あるいはそれと実質的に同一である（例えば、それと 9 5 % ～ 9 9 . 9 % 同一であるか、または配列番号 6 1 の前記アミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 もしくは 1 5 個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む、項目 8 2 ～ 8 7 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

40

(項目 8 9)

前記ヒアルロニダーゼ分子は、

(i) 配列番号 6 1 の 3 6 - 4 6 4 のアミノ酸配列；

(i i) 配列番号 6 1 に記載されるアミノ酸の配列を有する P H 2 0 の 3 6 - 4 8 1、3 6 - 4 8 2 または 3 6 - 4 8 3 のアミノ酸配列；または

(i i i) 配列番号 6 1 に記載されるアミノ酸の配列のポリペプチドまたは切断型に対

50

する少なくとも95%～100%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または

(iv) 配列番号61に記載される前記アミノ酸配列に対する30、20、10、5個またはそれよりも少ないアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む、項目82～88のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目90)

前記ヒアルロニダーゼ分子は、配列番号61の前記アミノ酸配列に対して少なくとも95%（例えば、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、100%）同一のアミノ酸配列を含む、項目82～88のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目91)

前記ヒアルロニダーゼ分子は、配列番号61のヌクレオチド配列に対して少なくとも95%（例えば、少なくとも96%、97%、98%、99%、100%）同一のヌクレオチド配列によってコードされる、項目82～88のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目92)

前記ヒアルロニダーゼ分子は、PH20、例えばrHuPH20である、項目82～88のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目93)

前記ヒアルロニダーゼ分子は、HYAL1であり、かつ配列番号62のアミノ酸配列またはその断片、あるいはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号62の前記アミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10もしくは15個以下の改変（例えば、置換、欠失もしくは挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む、項目82～87のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目94)

前記ヒアルロナン分解酵素、例えば前記ヒアルロニダーゼ分子は、ポリマーをさらに含み、例えば、ポリマー、例えばPEGにコンジュゲートされる、項目82～93のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目95)

前記ヒアルロナン分解酵素は、PEG化PH20酵素（PEGPH20）である、項目94に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目96)

前記ヒアルロナン分解酵素、例えば前記ヒアルロニダーゼ分子は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4の重鎖定常領域、より特定のヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4の重鎖定常領域から選択される免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）をさらに含む、項目82～93のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目97)

前記免疫グロブリン定常領域（例えば、前記Fc領域）は、前記ヒアルロナン分解酵素、例えば前記ヒアルロニダーゼ分子に結合され、例えば共有結合される、項目96に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目98)

前記免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）は、Fc受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基の数、エフェクター細胞機能または補体機能の1つまたは複数を増加または減少させるように改変され、例えば変異される、項目96または97に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目99)

前記ヒアルロナン分解酵素、例えば前記ヒアルロニダーゼ分子は、二量体を形成する、項目82～93のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

10

20

30

40

50

(項目 1 0 0)

前記間質調節部分は、ヒアルロナン、例えば H A シンターゼの合成の阻害剤を含む、項目 1 ～ 8 1 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 0 1)

前記阻害剤は、H A シンターゼに対するセンスもしくはアンチセンス核酸分子を含むか、または小分子薬剤である、項目 1 0 0 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 0 2)

前記阻害剤は、4-メチルウンベリフェロン (M U) もしくはその誘導体 (例えば、6, 7-ジヒドロキシ-4-メチルクマリニンもしくは 5, 7-ジヒドロキシ-4-メチルクマリニン) またはレフルノミドもしくはその誘導体である、項目 1 0 1 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 0 3)

前記間質調節部分は、コラゲナーゼ分子、例えば哺乳動物コラゲナーゼ分子またはその変異体 (例えば、断片) を含む、項目 1 ～ 8 1 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 0 4)

前記コラゲナーゼ分子は、例えば、(配列番号 6 3 のアミノ酸配列またはその断片、あるいはそれと実質的に同一である (例えば、それと 9 5 % ～ 9 9 . 9 % 同一であるか、または配列番号 6 3 の前記アミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、1 0 もしくは 1 5 個以下の改変 (例えば、置換、欠失もしくは挿入、例えば保存的置換) を有するアミノ酸配列を含むコラゲナーゼ分子 I V である、項目 1 0 3 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 0 5)

2 つの結合特異性または機能を含み、例えば、例として、

i) 前記腫瘍標的化部分および前記免疫細胞エンゲージャであって、ただし、前記多重特異性分子が前記腫瘍標的化部分および前記免疫細胞エンゲージャのみを含む場合、前記免疫細胞エンゲージャは、N K 細胞抗原に対する抗体分子でない、前記腫瘍標的化部分および前記免疫細胞エンゲージャ；または

i i) 前記腫瘍標的化部分および前記間質調節部分を含む二重特異性または二機能性分子である、項目 1 ～ 1 0 4 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 0 6)

3 つまたは 4 つの結合特異性または機能を含み、例えば、三重特異性または四重特異性分子である、項目 1 ～ 1 0 4 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 0 7)

(i) 少なくとも 2 つの腫瘍標的化部分、前記免疫細胞エンゲージャおよび前記サイトカイン分子；

(i i) 前記腫瘍標的化部分、前記免疫細胞エンゲージャおよび前記間質調節部分；または

(i i i) メソテリン、P D L 1、H E R 3、線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) もしくはインスリン成長因子 1 R (I G F 1 R)、C D 4 7 または C D 1 2 3 から選択される 2 つの癌抗原であって、ただし、F A P および I G F 1 R でない 2 つの癌抗原に結合する少なくとも 2 つの腫瘍標的化部分およびサイトカイン分子を含む、項目 1 ～ 1 0 4 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 0 8)

(i) 1 つの腫瘍標的化部分と；

(i i) 2 つの免疫細胞エンゲージャ (例えば、同じかまたは異なる免疫細胞エンゲー

10

20

30

40

50

ジャ)と；

(i i i) 1つのサイトカイン分子、または

(i v) 1つの間質調節部分

の一方または両方と

を含む、項目 1 ～ 1 0 4 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 0 9)

(i) 2つの腫瘍標的化部分 (例えば、同じかまたは異なる標的化部分)と；

(i i) 1つの免疫細胞エンゲージャと；

(i i i) 1つのサイトカイン分子、または

(i v) 1つの間質調節部分

の一方または両方と

を含む、項目 1 ～ 1 0 4 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 1 0)

(i) 1つの腫瘍標的化部分と；

(i i) 1つの免疫細胞エンゲージャと；

(i i i) 2つのサイトカイン分子 (例えば、同じかまたは異なるサイトカイン分子)

の一方または両方と

を含む、項目 1 ～ 1 0 4 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 1 1)

前記 2つの腫瘍標的化部分の 1つは、P D L 1に結合し；前記 2つの腫瘍標的化部分の 1つは、メソテリンに結合し；前記免疫細胞エンゲージャは、N K p 4 6またはN K p 3 0に結合し；かつ前記サイトカイン分子は、I L 2である、項目 1 0 9に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 1 2)

前記腫瘍標的化部分もしくは前記免疫細胞エンゲージャまたは両方は、(i) 抗体分子、例えば少なくとも 1つの免疫グロブリンドメインおよび／あるいは (i i) 受容体もしくはリガンドまたはその断片を含む、項目 1 ～ 1 1 1 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 1 3)

前記腫瘍標的化抗体分子は、約 1 0 n M未満、より典型的には 1 0 ～ 1 0 0 p Mの解離定数で前記固形腫瘍抗原および／または前記間質抗原に結合する、項目 1 1 2に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 1 4)

前記免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、約 1 0 n M未満、より典型的には 1 0 ～ 1 0 0 p Mの解離定数で前記N K細胞抗原、前記B細胞抗原、前記樹枝状細胞抗原および／または前記マクロファージ細胞抗原に結合する、項目 1 1 2に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 1 5)

前記腫瘍標的化抗体分子は、前記腫瘍抗原または前記間質抗原上の立体構造または線形エпитープに結合する、項目 1 1 2に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 1 6)

前記免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、前記N K細胞抗原、前記B細胞抗原、前記樹枝状細胞抗原および／または前記マクロファージ細胞抗原上の立体構造または線形エпитープに結合する、項目 1 1 4に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 1 7)

前記腫瘍標的化抗体分子は、単一特異性抗体分子、二重特異性抗体分子または三重特異性抗体分子である、項目 1 1 2に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

10

20

30

40

50

(項目 1 1 8)

前記腫瘍標的化抗体分子は、一価抗体分子、二価抗体分子または三価抗体分子である、項目 1 1 2 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 1 9)

前記免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、単一特異性、二重特異性抗体分子または三重特異性抗体である、項目 1 1 6 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 2 0)

前記免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、一価、二価または三価抗体である、項目 1 1 6 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 2 1)

前記腫瘍標的化抗体分子および／または免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、完全抗体（例えば、少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つの完全な重鎖および少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つの完全な軽鎖を含む抗体）または抗原結合断片（例えば、F a b、F (a b')₂、F v、一本鎖 F v、単ドメイン抗体、ダイアボディ (d A b)、二価抗体もしくは二重特異性抗体またはその断片、その単ドメイン変異体、あるいはラクダ科抗体）である、項目 1 1 2 ～ 1 2 0 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 2 2)

前記腫瘍標的化抗体分子および免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、独立して、完全抗体（例えば、少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つの完全な重鎖および少なくとも 1 つ、好ましくは 2 つの完全な軽鎖を含む抗体）または抗原結合断片（例えば、F a b、F (a b')₂、F v、一本鎖 F v 断片、単ドメイン抗体、ダイアボディ (d A b)、二価抗体もしくは二重特異性抗体またはその断片、その単ドメイン変異体、あるいはラクダ科抗体）である、項目 1 1 2 ～ 1 2 0 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 2 3)

前記腫瘍標的化抗体分子および／または免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、I g G 1、I g G 2、I g G 3 もしくは I g G 4 から選択される重鎖定常領域またはその断片を含む、項目 1 2 2 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 2 4)

前記腫瘍標的化抗体分子および／または免疫細胞エンゲージャ抗体分子は、κ もしくは λ の軽鎖定常領域から選択される軽鎖定常領域またはその断片を含む、項目 1 2 2 または 1 2 3 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 2 5)

前記腫瘍標的化部分もしくは前記免疫細胞エンゲージャまたは両方は、前記腫瘍抗原および／もしくは前記間質抗原、または前記 N K 細胞抗原、前記 B 細胞抗原、前記樹枝状細胞抗原および／もしくは前記マクロファージ細胞抗原に結合する受容体もしくは受容体断片またはリガンドもしくはリガンド断片を含む、項目 1 1 2 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 2 6)

I g G 1、I g G 2 および I g G 4 の前記重鎖定常領域、より具体的にヒト I g G 1、I g G 2 または I g G 4 の前記重鎖定常領域から選択される免疫グロブリン定常領域（例えば、F c 領域）をさらに含む、項目 1 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 2 7)

前記免疫グロブリン定常領域（例えば、F c 領域）は、前記腫瘍標的化部分、前記免疫細胞エンゲージャまたは前記サイトカイン分子の 1 つまたは複数に結合され、例えば共有結合される、項目 1 2 6 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 2 8)

前記免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、F c 領域）は、F c 受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基の数、エフェクター細胞機能または補体機能の 1 つまたは複数を

10

20

30

40

50

増加または減少させるように改変され、例えば変異される、項目 1 2 6 または 1 2 7 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 2 9)

前記腫瘍標的化部分または免疫細胞エンゲージャは、 κ もしくは λ の前記軽鎖定常領域から選択される軽鎖定常領域またはその断片を含む、項目 1 ～ 1 2 8 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 3 0)

第 1 の腫瘍標的化部分および第 2 の腫瘍標的化部分を含み、前記第 1 の腫瘍標的化部分は、 κ 軽鎖定常領域またはその断片を含み、かつ前記第 2 の腫瘍標的化部分は、 λ 軽鎖定常領域またはその断片を含む、項目 1 2 9 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 3 1)

第 1 の腫瘍部分および第 2 の腫瘍標的化部分を含み、前記第 1 の腫瘍標的化部分および前記第 2 の腫瘍標的化部分は、共通の軽鎖可変領域を含む、項目 1 ～ 1 2 8 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 3 2)

前記免疫グロブリン定常領域（例えば、F c 領域）は、腫瘍標的化部分、前記免疫細胞エンゲージャ、前記サイトカイン分子または前記間質調節部分の 1 つまたは複数に結合され、例えば共有結合される、項目 1 ～ 1 2 8 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 3 3)

第 1 および第 2 の免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、F c 領域）のインターフェースは、例えば、非改変インターフェースと比べて二量体化を増加または減少させるように改変され、例えば変異される、項目 1 ～ 1 3 2 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 3 4)

前記免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、F c 領域）の二量体化は、例えば、非改変インターフェースと比べてヘテロ多量体：ホモ多量体のより高い比率が生じるように、第 1 および第 2 の F c 領域の F c インターフェースに、対になった空洞－突起（「ノブ・イン・ホール」）、静電相互作用または鎖交換の 1 つまたは複数を提供することによって促進される、項目 1 3 3 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 3 5)

前記免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、F c 領域）は、例えば、ヒト Ig G 1 の前記 F c 領域の 3 4 7、3 4 9、3 5 0、3 5 1、3 6 6、3 6 8、3 7 0、3 9 2、3 9 4、3 9 5、3 9 7、3 9 8、3 9 9、4 0 5、4 0 7 または 4 0 9 の 1 つまたは複数から選択される位置にアミノ酸置換を含む、項目 1 3 3 または 1 3 4 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 3 6)

前記免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、F c 領域）は、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A もしくは Y 4 0 7 V（例えば、空洞もしくはホールに対応する）または T 3 6 6 W（例えば、突起もしくはノブに対応する）あるいはその組合せから選択されるアミノ酸置換を含む、項目 1 3 3 ～ 1 3 5 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 3 7)

リンカー、例えば前記標的化部分および前記サイトカイン分子もしくは前記間質調節部分、前記標的化部分および前記免疫細胞エンゲージャ、前記サイトカイン分子もしくは前記間質調節部分および前記免疫細胞エンゲージャ、前記サイトカイン分子もしくは前記間質調節部分および前記免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、前記 F c 領域）、前記標的化部分および前記免疫グロブリン鎖定常領域、または前記免疫細胞エンゲージャおよび前記免疫グロブリン鎖定常領域の 1 つまたは複数間のリンカーをさらに含む、項目 1 ～ 1 3 6 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

10

20

30

40

50

(項目 1 3 8)

前記リンカーは、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、ペプチドリinker、フレキシブルリンカー、剛性リンカー、らせん状リンカーまたは非らせん状リンカーから選択される、項目 1 3 7 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 3 9)

前記リンカーは、ペプチドリinkerである、項目 1 3 8 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 4 0)

前記ペプチドリinkerは、G l y および S e r を含む、項目 1 3 9 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 4 1)

第 1 および第 2 の非隣接ポリペプチドを含む二重特異性分子であり、

(i) 前記第 1 のポリペプチドは、例えば、N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、サイトカイン分子、間質調節部分または免疫細胞エンゲージャに連結される、例えば癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば抗体分子（例えば、第 1 の抗原ドメインの第 1 の部分、例えば F a b 分子の第 1 の V H - C H 1 ）、例えば抗体分子、例えば免疫細胞抗原に結合する s c F v を含む；および

(i i) 前記第 2 のポリペプチドは、例えば、N から C の配向で、例えば癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原（例えば、前記第 1 の V H - C H 1 によって結合される同じ腫瘍または間質抗原）に結合する前記第 1 の抗原ドメインの第 2 の部分、例えば前記 F a b の第 1 の V L - C L を含む、項目 1 ~ 1 4 0 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 4 2)

第 1 および第 2 の非隣接ポリペプチドを含む二重特異性分子であり、

(i) 前記第 1 のポリペプチドは、例えば、N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、前記第 1 および第 2 のポリペプチド間の結合を促進する第 1 のドメイン（例えば、第 1 の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第 1 の F c 分子）に連結される、例えば癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば抗体分子（例えば、第 1 の抗原ドメインの第 1 の部分、例えば F a b 分子の第 1 の V H - C H 1 ）を含む；

(i i) 前記第 2 のポリペプチドは、例えば、N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、前記第 1 および第 2 のポリペプチド間の結合を促進する第 2 のドメイン（例えば、第 2 の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第 2 の F c 分子）に連結されるサイトカイン分子、間質調節部分または免疫細胞エンゲージャ（例えば、抗体分子、例えば免疫細胞抗原に結合する s c F v ）を含む；および

(i i i) 前記第 3 のポリペプチドは、例えば、N から C の配向で、前記癌抗原に結合する前記第 1 の抗原ドメインの第 2 の部分、例えば前記 F a b の第 1 の V L - C L を含む、項目 1 ~ 1 4 0 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 4 3)

第 1、第 2 および第 3 の非隣接ポリペプチドを含む三重特異性分子であり、

(i) 前記第 1 のポリペプチドは、例えば、N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、前記第 1 および第 2 のポリペプチド間の結合を促進する第 1 のドメイン（例えば、第 1 の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第 1 の F c 分子）に連結される、例えば癌抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば抗体分子（例えば、第 1 の抗原ドメインの第 1 の部分、例えば F a b 分子の第 1 の V H - C H 1 ）を含む；

(i i) 前記第 2 のポリペプチドは、例えば、N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、前記第 1 および第 2 のポリペプチド間の結合を促進する第 2 のドメイン（例えば、第 2 の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第 2 の F c 分子）に連結されるサイトカイン分子、間質調節部分または免疫細胞エンゲージャ（例えば、抗体分子、例えば免疫細胞抗原に結合する s c F v ）を含む；および

10

20

30

40

50

(i i i) 前記第 3 のポリペプチドは、例えば、N から C の配向で、前記癌抗原に結合する前記第 1 の抗原ドメインの第 2 の部分、例えば前記 F a b の第 1 の V L - C L を含み、前記第 1 または第 2 のポリペプチドのいずれかは、前記第 1 または第 2 の免疫グロブリン定常ドメインの C 末端に任意選択的に共有結合されるサイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャをさらに含む、項目 1 ～ 1 4 0 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 4 4)

第 1、第 2 および第 3 の非隣接ポリペプチドを含む四重特異性分子であり、

(i) 前記第 1 のポリペプチドは、例えば、N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、前記第 1 および第 2 のポリペプチド間の結合を促進する第 1 のドメイン（例えば、第 1 の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第 1 の F c 分子）に連結される、例えば癌抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば抗体分子（例えば、第 1 の抗原ドメインの第 1 の部分、例えば F a b 分子の第 1 の V H - C H 1）を含み；

(i i) 前記第 2 のポリペプチドは、例えば、N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、前記第 1 および第 2 のポリペプチド間の結合を促進する第 2 のドメイン（例えば、第 2 の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第 2 の F c 分子）に連結されるサイトカイン分子、間質調節部分または免疫細胞エンゲージャ（例えば、抗体分子、例えば免疫細胞抗原に結合する s c F v）を含み；および

(i i i) 前記第 3 のポリペプチドは、例えば、N から C の配向で、前記癌抗原に結合する前記第 1 の抗原ドメインの第 2 の部分、例えば前記 F a b の第 1 の V L - C L を含み、前記第 1 および第 2 のポリペプチドは、前記第 1 または第 2 の免疫グロブリン定常ドメインの C 末端に任意選択的に共有結合されるサイトカイン分子および／または免疫細胞エンゲージャをさらに含む、項目 1 ～ 1 4 0 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 4 5)

a) 第 1 のポリペプチドであって、

前記第 1 および第 2 のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えば F c 分子と；腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャ；間質調節部分およびサイトカイン分子から選択される 2 つのポリペプチドとを含む第 1 のポリペプチドと、

b) 第 2 のポリペプチドであって、

前記第 1 および第 2 のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えば F c 分子と；腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子から選択される 2 つのポリペプチドとを含む第 2 のポリペプチドとを含み、腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャ；間質調節部分およびサイトカイン分子を含む、項目 1 ～ 1 4 0 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 4 6)

腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャおよび 2 つのサイトカイン分子または 2 つの間質調節部分；

腫瘍標的化部分；2 つの免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子または間質調節部分；または

2 つの腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子または間質調節部分

を含む、項目 1 4 5 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 4 7)

2 つの腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子を含み、前記 2 つの腫瘍標的化部分の 1 つは、P D L 1 に結合する抗体分子であり；前記 2 つの腫瘍標的化部分の 1 つは、メソテリンに結合し；前記免疫細胞エンゲージャは、N K p 4 6 または

N K p 3 0 に結合し；かつ前記サイトカインは、I L 2 である、項目 1 4 6 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 4 8)

i) 第 1 のポリペプチドは、例えば、N - C または C - N 方向に、腫瘍標的化部分；前記第 1 および第 2 のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えば F c 分子ならびに免疫細胞エンゲージャを含むこと；

i i) 第 1 のポリペプチドは、例えば、N - C または C - N 方向に、腫瘍標的化部分；前記第 1 および第 2 のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えば F c 分子ならびにサイトカイン分子または間質調節部分を含むこと；または

i i i) 第 1 のポリペプチドは、例えば、N - C または C - N 方向に、サイトカイン；前記第 1 および第 2 のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えば F c 分子ならびに免疫細胞エンゲージャを含むこと；および

i v) 第 2 のポリペプチドは、例えば、N - C または C - N 方向に、腫瘍標的化部分；前記第 1 および第 2 のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えば F c 分子ならびに免疫細胞エンゲージャを含むこと；

i i) 第 2 のポリペプチドは、例えば、N - C または C - N 方向に、腫瘍標的化部分；前記第 1 および第 2 のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えば F c 分子ならびにサイトカイン分子または間質調節部分を含むこと；または

i i i) 第 2 のポリペプチドは、例えば、N - C または C - N 方向に、サイトカイン；前記第 1 および第 2 のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えば F c 分子ならびに免疫細胞エンゲージャを含むこと

を含む、項目 1 4 6 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 4 9)

(i) 前記腫瘍標的化部分は、

(i a) P D L 1、メソテリン、H E R 3、I G F - 1 R、G D 2、P M S A、C E A、R o n キナーゼもしくは c - M e t から選択される固形腫瘍抗原に対する抗体分子；および／または

(i b) F A P、ヒアルロン酸、コラーゲン I V、テネイシン C もしくはテネイシン W から選択される間質抗原に対する抗体分子；あるいは

前記固形腫瘍抗原に対する前記抗体分子と、前記間質抗原に対する前記抗体分子との組合せと；

(i i)

(i i a) C D 4 0 L もしくは C D 7 0 リガンド；C D 4 0 もしくは C D 7 0 に結合する抗体分子；O X 4 0 に対する抗体分子；O X 4 0 L；B 7 - H 6 または S T I N G アゴニストあるいはその組合せの 1 つ、2 つ、3 つまたは全てから選択される前記免疫細胞エンゲージャ；

(i i b) I L - 2、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 8、I L - 7 もしくは I L - 2 1、その断片もしくは変異体または上記のサイトカイン分子のいずれかの組合せから選択される前記サイトカイン分子；

(i i c) ヒアルロニダーゼまたはゼラチナーゼから選択される前記間質調節部分の 1 つ、2 つまたは全てと

を含む、項目 1 ~ 1 4 8 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 5 0)

メソテリン、例えばヒトメソテリンに対する抗体分子；C D 4 0 L ポリペプチドおよび I L - 1 5 または I L - 2 分子を含む、項目 1 4 9 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 5 1)

前記抗体分子は、軽鎖および重鎖を有する、メソテリンに対する F a b を含む、項目 1 5 0 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

10

20

30

40

50

(項目 1 5 2)

メソテリンに対する前記 F a b の前記重鎖は、前記 I L - 1 5 または I L - 2 分子、例えばヒト I L - 1 5 分子をさらに含み、任意選択的に、前記 F a b および前記 I L - 1 5 または I L - 2 分子は、例えば、G l y および S e r を含むリンカーを介して結合される、項目 1 5 1 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 5 3)

以下の立体配置：N 末端から C 末端に、メソテリンに対する前記 F a b の重鎖（例えば、V H - C H 1）から I L - 1 5 または I L - 2 を有し、任意選択的に、前記 F a b および前記 I L - 1 5 または I L - 2 間の G l y - S e r リンカーを含む、項目 1 5 2 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

10

(項目 1 5 4)

メソテリンに対する前記 F a b の前記軽鎖は、C D 4 0 L をさらに含み、任意選択的に、前記 F a b および前記 C D 4 0 L は、例えば、G l y および S e r を含むリンカーを介して結合される、項目 1 5 0 ~ 1 5 3 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 5 5)

以下の立体配置：N 末端から C 末端に、C D 4 0 L に融合されたメソテリンに対する前記 F a b の軽鎖（例えば、V L - C L 1）を有し、任意選択的に、前記 F a b および前記 C D 4 0 L 間の G l y - S e r リンカーを含む、項目 1 5 4 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

20

(項目 1 5 6)

F A P、例えばヒト F A P に対する抗体分子および I L - 1 5 または I L - 2 分子を含む、項目 1 4 9 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 5 7)

前記抗体分子は、軽鎖および重鎖を有する、F A P に対する F a b を含む、項目 1 5 6 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 5 8)

F A P に対する前記 F a b の前記重鎖は、前記第 1 の F c 領域の前記 F c インターフェース中の対になった空洞 - 突起（ノブ・イン・ホール）のメンバーを有する第 1 の F c 領域をさらに含む、項目 1 5 7 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

30

(項目 1 5 9)

以下の立体配置：N 末端から C 末端に、第 1 の F c 領域（例えば、C H 2 から C H 3）に融合された F A P の前記 F a b の重鎖（例えば、V H - C H 1）を有する、項目 1 5 8 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 6 0)

前記 I L - 1 5 または I L - 2 分子、例えばヒト I L - 1 5 または I L - 2 分子は、例えば、G l y および S e r を含むリンカーを介して連結される、前記第 2 の F c 領域の前記 F c インターフェース中の対になった空洞 - 突起（ノブ・イン・ホール）の第 2 のメンバーを有する第 2 の F c 領域をさらに含む、項目 1 5 6 ~ 1 5 9 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

40

(項目 1 6 1)

以下の立体配置：N 末端から C 末端に、I L - 1 5 または I L - 2 分子 - 第 2 の F c 領域（例えば、C H 2 から C H 3）を有し、例えば、前記 I L - 1 5 または I L - 2 分子および前記第 2 の F c 領域は、G l y および S e r を含むリンカーを介して連結される、項目 1 6 0 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 6 2)

免疫細胞エンゲージをさらに含む、項目 1 5 6 ~ 1 6 1 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 6 3)

前記免疫細胞エンゲージは、C D 4 0 リガンドを含む、項目 1 6 2 に記載の多重特異

50

性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 6 4)

前記免疫細胞エンハンサーは、前記対になった空洞－突起（ノブ・イン・ホール）の前記第 2 のメンバーおよび前記 I L - 1 5 または I L - 2 分子、例えばヒト I L - 1 5 または I L - 2 分子を有する前記第 2 の F c 領域に結合され、例えば共有結合され、任意選択的に、前記 I L - 1 5 もしくは I L - 2 分子と前記第 2 の F c 領域との間および／または前記第 2 の F c 領域と前記免疫細胞エンハンサーとの間に、G l y および S e r を含むリンカーを含む、項目 1 6 2 または 1 6 3 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 6 5)

以下の立体配置：N 末端から C 末端に、I L - 1 5 または I L - 2 分子－第 2 の F c 領域（例えば、C H 2 から C H 3）－免疫細胞エンハンサーを有し、任意選択的に、前記 I L - 1 5 もしくは I L - 2 分子と前記第 2 の F c 領域との間および／または前記第 2 の F c 領域と前記免疫細胞エンハンサーとの間に、G l y および S e r を含むリンカーを含む、項目 1 6 4 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 6 6)

第 2 の免疫細胞エンハンサーをさらに含む、項目 1 5 6 ～ 1 6 5 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 6 7)

前記第 2 の免疫細胞エンハンサーは、B 7 H 6 分子を含む、項目 1 6 6 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 6 8)

前記第 2 の免疫細胞エンハンサーは、前記第 1 の F c 領域の前記 F c インターフェース中の前記対になった空洞－突起（ノブ・イン・ホール）の前記第 1 のメンバーおよび前記 F a b の前記重鎖を有する前記第 1 の F c 領域に結合され、例えば共有結合され、任意選択的に、前記 B 7 H 6 分子および前記第 1 の F c 領域間に、G l y および S e r を含むリンカーを含む、項目 1 6 6 または 1 6 7 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 6 9)

固形腫瘍抗原または間質抗原に対する標的化抗体分子および少なくとも 2 つの免疫細胞エンハンサーを含む、項目 1 4 9 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 7 0)

前記抗体分子は、メソテリンまたは F A P に結合する、項目 1 6 9 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 7 1)

前記免疫細胞エンハンサーは、T L R アゴニスト（例えば、T L R 9 アゴニスト）または S T I N G アゴニストおよび O X 4 0 に対する抗体分子である、項目 1 6 9 または 1 7 0 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 7 2)

前記 S T I N G アゴニストは、任意選択的に、2'、5' または 3'、5' リン酸塩結合とともに環状ジヌクレオチド、例えば環状ジ-GMP（c d GMP）、環状ジ-AMP（c d AMP）またはその組合せを含み、任意選択的に、前記 S T I N G アゴニストは、前記標的化抗体または前記免疫細胞エンハンサーに結合される（例えば、直接コンジュゲートされる）、項目 1 7 1 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 7 3)

前記 T L R アゴニストは、非メチル化 C p G 配列を含む、項目 1 7 1 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 7 4)

メソテリンまたは F A P に対する第 1 の結合特異性および O X 4 0 に対する第 2 の結合特異性を有する二重特異性抗体を含む、項目 9 2 ～ 9 6 のいずれか一項に記載の多重特異

10

20

30

40

50

性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 1 7 5)

項目 1 ～ 1 7 4 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドをコードする単離核酸分子。

(項目 1 7 6)

(i) 項目 1 ～ 1 7 4 のいずれか一項に記載の腫瘍標的化部分；

(i i) 項目 1 ～ 1 7 4 のいずれか一項に記載の免疫細胞エンゲージャ；

(i i i) 項目 1 ～ 1 7 4 のいずれか一項に記載のサイトカイン分子；および

(i v) 任意選択的に、項目 1 3 7 ～ 1 7 4 のいずれか一項に記載のリンカーの 1 つまたは複数をコードする単離核酸分子。

(項目 1 7 7)

本明細書に記載される前記多重特異性もしくは多機能性分子のいずれかをコードする前記ヌクレオチド配列またはそれと実質的に相同である（例えば、それと少なくとも 9 5 % ～ 9 9 . 9 % 同一である）ヌクレオチド配列を含む単離核酸分子。

(項目 1 7 8)

項目 1 7 5 ～ 1 7 7 のいずれか一項に記載の核酸分子の 1 つまたは複数を含むベクター、例えば発現ベクター。

(項目 1 7 9)

項目 1 7 5 ～ 1 7 8 のいずれか一項に記載の核酸分子またはベクターを含む宿主細胞。

(項目 1 8 0)

項目 1 ～ 1 7 4 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドを作製、例えば産生する方法であって、好適な条件、例えば遺伝子発現および／またはホモ二量体化もしくはヘテロ二量体化に好適な条件下において、項目 1 7 9 に記載の宿主細胞を培養することを含む方法。

(項目 1 8 1)

項目 1 ～ 1 7 4 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドと、薬学的に許容できる担体、賦形剤または安定剤とを含む医薬組成物。

(項目 1 8 2)

癌を治療する方法であって、それを必要とする対象に、項目 1 ～ 1 7 4 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチドを投与することを含み、前記多重特異性抗体は、前記癌を治療するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 1 8 3)

前記癌は、固形腫瘍癌または転移性病変である、項目 1 8 2 に記載の方法。

(項目 1 8 4)

前記固形腫瘍癌は、膵臓癌（例えば、膵臓腺癌）、乳癌、大腸癌、肺癌（例えば、小細胞または非小細胞肺癌）、皮膚癌、卵巣癌または肝臓癌の 1 つまたは複数である、項目 1 8 3 に記載の方法。

(項目 1 8 5)

前記癌は、血液癌である、項目 1 8 2 に記載の方法。

(項目 1 8 6)

第 2 の治療処置を投与することをさらに含む、項目 1 8 2 ～ 1 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 8 7)

前記第 2 の治療処置は、治療剤（例えば、化学療法剤、生物剤、ホルモン療法）、放射線または手術を含む、項目 1 8 6 に記載の方法。

(項目 1 8 8)

前記治療剤は、化学療法剤または生物剤から選択される、項目 1 8 7 に記載の方法。

(項目 1 8 9)

前記第 1 の腫瘍標的化部分は、C D 1 2 3 に結合し、前記第 2 の腫瘍標的化部分は、C D 4 7 に結合し、かつ前記 T 細胞エンゲージャは、C D 3 アゴニストであるかまたはそれ

10

20

30

40

50

を含む、項目 6 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 190)

前記免疫細胞エンゲージャは、T 細胞への結合および T 細胞の活性化を媒介する T 細胞エンゲージャを含む、項目 1～54 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 191)

前記免疫細胞エンゲージャは、T 細胞への結合を媒介するが、T 細胞の活性化を媒介しない T 細胞エンゲージャを含む、項目 1～54 のいずれか一項に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

(項目 192)

前記 T 細胞エンゲージャは、CD3、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR ζ 、ICOS、CD28、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、SLAM、CD2 または CD226 に結合する、項目 190 または 191 に記載の多重特異性または多機能性分子ポリペプチド。

【図面の簡単な説明】

【0181】

【図 1A-1C】単一のポリペプチド鎖、例えば scFv フォーマットを含む多重特異性分子の概略図を示す。二重特異性および三重特異性分子は、scFv コアを含み得る。パートナー A は、任意選択的にリンカーによって連結される VH の N 末端または VL の C 末端（それぞれ図 1A または図 1B）に連結され得、パートナー A は、二重特異性フォーマット中の結合部分 2 に対応する。パートナー A は、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）または Fab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、結合部分 1 および結合部分 2 は、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、T 細胞エンゲージャ、NK 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択され得る。ある実施形態において、結合部分 1 は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分、例えば癌抗原に結合する scFv であり；結合部分 2 に対応するパートナー A は、例えば、本明細書に記載されるサイトカイン分子、T 細胞エンゲージャ、NK 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択され得る。三重特異性フォーマットの実施形態において、パートナー A および B は、それぞれ結合部分 2 および 3 として、例えばリンカーを介して scFv に結合される（図 1C）。パートナー A およびパートナー B は、独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）または Fab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、結合部分 1、結合部分 2 および結合部分 3 は、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、T 細胞エンゲージャ、NK 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択され得る。ある実施形態において、結合部分 1 は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分、例えば癌抗原に結合する scFv であり；パートナー A および B は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるサイトカイン分子、T 細胞エンゲージャ、NK 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。パートナー A は、例えば、本明細書に記載される間質調節部分であり得る。ある実施形態において、結合部分 1 は、腫瘍標的化部分であり、結合部分 2 は、間質調節部分である。ある実施形態において、結合部分 1 は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分、例えば癌抗原に結合する scFv であり；結合部分 2 に対応するパートナー A は、例えば、本明細書に記載される間質調節部分である。三重特異性フォーマットの実施形態において、パートナー A および B は、それぞれ結合部分 2 および 3 として例えばリンカーを介して scFv に結合される（図 1C）。三重特異性分子は、融合パートナー B、サイトカイン分子、T 細胞エンゲージャ、NK 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、

10

20

30

40

50

樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージであり得る結合部分3を追加する。融合パートナーAおよびBは、それぞれFabの重鎖および軽鎖上またはscFvの軽鎖および重鎖上にあり得る。ある実施形態において、パートナーAは、例えば、本明細書に記載される間質調節部分である。ある実施形態において、結合部分1は、腫瘍標的化部分であり、結合部分2は、間質調節部分である。

【図2A-2C】単一のポリペプチド鎖、例えばscFvベースフォーマットを含む多重特異性分子の概略図を示す。二重特異性および三重特異性分子は、scFvコアを含み得る。パートナーAは、任意選択的にリンカーによって連結されるVHのC末端またはVLのN末端（それぞれ図2Aまたは図2B）に連結され得、パートナーAは、二重特異性フォーマット中の結合部分2に対応する。パートナーAは、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、結合部分1は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分、例えば癌抗原に結合するscFvであり；結合部分2に対応するパートナーAは、例えば、本明細書に記載されるサイトカイン、T細胞エンゲージ、NK細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。ある実施形態において、結合部分1および結合部分2は、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、T細胞エンゲージ、NK細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択され得る。三重特異性フォーマットの実施形態において、パートナーAおよびBは、それぞれ結合部分2および3として例えばリンカーを介してscFvに結合される（図1C）。パートナーAおよびパートナーBは、独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、結合部分1、結合部分2および結合部分3は、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、T細胞エンゲージ、NK細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択され得る。ある実施形態において、結合部分1は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分、例えば癌抗原に結合するscFvであり；パートナーAおよびBは、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるサイトカイン分子、T細胞エンゲージ、NK細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。パートナーAは、任意選択的にリンカーによって連結されるVHのC末端またはVLのN末端（それぞれ図2Aまたは図2B）に連結され得、パートナーAは、二重特異性フォーマット中の結合部分2に対応する。ある実施形態において、結合部分1は、腫瘍標的化部分であり、結合部分2は、間質調節部分である。ある実施形態において、結合部分1は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分、例えば癌抗原に結合するscFvであり；結合部分2に対応するパートナーAは、例えば、本明細書に記載される間質調節部分である。三重特異性フォーマットの実施形態において、パートナーAおよびBは、それぞれ結合部分2および3として例えばリンカーを介してscFvに結合される（図2C）。三重特異性分子は、融合パートナーB、サイトカイン分子、T細胞エンゲージ、NK細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージであり得る結合部分3を追加する。融合パートナーAおよびBは、それぞれFabの重鎖および軽鎖上またはscFvの軽鎖および重鎖上にあり得る。ある実施形態において、パートナーAは、例えば、本明細書に記載される間質調節部分である。ある実施形態において、結合部分1は、腫瘍標的化部分であり、結合部分2は、間質調節部分である。

【図3A-3C】第1および第2のポリペプチド鎖、例えばC末端融合を有するFabベースフォーマットを含む多重特異性分子の概略図を示す。二重特異性および三重特異性分子は、Fabコアを含み得る。FabのVHおよびVLは、分子の結合部分1として機能し得る。パートナーAは、任意選択的にリンカーによって連結されるCLまたはCH1の

10

20

30

40

50

いずれかのC末端（それぞれ図3Aまたは図3B）に連結され得、パートナーAは、二重特異性フォーマット中の結合部分2に対応する。パートナーAは、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、結合部分1および結合部分2は、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、T細胞エンゲージャ、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択され得る。ある実施形態において、結合部分1は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分、例えば癌抗原に結合するFabであり；結合部分2に対応するパートナーAは、例えば、本明細書に記載されるサイトカイン、T細胞エンゲージャ、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。三重特異性フォーマットの実施形態において、パートナーAおよびBは、それぞれ結合部分2および3として例えばリンカーを介してFabのC末端に連結される（図3C）。パートナーAおよびパートナーBは、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、結合部分1、結合部分2および結合部分3は、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択され得る。ある実施形態において、結合部分1は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分、例えば癌抗原に結合するscFvであり；パートナーAおよびBは、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるサイトカイン分子、T細胞エンゲージャ、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。FabのVHおよびVLは、分子の結合部分1として機能する。リンカーによって連結されるCLまたはCH1のいずれかのC末端（それぞれ図3Aおよび図3B）に融合され得る融合パートナーAは、二重特異性フォーマット中の結合部分2である。二重特異性フォーマットのある実施形態において、結合部分1は、腫瘍標的化Fabおよび融合パートナーAであり、結合部分2は、間質調節分子である。三重特異性フォーマットは、それぞれ結合部分2および3としてFabのC末端に融合パートナーAおよびBを有し得る（図3C）。三重特異性分子は、融合パートナーB、サイトカイン分子、T細胞エンゲージャ、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャであり得る結合部分3を追加する。融合パートナーAおよびBは、それぞれFabの重鎖および軽鎖上またはFabの軽鎖および重鎖上にあり得る。

【図4A-4C】第1および第2のポリペプチド鎖、例えばN末端融合を有するFabベースフォーマットを含む多重特異性分子の概略図を示す。示される二重特異性および三重特異性分子は、Fabコアを含む。FabのVHおよびVLは、分子の結合部分1として機能し得る。パートナーAは、任意選択的にリンカーによって連結されるVLまたはVHのいずれかのN末端（それぞれ図4Aまたは図4B）に連結され得、パートナーAは、二重特異性フォーマット中の結合部分2に対応する。パートナーAは、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、結合部分1および結合部分2は、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、T細胞エンゲージャ、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択され得る。ある実施形態において、結合部分1は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分、例えば癌抗原に結合するFabであり；結合部分2に対応するパートナーAは、例えば、本明細書に記載されるサイトカイン、T細胞エンゲージャ、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。三重特異性フォーマットの実施形態において、パートナーAおよびBは、そ

10

20

30

40

50

れぞれ結合部分 2 および 3 として例えばリンカーを介して F a b の N 末端に連結される (図 4 C)。パートナー A およびパートナー B は、独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子 (例えば、一本鎖抗体分子 (例えば、s c F v) または F a b)、受容体分子、リガンド分子 (例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子) であり得る。ある実施形態において、結合部分 1、結合部分 2 および結合部分 3 は、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、T 細胞エンゲージ、NK 細胞エンゲージ、B 細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択され得る。ある実施形態において、結合部分 1 は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分、例えば癌抗原に結合する F a b であり; 結合部分 2 および結合部分 3 に対応するパートナー A およびパートナー B は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるサイトカイン、T 細胞エンゲージ、NK 細胞エンゲージ、B 細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。二重特異性および三重特異性分子は、F a b コアを含み得る。F a b の V H および V L は、分子の結合部分 1 として機能し得る。リンカーによって連結される C L または C H 1 のいずれかの N 末端 (それぞれ図 4 A および図 4 B) に融合され得る融合パートナー A は、二重特異性フォーマット中の結合部分 2 である。二重特異性フォーマットの実施形態において、結合部分 1 は、腫瘍標的化 F a b および融合パートナー A であり、結合部分 2 は、間質調節分子である。実施形態において、三重特異性フォーマットは、それぞれ結合部分 2 および 3 として F a b の C 末端上に融合パートナー A および B を有する (図 4 C)。三重特異性分子は、融合パートナー B、サイトカイン分子、T 細胞エンゲージ、NK 細胞エンゲージ、B 細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージであり得る結合部分 3 を追加する。融合パートナー A および B は、それぞれ F a b の重鎖および軽鎖上または F a b の軽鎖および重鎖上にあり得る。

【図 5 A - 5 C】第 1 および第 2 のポリペプチド鎖、例えば F c ベースフォーマットを含む多重特異性分子の概略図を示す。示される実施形態において、多重特異性分子は、ヘテロ二量体 F c コア (ノブ・イン・ホール (K i H)) を含む。二重特異性分子は、それぞれ結合部分 1 および 2 として示されるパートナー A および B を有し得る (図 5 A)。パートナー A およびパートナー B は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子 (例えば、一本鎖抗体分子 (例えば、s c F v) または F a b)、受容体分子、リガンド分子 (例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子) であり得る。パートナー A およびパートナー B は、第 1 または第 2 のメンバーのいずれかまたはヘテロ二量体 F c コアのメンバーのそれぞれに連結され得る。一実施形態において、パートナー A は、第 1 の F c 分子の - C H 2 - C H 3 - 領域の N 末端に連結され、パートナー B は、第 2 の F c 分子の - C H 2 - C H 3 - 領域の N 末端に連結される。あるいは、パートナー A は、第 1 の F c 分子の - C H 2 - C H 3 - 領域の C 末端に連結され、パートナー B は、第 2 の F c 分子の - C H 2 - C H 3 - 領域の C 末端に連結される。あるいは、パートナー A は、ヘテロ二量体 F c コアの第 1 のメンバーの N 末端に連結され得、パートナー B は、ヘテロ二量体 F c コアの第 2 のメンバーの C 末端に連結され得る。他の実施形態において、パートナー B は、ヘテロ二量体 F c コアの第 1 のメンバーの N 末端に連結され得、パートナー A は、ヘテロ二量体 F c コアの第 2 のメンバーの C 末端に連結され得る。ある実施形態において、結合部分 1 および結合部分 2 は、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、T 細胞エンゲージ、NK 細胞エンゲージ、B 細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択され得る。ある実施形態において、結合部分 1 は、腫瘍標的化部分であり、結合部分 2 は、サイトカイン分子、T 細胞エンゲージ、NK 細胞エンゲージ、B 細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。例示的な三重特異性および四重特異性分子は、それぞれ図 5 B および 5 C に示される。それぞれ単一または複数の結合部分 3 および 4 であり得る 1 つまたは 2 つのさらなるパートナー C および D が上記の分子に加えられ得る。パートナー A、パートナー B、パートナー C およびパートナー D は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子 (例えば、一本鎖抗体分子 (

10

20

30

40

50

例えば、 $s c F v$) または $F a b$)、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、パートナー C およびパートナー D は、 $F c$ コアの第 1 および第 2 のメンバーのいずれかの C 末端に加えられ得、それによりそれぞれ結合特異性 3 および 4 を形成する。ある実施形態において、パートナー A ~ D（それぞれ結合特異性 1 ~ 4 に対応する）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載される腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、T 細胞エンゲージャ、NK 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。一実施形態において、パートナー A である。実施形態において、パートナー A は、腫瘍標的化部分であり、パートナー B、パートナー C および D は、それぞれ独立して、サイトカイン分子、T 細胞エンゲージャ、NK 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。二重特異性分子は、それぞれ結合部分 1 および 2 として示されるパートナー A および B を有し得る（図 5 A）。パートナー A およびパートナー B は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載される間質調節部分、酵素分子、抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、 $s c F v$) または $F a b$)、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。パートナー A およびパートナー B は、第 1 または第 2 のメンバーのいずれかまたはヘテロ二量体 $F c$ コアのメンバーのそれぞれに連結され得る。一実施形態において、パートナー A は、第 1 の $F c$ 分子の $-CH_2-CH_3$ - 領域の N 末端に連結され、パートナー B は、第 2 の $F c$ 分子の $-CH_2-CH_3$ - 領域の N 末端に連結される。あるいは、パートナー A は、第 1 の $F c$ 分子の $-CH_2-CH_3$ - 領域の C 末端に連結され、パートナー B は、第 2 の $F c$ 分子の $-CH_2-CH_3$ - 領域の C 末端に連結される。あるいは、パートナー A は、ヘテロ二量体 $F c$ コアの第 1 のメンバーの N 末端に連結され得、パートナー B は、ヘテロ二量体 $F c$ コアの第 2 のメンバーの C 末端に連結され得る。他の実施形態において、パートナー B は、ヘテロ二量体 $F c$ コアの第 1 のメンバーの N 末端に連結され得、パートナー A は、ヘテロ二量体 $F c$ コアの第 2 のメンバーの C 末端に連結され得る。ある実施形態において、結合部分 1 は、腫瘍標的化部分であり、結合部分 2 は、間質調節部分である。他の実施形態において、結合部分 2 は、腫瘍標的化部分であり、結合部分 1 は、間質調節部分である。例示的な三重特異性および四重特異性分子は、それぞれ図 5 B および 5 C に示される。それぞれ単一または複数の結合部分 3 および 4 であり得る 1 つまたは 2 つのさらなるパートナー C および D が上記の分子に加えられ得る。パートナー A、パートナー B、パートナー C およびパートナー D は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、 $s c F v$) または $F a b$)、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、パートナー C およびパートナー D は、 $F c$ コアの第 1 および第 2 のメンバーのいずれかの C 末端に加えられ得、それによりそれぞれ結合特異性 3 および 4 を形成する。ある実施形態において、パートナー A ~ D（それぞれ結合特異性 1 ~ 4 に対応する）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載される腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、T 細胞エンゲージャ、NK 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャもしくはマクロファージ細胞エンゲージャまたは間質調節部分から選択される。ある実施形態において、パートナー A、B、C または D の 1 つは、間質調節部分であり、パートナー A、B、C、または D の 1 つは、腫瘍標的化部分であり、2 つの残りのパートナーは、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、T 細胞エンゲージャ、NK 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。

【図 6】結合部位 # 2 に融合された結合部位 # 1 に対応する $F a b$ を含む二重特異性分子の例示的な概略図を示す。実施形態において、結合部位 # 1 は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位 # 2 は、サイトカイン分子、またはリガンド分子または免疫細胞エンゲージャであり、例えば免疫細胞抗原に結合する $s c F v$ から選択される。実施形態において、二重特異性分子は、2 つの非隣接ポリペ

プチドを含み、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：任意選択的にリンカーを介して、結合部位#2に融合された、例えば腫瘍または間質抗原に結合するFabのVH-CH1を有し；第2のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：例えば、腫瘍または間質抗原に結合するFabのVL-CLを有する。

【図7】任意選択的にリンカーを介して免疫グロブリン定常領域の第1のメンバー、例えば第1のFc分子に連結される結合部位#1；および任意選択的にリンカーを介してFc分子の第2のメンバーに連結される結合部位#2に対応するFabを含む二重特異性分子の例示的な概略図を示す。実施形態において、結合部位#1は、腫瘍標的化部分であり、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位#2は、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャ、例えばリガンド分子または免疫細胞抗原に結合するscFvから選択される。実施形態において、二重特異性分子は、3つの非隣接ポリペプチドを含み、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：任意選択的に、リンカーを介してFc分子の第1のメンバー（例えば、任意選択的に突起またはノブを含む第1のCH2-CH3領域）に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合するFabのVH-CH1を有し；第2のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：例えば、腫瘍または間質抗原に結合するFabのVL-CLを有し；第3のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：任意選択的にリンカーを介してFc分子の第2のメンバー（例えば、任意選択的にホールまたは空洞を含む第2のCH2-CH3領域）に連結される結合部位#2（例えば、サイトカイン分子、リガンド分子または例えば免疫細胞抗原に結合するscFv）を有する。実施形態において、Fc分子の第1および第2のメンバーは、二重特異性分子のヘテロ二量体化を促進する。

【図8A】結合部位#2および結合部位#3に融合された結合部位#1に対応するFabを含む三重特異性分子の例示的な概略図を示す。実施形態において、結合部位#1は、腫瘍標的化部分であり、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位#2および#3は、独立して、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャ、例えばリガンド分子または免疫細胞抗原に結合するscFvから選択される。実施形態において、三重特異性分子は、図8A中の2つの非隣接ポリペプチドを含み、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：任意選択的にリンカーを介して結合部位#3（例えば、サイトカイン分子、リガンドまたはscFvから選択される）に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合するFabのVH-CH1を有し；第2のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：例えば、免疫細胞抗原に結合するscFv（例えば、N-から-CにscFvのVH-VL）に融合された、例えば腫瘍または間質抗原に結合するFabのVL-CLを有する。図8Bは、別の立体配置を示し、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：任意選択的にリンカーを介してサイトカイン分子に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合するFabのVH-CH1を有し；第2のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：リガンドまたはscFv（例えば、リガンドまたは例えば免疫細胞に結合するscFv）に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合するFabのVL-CLを有する。図8Cは、別の立体配置を示し、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：リガンドまたは例えば第1の免疫細胞に結合するscFvに任意選択的にリンカーを介して連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合するFabのVH-CH1を有し；第2のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：リガンドまたは例えば第2の免疫細胞に結合するscFvに任意選択的にリンカーを介して連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合するFabのVL-CLを有する。

【図8B】同上。

【図8C】同上。

【図9A】結合部位#1、結合部位#2、結合部位#3に対応するFabを含む三重特異性分子の例示的な概略図を示し、これらのそれぞれは、例えばリンカーを介して免疫グロブリン結合ドメインの第1および第2のメンバー、例えば第1および第2のFc分子に連結される。実施形態において、三重特異性分子は、図9A～9Bに示される3つの非隣接ポリペプチドを含む。図9Aに示される実施形態において、第1のポリペプチドは、N-

から－Cに以下の立体配置：例えば、リンカーを介してFc分子の第1のメンバー（例えば、任意選択的に突起または空洞を含む第1のFc分子のCH₂－CH₃領域のN末端）に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合するFabのVH－CH₁を有し、この第1のメンバーは、任意選択的にリンカーを介して第1のFc分子のC末端に連結される結合部位#3を任意選択的にさらに含むことができ；第2のポリペプチドは、N－から－Cの配向で、例えばリンカーを介してFc分子の第2のメンバー（例えば、任意選択的に突起または空洞を含む第2のFc分子のCH₂－CH₃領域のN末端）に連結される結合部位#2を含み；第3のポリペプチドは、N－から－Cに：例えば、腫瘍または間質抗原に結合するFabのVL－CLを含む。図9Bに示される実施形態において、第1のポリペプチドは、N－から－Cに以下の立体配置：例えば、リンカーを介してFc分子の第1のメンバー（例えば、任意選択的に突起または空洞を含む第1のFc分子のCH₂－CH₃領域のN末端）に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合するFabのVH－CH₁を有し；第2のポリペプチドは、N－から－Cの配向で、例えばリンカーを介してFc分子の第2のメンバー（例えば、任意選択的に突起または空洞を含む第2のFc分子のCH₂－CH₃領域のN末端）に連結される結合部位#2を含み、この第2のメンバーは、任意選択的にリンカーを介して第2のFc分子のC末端）に連結される結合部位#3を任意選択的にさらに含むことができ；第3のポリペプチドは、N－から－Cに：例えば、腫瘍または間質抗原に結合するFabのVL－CLを含む。上記の実施形態において、結合部位#1は、腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位#2および#3は、独立して、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャ、例えばリガンド分子または免疫細胞抗原に結合するscFvから選択される。実施形態において、Fc分子の第1および第2のメンバーは、三重特異性分子のヘテロ二量体化を促進する。

【図9B】同上。

【図10A】結合部位#1、結合部位#2、結合部位#3および結合部位#4に対応するFabを含む四重特異性分子の例示的な概略図を示し、これらのそれぞれは、例えば、リンカーを介して免疫グロブリン定常領域の第1および第2のメンバー、例えば第1および第2のFc分子に連結される。実施形態において、四重特異性分子は、図10A～10Cに示される3つの非隣接ポリペプチドを含む。図10Aに示される実施形態において、第1のポリペプチドは、N－から－Cに以下の立体配置：例えば、リンカーを介してFc分子の第1のメンバー（例えば、任意選択的に突起または空洞を含む第1のFc分子のCH₂－CH₃領域のN末端）に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合するFabのVH－CH₁を有し、この第1のメンバーは、任意選択的にリンカーを介して第1のFc分子のC末端）に連結される結合部位#3を任意選択的にさらに含むことができ；第2のポリペプチドは、N－から－Cの配向で、例えばリンカーを介してFc分子の第2のメンバー（例えば、任意選択的に突起または空洞を含む第2のFc分子のCH₂－CH₃領域のN末端）に連結される結合部位#2を含み、この第2のメンバーは、任意選択的にリンカーを介して第2のFc分子のC末端）に連結される結合部位#4を任意選択的にさらに含むことができ；第3のポリペプチドは、N－から－Cに：例えば、腫瘍または間質抗原に結合するFabのVL－CLを含む。図10Aに示される実施形態において、結合部位#1は、腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位#2、#3および4は、独立して、サイトカイン分子、リガンド分子または例えば免疫細胞抗原に結合するscFvから選択される。図10Aに示される実施形態において、結合部位#1は、腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位#2、#3および4は、独立して、サイトカイン分子、リガンド分子または例えば免疫細胞抗原に結合するscFvから選択される。図10Bに示される実施形態において、結合部位#1は、腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位#2は、例えば、N末端からC末端にVH－VLの配向で、例えばリンカーを介して第2のFcメンバーのN末端に連結されるNK細胞エンゲージャ、例えばscFvを示し；結合部位#3は、例えば、リンカーを介して第1のFcメンバーのC末端に連結されるサイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャ、例えばscFvを示し；結合部位#4は、例えば、リンカーを介して第2のFcメンバーのC末端に連結されるリガンド分子または例えば免疫細胞抗原に結

10

20

30

40

50

合する s c F v を示す。図 10 C に示される実施形態において、結合部位 # 1 は、腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位 # 2 は、例えば、N 末端から C 末端に V H - V L の配向で、例えばリンカーを介して第 2 の F c メンバーの N 末端に連結される N K 細胞エンゲージャ、例えば s c F v を示し；結合部位 # 3 は、例えば、リンカーを介して第 1 の F c メンバーの C 末端に連結されるリガンド分子または免疫細胞エンゲージャ、例えば s c F v を示し；結合部位 # 4 は、例えば、リンカーを介して第 2 の F c メンバーの C 末端に連結されるリガンド分子または例えば免疫細胞抗原に結合する s c F v を示す。上記の四重特異性分子のいずれかの実施形態において、F c 分子の第 1 および第 2 のメンバーは、四重特異性分子のヘテロ二量体化を促進する。

【図 10 B】同上。

【図 10 C】同上。

【図 11 A - 11 C】例示的な三重特異性分子を示す。図 11 A は、メソテリン腫瘍抗原に向けられた F a b 分子を含む三重特異性分子の概略図を示し、第 1 のポリペプチドは、リンカーを介して I L - 15 サイトカインに連結される F a b の重鎖 V H - C H 1 を含み、F a b の第 2 のポリペプチドは、リンカーを介して C D 40 リガンド (C D 40 L) に連結される軽鎖 V L - C L を含む。図 11 B は、N - から C - の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列 (斜体で示される)、続いて G l y - S e r リンカー (破線の下線で示される) を介してヒト I L - 15 サイトカイン (標準フォントで示される) に連結される F a b の重鎖 V H - C H 1 (V H および C H 1 についてそれぞれ下線および太字で示される) を提供する。図 11 C は、N - から C - の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列 (斜体で示される)、続いて G l y - S e r リンカー (破線の下線で示される) を介してヒト C D 40 L (標準フォントで示される) に連結される F a b の κ 軽鎖 V L - C L (V L および C L についてそれぞれ下線および太字で示される) を提供する。

【図 12 A - 12 D】間質標的に対する F a b およびサイトカイン分子を含む例示的な二重特異性分子を示し、これらのそれぞれは、例えば、リンカーを介して免疫グロブリン定常領域の第 1 および第 2 のメンバー、例えば第 1 および第 2 の F c 分子に連結される。図 12 A は、間質抗原に指向された F a b 分子を含む二重特異性分子の概略図を示し、第 1 のポリペプチドは、空洞を有する第 1 の F c 分子に連結される間質抗原に対する F a b の重鎖 V H - C H 1 を含み；第 2 のポリペプチドは、突起を有する第 2 の F c 分子に連結される I L - 15 サイトカインを含み；第 3 のポリペプチドは、間質抗原に対する F a b の軽鎖 V L - C L を含む。図 12 B は、N - から C - の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列 (斜体で示される)、続いてヒト I L - 15 サイトカイン (下線で示される) を提供し、突起を有する第 2 の F c 分子 (標準フォントで示される) に連結される任意選択の G l y - S e r リンカー (破線の下線で示される) をさらに含む。図 12 C は、N - から C - の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列 (斜体で示される)、続いて空洞を有する第 1 の F c 分子 (標準フォントで示される) に連結される、間質抗原 F A P に対する F a b の重鎖 V H - C H 1 (V H および C H 1 についてそれぞれ下線および太字で示される) を提供する。図 12 D は、N - から C - の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列 (斜体で示される)、続いて間質抗原 F A P に対する F a b の κ 軽鎖 V L - C L (V L および C L についてそれぞれ下線および太字で示される) を提供する。

【図 13 A - 13 D】間質標的に対する F a b 、2 つの免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子を含む例示的な四重特異性分子を示し、これらのそれぞれは、例えば、リンカーを介して免疫グロブリン定常領域の第 1 および第 2 のメンバー、例えば第 1 および第 2 の F c 分子に連結される。図 13 A は、間質抗原に指向された F a b 分子を含む四重特異性分子の概略図を示し、第 1 のポリペプチドは、空洞を有する第 1 の F c 分子に連結される間質抗原に対する F a b の重鎖 V H - C H 1 を含み、第 1 の免疫細胞エンゲージャ、例えば B 7 H 6 をさらに含み；第 2 のポリペプチドは、任意選択的に G l y - S e r リンカーを介して、突起を有する第 2 の F c 分子に連結される I L - 15 サイトカインを含み

、例えば、G l y - S e r リンカーを介して第2の免疫細胞エンゲージャ、例えばC D 4 0 Lをさらに含み；第3のポリペプチドは、間質抗原に対するF a bの軽鎖V L - C Lを含む。図1 3 Bは、N - からC - の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列（斜体で示される）、続いてヒトI L - 1 5 サイトカイン（下線で示される）を提供し、突起を有する第2のF c分子（太字で示される）に連結される任意選択のG l y - S e r リンカー（破線の下線で示される）をさらに含み、これは、ヒトC D 4 0 Lアミノ酸配列（標準フォントで示される）に連結される、例えば任意選択のG l y - S e r リンカー（破線の下線で示される）をさらに含む。図1 3 Cは、N - からC - の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列（斜体で示される）、続いて空洞を有する第1のF c分子（標準フォントで示される）に連結される、間質抗原F A Pに対するF a bの重鎖V H - C H 1（V HおよびC H 1についてそれぞれ下線および太字で示される）を提供し、これは、ヒトB 7 H 6アミノ酸配列（下線で示される）に連結される、例えば任意選択のG l y - S e r リンカー（破線の下線で示される）をさらに含む。図1 3 Dは、N - からC - の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列（斜体で示される）、続いて間質抗原F A Pに対するF a bのκ軽鎖V L - C L（V LおよびC Lについてそれぞれ下線および標準フォントで示される）を提供する。

【図1 4 A】メソテリンに対するF a b（分子A）、2つの免疫細胞エンゲージャ、4 1 B B - リガンド（分子C）およびC D 4 0 リガンド（分子D）ならびにサイトカイン分子（分子B）を含む例示的な四重特異性分子を示し、これらのそれぞれは、例えば、リンカーを介して免疫グロブリン定常領域の第1および第2のメンバー、例えば第1および第2のF c分子（ノブ・イン・ホール、K i H、F c第1のメンバーおよびF cホール第2のメンバー）に連結される。図1 4 A～1 4 Bは、メソテリン抗原に指向されたF a b分子を含む四重特異性分子の概略図を示し、第1のポリペプチドは、C H 3領域中の突起（ノブ）を有する第1のF c分子に連結されるメソテリン抗原に対するF a bの重鎖V H - C H 1を含み、第1の免疫細胞エンゲージャ、例えば4 1 B B - リガンドをさらに含み；第2のポリペプチドは、任意選択的にG l y - S e r リンカーを介して、空洞（ホール）を有する第2のF c分子に連結されるI L - 2 1 サイトカインを含み、例えば、G l y - S e r リンカーを介して第2の免疫細胞エンゲージャ、例えばC D 4 0 Lをさらに含み；第3のポリペプチドは、メソテリン抗原（分子A）に対するF a bの軽鎖V L - C Lを含む。以下のアミノ酸配列が示される：（i）メソテリン結合F a b（a _ _ h M e s o _ _ S S 1 _ _ F a b）の重鎖および軽鎖のそれぞれに対応する分子A；（i i）ヒトI L - 2 1に対応する分子B；（i i i）分子Bおよび第2のF c領域間のリンカー（分子B - K i H _ _ F c リンカー）；（i v）第1のF c領域および分子C間のリンカー（K i H _ _ F c - 分子C リンカー）；（v）ヒト4 1 B B リガンドに対応する分子C；（v i）第2のF c領域および分子D間のリンカー（K i H _ _ F c - 分子D リンカー）；（v i i）ヒトC D 4 0 Lに対応する分子C；（v i i i）NからCの配向で、メソテリンF a bのV H、位置3 5 4にCの代わりにSおよび位置3 6 6にTの代わりにWの置換を含むC H 2 - C H 3アミノ酸配列、続いてG l y - S e r リンカーおよびヒト4 1 B B リガンドを含む第1のメンバーF c領域（F c ノブ）；および（i x）NからCの配向で、ヒトI L - 2 1、G l y - S e r リンカー、位置3 4 9にYの代わりにC、位置3 6 6にTの代わりにS、位置3 6 8にLの代わりにA、位置4 0 7にYの代わりにVの置換を含むC H 2 - C H 3アミノ酸配列、続いてG l y - S e r リンカーおよびヒトC D 4 0 Lを含む第2のメンバーF c領域（F c ホール）。

【図1 4 B】同上。

【図1 5 A - 1 5 D】例示的な二重特異性抗体分子の概略図である。図1 5 Aは、「ノブ・イン・ホール」ヘテロ二量体化を用いた二重特異性抗体の概略図である。図1 5 Bは、共通の軽鎖を用いた二重特異性抗体の概略図である。図1 5 Cは、I g G - F a b二重特異性抗体の概略図である。図1 5 Dは、I g G - d s s c F v 2二重特異性抗体の概略図である。図1 5 Eは、D V D二重特異性抗体の概略図である。図1 5 Fは、ダイアボディの概略図である。図1 5 Gは、D A R T二重特異性抗体の概略図である。図1 5 Hは、T

a n d A b 二重特異性抗体の概略図である。図 1 5 I は、F a b - s c F v 2 二重特異性抗体の概略図である。図 1 5 J は、F a b - s c F v 二重特異性抗体の概略図である。図 1 5 A ~ 1 5 J に示される分子の構成単位のそれぞれをコードする m R N A は、以下に示される抗体分子である。

【図 1 5 E - 1 5 H】同上。

【図 1 5 I - 1 5 J】同上。

【図 1 6】結合部位 # 2 に融合された結合部位 # 1 に対応する F a b を含む二重特異性分子の例示的な概略図を示す。実施形態において、結合部位 # 1 は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位 # 2 は、間質調節部分である。実施形態において、二重特異性分子は、2 つの非隣接ポリペプチドを含み、第 1 のポリペプチドは、N - から - C に以下の立体配置：任意選択的にリンカーを介して、結合部位 # 2 に融合された、例えば癌抗原に結合する F a b の V H - C H 1 を有し；第 2 のポリペプチドは、N - から - C に以下の立体配置：例えば、癌抗原、例えば腫瘍または間質抗原に結合する F a b の V L - C L を有する。

【図 1 7】任意選択的にリンカーを介して免疫グロブリン定常領域の第 1 のメンバー、例えば第 1 の F c 分子に連結される結合部位 # 1；および任意選択的にリンカーを介して F c 分子の第 2 のメンバーに連結される結合部位 # 2 に対応する F a b を含む二重特異性分子の例示的な概略図を示す。実施形態において、結合部位 # 1 は、腫瘍標的化部分であり、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位 # 2 は、間質調節部分である。実施形態において、二重特異性分子は、3 つの非隣接ポリペプチドを含み、第 1 のポリペプチドは、N - から - C に以下の立体配置：任意選択的に、リンカーを介して F c 分子の第 1 のメンバー（例えば、任意選択的に突起またはノブを含む第 1 の C H 2 - C H 3 領域）に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合する F a b の V H - C H 1 を有し；第 2 のポリペプチドは、N - から - C に以下の立体配置：例えば、腫瘍または間質抗原に結合する F a b の V L - C L を有し；第 3 のポリペプチドは、N - から - C に以下の立体配置：任意選択的にリンカーを介して F c 分子の第 2 のメンバー（例えば、任意選択的にホールまたは空洞を含む第 2 の C H 2 - C H 3 領域）に連結される結合部位 # 2（間質調節部分）を有する。実施形態において、F c 分子の第 1 および第 2 のメンバーは、二重特異性分子のヘテロ二量体化を促進する。

【図 1 8】結合部位 # 2 および結合部位 # 3 に融合された結合部位 # 1 に対応する F a b を含む三重特異性分子の例示的な概略図を示す。実施形態において、結合部位 # 1 は、腫瘍標的化部分であり、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位 # 2 は、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャ、例えばリガンド分子または免疫細胞抗原に結合する s c F v から選択され；結合部位 # 3 は、間質調節部分である。実施形態において、三重特異性分子は、図 1 8 中の 2 つの非隣接ポリペプチドを含み、第 1 のポリペプチドは、N - から - C に以下の立体配置：任意選択的にリンカーを介して結合部位 # 3（間質調節部分）に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合する F a b の V H - C H 1 を有し；第 2 のポリペプチドは、N - から - C に以下の立体配置：例えば、免疫細胞抗原に結合する s c F v（例えば、N - から - C に s c F v の V H - V L）に融合された、例えば腫瘍または間質抗原に結合する F a b の V L - C L を有する。

【図 1 9 A】結合部位 # 1、結合部位 # 2、結合部位 # 3 に対応する F a b を含む三重特異性分子の例示的な概略図を示し、これらのそれぞれは、例えば、リンカーを介して免疫グロブリン結合ドメインの第 1 および第 2 のメンバー、例えば第 1 および第 2 の F c 分子に連結される。実施形態において、三重特異性分子は、図 1 9 A ~ 1 9 B に示される 3 つの非隣接ポリペプチドを含む。図 1 9 A に示される実施形態において、第 1 のポリペプチドは、N - から - C に以下の立体配置：例えば、リンカーを介して F c 分子の第 1 のメンバー（例えば、任意選択的に突起または空洞を含む第 1 の F c 分子の C H 2 - C H 3 領域の N 末端）に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合する F a b の V H - C H 1 を有し、この第 1 のメンバーは、任意選択的にリンカーを介して第 1 の F c 分子の C 末端に連結される結合部位 # 3 を任意選択的にさらに含むことができ；第 2 のポリペプチドは、

NーからーCの配向で、例えばリンカーを介してF c分子の第2のメンバー（例えば、任意選択的に突起または空洞を含む第2のF c分子のCH₂ーCH₃領域のN末端）に連結される結合部位#2を含み；第3のポリペプチドは、NーからーCに：例えば、腫瘍または間質抗原に結合するF a bのVLーCLを含む。図19Bに示される実施形態において、第1のポリペプチドは、NーからーCに以下の立体配置：例えば、リンカーを介してF c分子の第1のメンバー（例えば、任意選択的に突起または空洞を含む第1のF c分子のCH₂ーCH₃領域のN末端）に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合するF a bのVHーCH₁を有し；第2のポリペプチドは、NーからーCの配向で、例えばリンカーを介してF c分子の第2のメンバー（例えば、任意選択的に突起または空洞を含む第2のF c分子のCH₂ーCH₃領域のN末端）に連結される結合部位#2を含み、この第2のメンバーは、任意選択的にリンカーを介して第2のF c分子のC末端）に連結される結合部位#3を任意選択的にさらに含むことができ；第3のポリペプチドは、NーからーCに：例えば、腫瘍または間質抗原に結合するF a bのVLーCLを含む。上記の実施形態において、結合部位#1は、腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位#2は、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャ、例えばリガンド分子または免疫細胞抗原に結合するs c F vから選択され；結合部位#3は、間質調節部分である。実施形態において、F c分子の第1および第2のメンバーは、三重特異性分子のヘテロ二量体化を促進する。

【図19B】同上。

【図20】結合部位#1、結合部位#2、結合部位#3および結合部位#4に対応するF a bを含む四重特異性分子の例示的な概略図を示し、これらのそれぞれは、例えば、リンカーを介して免疫グロブリン定常領域の第1および第2のメンバー、例えば第1および第2のF c分子に連結される。実施形態において、四重特異性分子は、3つの非隣接ポリペプチドを含む。実施形態において、第1のポリペプチドは、NーからーCに以下の立体配置：例えば、リンカーを介してF c分子の第1のメンバー（例えば、任意選択的に突起または空洞を含む第1のF c分子のCH₂ーCH₃領域のN末端）に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合するF a bのVHーCH₁を有し、この第1のメンバーは、任意選択的にリンカーを介して第1のF c分子のC末端）に連結される結合部位#3を任意選択的にさらに含むことができ；第2のポリペプチドは、NーからーCの配向で、例えばリンカーを介してF c分子の第2のメンバー（例えば、任意選択的に突起または空洞を含む第2のF c分子のCH₂ーCH₃領域のN末端）に連結される結合部位#2を含み、この第2のメンバーは、任意選択的にリンカーを介して第2のF c分子のC末端）に連結される結合部位#4を任意選択的にさらに含むことができ；第3のポリペプチドは、NーからーCに：例えば、腫瘍または間質抗原に結合するF a bのVLーCLを含む。図10に示される実施形態において、結合部位#1は、腫瘍または間質抗原に結合し；結合部位#2および#4は、独立して、サイトカイン分子、リガンド分子または例えば免疫細胞抗原に結合するs c F vから選択され；結合部位#3は、間質調節部分である。

【図21】多重特異性分子1のゲルである。

【図22】多重特異性分子2のゲルである。

【図23】多重特異性分子3のゲルである。

【図24】多重特異性分子4のゲルである。

【図25】多重特異性分子5のゲルである。

【図26】多重特異性分子6のゲルである。

【図27】多重特異性分子7のゲルである。

【図28】多重特異性分子8のゲルである。

【図29】多重特異性分子9のゲルである。

【図30】多重特異性分子10のゲルである。

【図31】多重特異性分子11のゲルである。

【図32】多重特異性分子12のゲルである。

【図33】多重特異性分子13のゲルである。

【図34】多重特異性分子14のゲルである。

【図 3 5】多重特異性分子 1 5 のゲルである。

【図 3 6】多重特異性分子 1 6 のゲルである。

【図 3 7】多重特異性分子 1 7 のゲルである。

【図 3 8】多重特異性分子 1 8 のゲルである。

【図 3 9】多重特異性分子 1 9 のゲルである。

【図 4 0】多重特異性分子 2 0 のゲルである。

【図 4 1】多重特異性分子 2 1 のゲルである。

【図 4 2】多重特異性分子 2 2 のゲルである。

【図 4 3】多重特異性分子 1 のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 4 4】多重特異性分子 5 のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 4 5】多重特異性分子 1 1 のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 4 6】多重特異性分子 1 2 のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 4 7】多重特異性分子 1 3 のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 4 8】ヒトメソテリン（配列番号 1 8 1 から生成される）に結合する、多重特異性分子 1（丸、実線）、多重特異性分子 2（菱形、破線）および多重特異性分子 3（四角形、点線）の E L I S A である。

【図 4 9】ヒトメソテリン（配列番号 1 8 1 から生成される）に結合する、多重特異性分子 5（丸、実線）、多重特異性分子 6（菱形、短鎖線）、多重特異性分子 7（四角形、点線）および多重特異性分子 8（三角形、長鎖線）の E L I S A である。

【図 5 0】ヒトメソテリン（配列番号 1 8 1 から生成される）に結合する、多重特異性分子 9（丸、実線）、多重特異性分子 1 1（菱形、短鎖線）、多重特異性分子 1 0（四角形、点線）および多重特異性分子 1 2（三角形、長鎖線）の E L I S A である。

【図 5 1】ヒト P D 1 L 1（配列番号 1 7 8 から生成される）に結合する、多重特異性分子 5（丸、実線）、多重特異性分子 6（菱形、長鎖線）、多重特異性分子 7（四角形、点線）および多重特異性分子 9（三角形、短鎖線）の E L I S A である。

【図 5 2】ヒト P D 1 L 1（配列番号 1 7 8 から生成される）に結合する、多重特異性分子 1 1（丸、実線）、多重特異性分子 8（菱形、長鎖線）、多重特異性分子 1 0（四角形、点線）および多重特異性分子 1 2（三角形、短鎖線）の E L I S A である。

【図 5 3】ヒト I L 2 R α （配列番号 1 8 2 から生成される）に結合する、多重特異性分子 1（丸、実線）、多重特異性分子 2（菱形、破線）および多重特異性分子 4（四角形、点線）の E L I S A である。

【図 5 4】ヒト I L 2 R α （配列番号 1 8 2 から生成される）に結合する、多重特異性分子 6（丸、実線）、多重特異性分子 8（菱形、長鎖線）、多重特異性分子 1 0（四角形、点線）および多重特異性分子 1 2（三角形、短鎖線）の E L I S A である。

【図 5 5】ヒト N K p 3 0（配列番号 1 8 0 から生成される）を用いた多重特異性分子 2（丸、実線）および多重特異性分子 3（菱形、破線）の E L I S A である。

【図 5 6】ヒト N K p 4 6（配列番号 1 7 9 から生成される）を用いた多重特異性分子 7（丸、実線）、多重特異性分子 9（菱形、破線）および多重特異性分子 1 1（四角形、点線）の E L I S A である。

【図 5 7】ヒト N K p 4 6（配列番号 1 7 9 から生成される）を用いた多重特異性分子 8（丸、実線）、多重特異性分子 1 0（菱形、破線）および多重特異性分子 1 1（四角形、点線）の E L I S A である。

【図 5 8】多重特異性分子 1（丸、実線）、多重特異性分子 2（菱形、点線）、多重特異性分子 3（四角形、破線）および多重特異性分子 4（三角形、破線および点線）についての細胞殺滅曲線である。

【図 5 9】多重特異性分子 1（黒一色）、多重特異性分子 2（斜線）、多重特異性分子 3（白色）および多重特異性分子 4（点付き）についての I F N γ のサイトカイン放出である。

【図 6 0】多重特異性分子 5（丸）、多重特異性分子 6（菱形、短鎖線）、多重特異性分子 7（四角形、点線）および多重特異性分子 8（三角形、長鎖線）についての細胞殺滅曲

10

20

30

40

50

線である。

【図 6 1】多重特異性分子 5（丸）、多重特異性分子 6（菱形、短鎖線）、多重特異性分子 9（四角形、点線）および多重特異性分子 10（三角形、長鎖線）についての細胞殺滅曲線である。

【図 6 2】多重特異性分子 5（丸）、多重特異性分子 6（菱形、短鎖線）、多重特異性分子 11（四角形、点線）および多重特異性分子 12（三角形、長鎖線）についての細胞殺滅曲線である。

【図 6 3】（配列番号 181 からの）ヒトメソテリンへの多重特異性分子 22 の結合である。

【図 6 4】（配列番号 178 からの）ヒト PD1L1 への多重特異性分子 22 の結合である。

10

【図 6 5】ヒト IL2R α （配列番号 182 から生成される）に結合する、多重特異性分子 13（丸、実線）、多重特異性分子 16（菱形、短鎖線）、多重特異性分子 17（四角形、点線）および多重特異性分子 22（三角形、長鎖線）の ELISA である。

【図 6 6】ヒト NKp46（配列番号 179 から生成される）に結合する、多重特異性分子 14（丸、実線）、多重特異性分子 21（菱形、短鎖線）および多重特異性分子 22（四角形、点線）の ELISA である。

【図 6 7】多重特異性分子 18（丸、実線）、多重特異性分子 13（菱形、短鎖線）、多重特異性分子 14（四角形、点線）および多重特異性分子 16（三角形、長鎖線）についての細胞殺滅曲線である。

20

【図 6 8】多重特異性分子 18（黒一色）、多重特異性分子 13（点付き）、多重特異性分子 14（白色）および多重特異性分子 16（斜線）についての IFN γ のサイトカイン放出である。

【図 6 9】多重特異性分子 18（丸、実線）、多重特異性分子 13（菱形、短鎖線）、多重特異性分子 15（四角形、点線）および多重特異性分子 17（三角形、長鎖線）についての細胞殺滅曲線である。

【図 7 0】多重特異性分子 18（黒一色）、多重特異性分子 13（点付き）、多重特異性分子 15（白色）および多重特異性分子 17（斜線）についての IFN γ のサイトカイン放出である。

【図 7 1】多重特異性分子 18（丸、実線）、多重特異性分子 15（四角形、点線）および多重特異性分子 20（三角形、長鎖線）についての細胞殺滅曲線である。

30

【図 7 2】多重特異性分子 18（黒一色）、多重特異性分子 15（白色）および多重特異性分子 20（斜線）についての IFN γ のサイトカイン放出である。

【図 7 3】多重特異性分子 18（丸、実線）、多重特異性分子 14（四角形、点線）および多重特異性分子 21（三角形、長鎖線）についての細胞殺滅曲線である。

【図 7 4】多重特異性分子 18（黒一色）、多重特異性分子 14（白色）および多重特異性分子 21（斜線）についての IFN γ のサイトカイン放出である。

【図 7 5】多重特異性分子 23（丸、実線）および多重特異性分子 22（菱形、破線）についての細胞殺滅曲線である。

【図 7 6】多重特異性分子 23（黒一色）および多重特異性分子 22（斜線）についての IFN γ のサイトカイン放出である。

40

【図 7 7】多重特異性分子 24 のゲルである。

【図 7 8】多重特異性分子 25 のゲルである。

【図 7 9】多重特異性分子 26 のゲルである。

【図 8 0】多重特異性分子 27 のゲルである。

【図 8 1】多重特異性分子 28 のゲルである。

【図 8 2】多重特異性分子 29 のゲルである。

【図 8 3】多重特異性分子 30 のゲルである。

【図 8 4】多重特異性分子 31 のゲルである。

【図 8 5】多重特異性分子 32 のゲルである。

50

【図 8 6】多重特異性分子 2 4 のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 8 7】多重特異性分子 2 5 のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 8 8】多重特異性分子 2 6 のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 8 9】多重特異性分子 2 8 のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 9 0】多重特異性分子 2 9 のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 9 1】多重特異性分子 3 0 のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 9 2】多重特異性分子 3 1 のサイズ排除クロマトグラムである。

【図 9 3】配列番号 1 7 8 からのヒト P D L 1 を用いた多重特異性分子 2 7 (丸、実線)、多重特異性分子 2 8 (菱形、短鎖線)、多重特異性分子 2 9 (四角形、点線) および多重特異性分子 3 2 (三角形、長鎖線) の E L I S A である。

10

【図 9 4】配列番号 2 2 5 からのヒト F A P を用いた多重特異性分子 2 4 (丸、実線)、多重特異性分子 2 5 (菱形、短鎖線)、多重特異性分子 2 6 (四角形、点線) および多重特異性分子 2 7 (三角形、長鎖線) の E L I S A である。

【図 9 5】配列番号 2 2 5 からのヒト F A P を用いた多重特異性分子 2 8 (丸、実線)、多重特異性分子 3 0 (菱形、短鎖線)、多重特異性分子 3 1 (四角形、点線) および多重特異性分子 3 2 (三角形、長鎖線) の E L I S A である。

【図 9 6】配列番号 1 7 9 から生成されるヒト N K p 4 6 への多重特異性分子 2 9 の結合である。

【図 9 7】配列番号 1 8 2 からのヒト I L 2 R α を用いた多重特異性分子 2 5 (丸、実線)、多重特異性分子 2 8 (菱形、短鎖線)、多重特異性分子 2 9 (四角形、点線) および多重特異性分子 3 2 (三角形、長鎖線) の E L I S A である。

20

【図 9 8】多重特異性分子 2 4 (丸)、多重特異性分子 2 5 (菱形) および多重特異性分子 2 6 (四角形) のヒアルロニダーゼ活性についての比濁酵素アッセイであり、ヒアルロン酸の分解は、吸光度の低下をもたらす。

【図 9 9】多重特異性分子 2 7 (丸)、多重特異性分子 2 8 (菱形) および多重特異性分子 2 9 (四角形) のヒアルロニダーゼ活性についての比濁酵素アッセイであり、ヒアルロン酸の分解は、吸光度の低下をもたらす。

【図 1 0 0】ヒアルロニダーゼ活性についてのゲルベースのアッセイであり、白色のバンドは、分解されたヒアルロン酸を表す。レーン 1 は、ラダーであり、レーン 2 は、多重特異性分子 2 4 であり、レーン 3 は、多重特異性分子 2 5 であり、レーン 4 は、多重特異性分子 2 6 であり、レーン 5 は、多重特異性分子 2 7 であり、レーン 6 は、多重特異性分子 2 8 であり、レーン 7 は、多重特異性分子 2 9 である。

30

【図 1 0 1】多重特異性分子 3 0 (丸)、多重特異性分子 3 1 (菱形) および多重特異性分子 3 2 (四角形) の I V 型コラゲナーゼ活性であり、ゼラチナーゼの分解は、蛍光の増加をもたらす。

【発明を実施するための形態】

【0 1 8 2】

複数の (例えば、2 つ以上の) 結合特異性 (または機能性) を含む多重特異性分子 (本明細書において「多機能性分子」とも呼ばれる) が本明細書に開示され、第 1 の結合特異性は、癌細胞に選択的に局在し、例えば、それは、腫瘍標的化部分を含み; 第 2 (または第 3、または第 4) の結合特異性は、免疫細胞エンゲージャ (例えば、T 細胞エンゲージャ、NK 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャの 1 つ、2 つ、3 つまたは全てから選択される); および/または サイトカイン分子の一方または両方を含む。一実施形態において、多重特異性分子は、二重特異性 (または二機能性) 分子、三重特異性 (または三機能性) 分子または四重特異性 (または四機能性) 分子である。理論に制約されるものではないが、本明細書に開示される多重特異性分子は、癌細胞の存在下で、免疫細胞 (例えば、NK 細胞、B 細胞、樹枝状細胞またはマクロファージから選択される免疫エフェクター細胞) を局在化 (例えば、架橋) および/または活性化することが予想される。本明細書に記載される多重特異性分子を用いて、癌細胞の存在下で、免疫細胞の近接および/または活性を増大させることは

40

50

、標的癌細胞に対する免疫応答を促進し、それにより、より有効な癌治療を提供することが予想される。したがって、特に上記の部分を含む多重特異性分子（例えば、多重特異性抗体分子）、それをコードする核酸、上記の分子を生成する方法、および上記の分子を用いて癌を治療する方法が本明細書において提供される。

【0183】

（i）間質調節部分および（ii）腫瘍標的化部分（例えば、抗体分子、リガンド分子、または受容体分子）を含む新規な多機能性、例えば多重特異性分子が開示される。理論に制約されるものではないが、本明細書に開示される多機能性分子は、特に癌部位を標的化し（例えば、それに局在し）、腫瘍間質を変化させ、例えば癌部位の近くの腫瘍微小環境を変化させるものと考えられる。多機能性分子は、免疫細胞エンゲージャ（例えば、T細胞エンゲージャ、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャの1つ、2つ、3つまたは全てから選択される）；および／またはサイトカイン分子の一方または両方をさらに含み得る。したがって、特に上記の部分を含む多機能性、例えば多重特異性分子、それをコードする核酸、上記の分子を生成する方法、および上記の分子を用いて癌を治療する方法が本明細書において提供される。

10

【0184】

（i）間質調節部分および（ii）腫瘍標的化部分（例えば、抗体分子、リガンド分子、または受容体分子）を含む新規な多機能性、例えば多重特異性分子も本明細書に開示される。理論に制約されるものではないが、本明細書に開示される多機能性分子は、特に癌部位を標的化し（例えば、それに局在し）、腫瘍間質を変化させ、例えば癌部位の近くの腫瘍微小環境を変化させるものと考えられる。多機能性分子は、免疫細胞エンゲージャ（例えば、T細胞エンゲージャ、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャの1つ、2つ、3つまたは全てから選択される）；および／またはサイトカイン分子の一方または両方をさらに含み得る。したがって、特に上記の部分を含む多機能性、例えば多重特異性分子、それをコードする核酸、上記の分子を生成する方法、および上記の分子を用いて癌を治療する方法が本明細書において提供される。

20

【0185】

定義

ある実施形態において、多重特異性分子は、腫瘍標的化部分を含む。本明細書において使用される際の「腫瘍標的化部分」は、癌細胞中の標的を認識し、またはそれと関連する、例えばそれに結合する結合剤を指す。腫瘍標的化部分は、癌抗原（例えば、腫瘍および／または間質抗原）に結合する抗体分子、受容体分子（例えば、完全長受容体、受容体断片、またはその融合（例えば、受容体-Fc融合））、またはリガンド分子（例えば、完全長リガンド、リガンド断片、またはその融合（例えば、リガンド-Fc融合））であり得る。実施形態において、腫瘍標的化部分は、標的腫瘍に特異的に結合し、例えば標的腫瘍に選択的に結合する。例えば、腫瘍標的化部分が抗体分子である場合、それは、約10 nM未満、より典型的には10～100 pMの解離定数で癌抗原（例えば、腫瘍抗原および／または間質抗原）に結合する。

30

40

【0186】

ある実施形態において、多重特異性分子は、免疫細胞エンゲージャを含む。「免疫細胞エンゲージャ」は、免疫細胞、例えば免疫応答に関与する細胞に結合し、および／またはそれを活性化する1つまたは複数の結合特異性を指す。実施形態において、免疫細胞は、T細胞、NK細胞、B細胞、樹枝状細胞および／またはマクロファージ細胞から選択される。免疫細胞エンゲージャは、免疫細胞抗原（例えば、NK細胞抗原、B細胞抗原、樹枝状細胞抗原および／またはマクロファージ細胞抗原）に結合する抗体分子、受容体分子（例えば、完全長受容体、受容体断片、またはその融合（例えば、受容体-Fc融合））、またはリガンド分子（例えば、完全長リガンド、リガンド断片、またはその融合（例えば、リガンド-Fc融合））であり得る。実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、標的

50

免疫細胞に特異的に結合し、例えば標的免疫細胞に選択的に結合する。例えば、免疫細胞エンゲージャが抗体分子である場合、それは、約10 nM未満、より典型的には10～100 pMの解離定数で免疫細胞抗原（例えば、NK細胞抗原、B細胞抗原、樹枝状細胞抗原、および／またはマクロファージ細胞抗原）に結合する。

【0187】

ある実施形態において、多重特異性分子は、サイトカイン分子を含む。本明細書において使用される際、「サイトカイン分子」は、サイトカインの完全長、断片もしくは変異体を指し；サイトカインは、受容体ドメイン、例えばサイトカイン受容体二量体化ドメイン；または天然サイトカインの少なくとも1つの活性を引き出すサイトカイン受容体のアゴニスト、例えばサイトカイン受容体に対する抗体分子（例えば、作動性抗体）をさらに含む。ある実施形態において、サイトカイン分子は、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-7（IL-7）、インターロイキン-12（IL-12）、インターロイキン-15（IL-15）、インターロイキン-18（IL-18）、インターロイキン-21（IL-21）もしくはインターフェロン γ 、またはその断片もしくは変異体、あるいは上記のサイトカインのいずれかの組合せから選択される。サイトカイン分子は、モノマーまたは二量体であり得る。実施形態において、サイトカイン分子は、サイトカイン受容体二量体化ドメインをさらに含み得る。他の実施形態において、サイトカイン分子は、IL-15RaまたはIL-21Rから選択される、サイトカイン受容体のアゴニスト、例えばサイトカイン受容体に対する抗体分子（例えば、作動性抗体）である。

【0188】

本明細書において使用される際、例えば、抗体分子、サイトカイン分子、受容体分子中で使用される際の「分子」という用語は、非修飾（例えば、天然）分子の少なくとも1つの機能および／または活性が残っている限り、完全長の天然分子、ならびに変異体、例えば機能的変異体（例えば、切断、断片、変異形態（例えば、実質的に類似の配列）またはその誘導体化形態）を含む。

【0189】

ある実施形態において、多機能性分子は、間質調節部分を含む。本明細書において使用される際の「間質調節部分」は、間質の成分を変化させる、例えば分解することが可能な物質、例えばタンパク質（例えば、酵素）を指す。実施形態において、間質の成分は、例えば、ECM成分、例えばグリコサミノグリカン、例えばヒアルロナン（ヒアルロン酸またはHAとしても知られている）、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸、ヘパリン硫酸、ヘパリン、エンタクチン、テネイシン、アグリカンおよびケラチン硫酸；または細胞外タンパク質、例えばコラーゲン、ラミニン、エラスチン、フィブリノゲン、フィブロネクチンおよびビトロネクチンから選択される。

【0190】

「機能的変異体」という用語は、天然配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するか、または実質的に同一のヌクレオチド配列によってコードされ、天然配列の1つまたは複数の活性を有することが可能なポリペプチドを指す。

【0191】

いくつかの用語が以下に定義される。本明細書において使用される際、冠詞「1つの（a）」および「1つの（an）」は、1つまたは2つ以上、例えば少なくとも1つの冠詞の目的語を指す。本明細書における「含む」という用語とともに使用される場合、「1つの（a）」または「1つの（an）」という単語の使用は、「1つ」を意味し得るが、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」および「1つまたは2つ以上」の意味とも一致する。

【0192】

本明細書において使用される際、「約」および「およそ」は、一般に、測定の性質または精度を所与として測定される量の許容される誤差の程度を意味する。例示的な誤差の程度は、所与の範囲の値の20パーセント（%）以内、典型的に10%以内、より典型的に5%以内である。

【0193】

本明細書において使用される際の「抗体分子」は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質、例えば免疫グロブリン鎖またはその断片を指す。抗体分子は、抗体（例えば、完全長抗体）および抗体断片を包含する。一実施形態において、抗体分子は、完全長抗体の抗原結合または機能性断片、または完全長免疫グロブリン鎖を含む。例えば、完全長抗体は、天然であるか、または通常の免疫グロブリン遺伝子断片組み換えプロセス）によって形成される免疫グロブリン（Ig）分子（例えば、IgG抗体）である。実施形態において、抗体分子は、抗体断片など、免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な抗原結合部分を指す。抗体断片、例えば機能性断片は、抗体の一部、例えばFab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)₂、可変断片(Fv)、ドメイン抗体(dAb)、または一本鎖可変断片(scFv)である。機能性抗体断片は、完全な（例えば、完全長）抗体によって認識されるものと同じ抗原に結合する。「抗体断片」または「機能性断片」という用語は、重鎖および軽鎖の可変領域、または軽鎖および重鎖可変領域がペプチドリンカーによって連結された組み換え一本鎖ポリペプチド分子（「scFvタンパク質」）からなる「Fv」断片などの可変領域からなる単離断片も含む。ある実施形態において、抗体断片は、Fc断片または単一のアミノ酸残基などの抗原結合活性を有さない抗体の部分を含まない。例示的な抗体分子としては、完全長抗体および抗体断片、例えばdAb（ドメイン抗体）、一本鎖、Fab、Fab'、およびF(ab')₂断片、および一本鎖可変断片(scFvs)が挙げられる。

【0194】

本明細書において使用される際、「免疫グロブリン可変ドメイン配列」は、免疫グロブリン可変ドメインの構造を形成し得るアミノ酸配列を指す。例えば、配列は、天然可変ドメインのアミノ酸配列の全てまたは一部を含み得る。例えば、配列は、1つ、2つまたはそれを超えるN末端またはC末端アミノ酸を含んでいてもまたは含まなくてもよく、またはタンパク質構造の形成と適合する他の改変を含み得る。

【0195】

実施形態において、抗体分子は、単一特異性であり、例えば、それは、単一のエピトープに対する結合特異性を含む。ある実施形態において、抗体分子は、多重特異性であり、例えば、それは、複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列は、第1のエピトープに対する結合特異性を有し、第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列は、第2のエピトープに対する結合特異性を有する。ある実施形態において、抗体分子は、二重特異性抗体分子である。本明細書において使用される際の「二重特異性抗体分子」は、2つ以上の（例えば、2つ、3つ、4つまたはそれを超える）エピトープおよび／または抗原に対する特異性を有する抗体分子を指す。

【0196】

本明細書において使用される際の「抗原」(Ag)は、例えば、特定の免疫細胞の活性化および／または抗体産生に関与する免疫応答を引き起こし得る分子を指す。ほぼ全てのタンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が抗原であり得る。抗原はまた、ゲノム組み換え体またはDNAに由来し得る。例えば、免疫応答を引き起こすことが可能なタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分ヌクレオチド配列を含む任意のDNAが「抗原」をコードする。実施形態において、抗原は、遺伝子の完全長ヌクレオチド配列のみによってコードされる必要はなく、抗原は、1つの遺伝子によってコードされる必要も全くない。実施形態において、抗原は、合成され得るか、または生体サンプル、例えば組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞、または他の生物学的要素を含む体液に由来し得る。本明細書において使用される際、「腫瘍抗原」または同義的に「癌抗原」は、免疫応答を引き起こし得る、癌、例えば癌細胞または腫瘍微小環境に存在するかまたはそれと結合される任意の分子を含む。本明細書において使用される際、「免疫細胞抗原」は、免疫応答を引き起こし得る免疫細胞に存在するか、またはそれと結合される任意の分子を含む。

【0197】

抗体分子の「抗原結合部位」または「結合部分」は、抗原結合に関与する抗体分子、例えば免疫グロブリン(Ig)分子の部分に指す。実施形態において、抗原結合部位は、重鎖

10

20

30

40

50

(H) および軽鎖 (L) の可変 (V) 領域のアミノ酸残基によって形成される。高度可変領域と呼ばれる、重鎖および軽鎖の可変領域内の3つの極めて異なる区域が、「フレームワーク領域」(FR)と呼ばれるより保存される隣接区域間に配置される。FRは、免疫グロブリン中の高度可変領域間におよびそれに隣接して天然に見られるアミノ酸配列である。実施形態において、抗体分子中、軽鎖の3つの高度可変領域および重鎖の3つの高度可変領域は、結合された抗原の3次元空間に相補的な抗原結合表面を形成するように3次元空間中で互いに対して配置される。重鎖および軽鎖のそれぞれの3つの高度可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」と呼ばれる。フレームワーク領域およびCDRは、例えば、Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、および Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917に定義され、記載されている。各可変鎖(例えば、可変重鎖および可変軽鎖)は、典型的に、アミノ末端からカルボキシ末端にアミノ酸の順序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4で配置される3つのCDRおよび4つのFRから構成される。

【0198】

本明細書において使用される際の「癌」は、あらゆるタイプの発癌過程および／または癌性増殖を包含し得る。実施形態において、癌は、原発腫瘍ならびに転移性組織または悪性形質転換した細胞、組織、または器官を含む。実施形態において、癌は、あらゆる病理組織および段階、例えば癌の侵襲性／重症度の段階を包含する。実施形態において、癌は、再発性および／または耐性癌を含む。「癌」および「腫瘍」という用語は、同義的に使用され得る。例えば、両方の用語は、固形および液性腫瘍を包含する。本明細書において使用される際、「癌」または「腫瘍」という用語は、前癌性、ならびに悪性癌および腫瘍を含む。

【0199】

本明細書において使用される際、「免疫細胞」は、例えば、感染因子および異物から保護するために免疫系中で機能する様々な細胞のいずれかを指す。実施形態において、この用語は、白血球、例えば好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、および単球を含む。生来の白血球は、食細胞(例えば、マクロファージ、好中球、および樹枝状細胞)、肥満細胞、好酸球、好塩基球、およびナチュラルキラー細胞を含む。生来の白血球は、接触によってより大きい病原体を攻撃することにより、または微生物を取り込み、次にそれを殺滅することにより、病原体を同定および除去し、適応免疫応答の活性化におけるメディエータである。適応免疫系の細胞は、リンパ球と呼ばれる特殊なタイプの白血球である。B細胞およびT細胞は、リンパ球の重要なタイプであり、骨髄中の造血幹細胞に由来する。B細胞が、体液性免疫応答に関与する一方、T細胞は、細胞媒介性免疫応答に関与する。「免疫細胞」という用語は、免疫エフェクター細胞を含む。

【0200】

「免疫エフェクター細胞」は、その用語が本明細書において使用される際、例えば免疫エフェクター応答の促進において免疫応答に関与する細胞を指す。免疫エフェクター細胞の例としては、限定はされないが、T細胞、例えば α/β T細胞および γ/δ T細胞、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、ナチュラルキラーT(NK T)細胞および肥満細胞が挙げられる。

【0201】

「エフェクター機能」または「エフェクター応答」という用語は、細胞の特殊化した機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。

【0202】

本発明の組成物および方法は、所定の配列またはそれと実質的に同一もしくは類似の配列

10

20

30

40

50

、例えば所定の配列と少なくとも85%、90%、95%以上同一の配列を有するポリペプチドおよび核酸を包含する。アミノ酸配列に関して、「実質的に同一」という用語は、第1および第2のアミノ酸配列が、共通の構造ドメインおよび／または共通の機能活性を有し得るように、i) 第2のアミノ酸配列中のアライメントされたアミノ酸残基と同一である十分または最小数のアミノ酸残基、またはii) 第2のアミノ酸配列中のアライメントされたアミノ酸残基の保存的置換を含有する第1のアミノ酸を指すために本明細書において使用される。例えば、参照配列、例えば本明細書において提供される配列に対して少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する共通の構造ドメインを含有するアミノ酸配列である。

10

【0203】

ヌクレオチド配列に関して、「実質的に同一」という用語は、第1および第2のヌクレオチド配列が、共通の機能活性を有するポリペプチドをコードするか、または共通の構造ポリペプチドドメインまたは共通の機能ポリペプチド活性をコードするように、第2の核酸配列中のアライメントされたヌクレオチドと同一である十分または最小数のヌクレオチドを含有する第1の核酸配列を指すために本明細書において使用される。例えば、参照配列、例えば本明細書において提供される配列に対して少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するヌクレオチド配列である。

【0204】

配列間の相同性または配列同一性（これらの用語は、本明細書において同義的に使用される）の計算は、以下のように行われる。

20

【0205】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性パーセントを決定するために、配列は、最適な比較目的のためにアライメントされる（例えば、ギャップが、最適なアライメントのために第1および第2のアミノ酸または核酸配列の一方または両方に導入され得、非相同配列は、比較目的のために無視され得る）。好ましい実施形態において、比較目的のためにアライメントされた参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、60%、さらにより好ましくは少なくとも70%、80%、90%、100%である。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占有される場合、分子は、その位置において同一である（本明細書において使用される際、アミノ酸または核酸「同一性」は、アミノ酸または核酸「相同性」に相当する）。

30

【0206】

2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアライメントのために導入される必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮に入れて、配列が共有する同一の位置の数の関数である。

【0207】

配列の比較および2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学アルゴリズムを用いて行われ得る。好ましい実施形態において、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、B l o s s u m 62マトリックスまたはP A M 250マトリックスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重み付けおよび1、2、3、4、5、または6の長さ重み付けを用いて、G C Gソフトウェアパッケージ中のG A Pプログラム（<http://www.gcg.com>で入手可能）に組み込まれているN e e d l e m a nおよびW u n s c h（（1970）J. M o l. B i o l. 48:444-453）アルゴリズムを用いて決定される。さらに別の好ましい実施形態において、2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、N W S g a p d n a . C M Pマトリックスならびに40、50、60、70、または80のギャップ重み付けおよび1、2、3、4、5、または6の長さ重み付けを用いて、G C Gソフトウェアパッケージ中のG A Pプロ

40

50

グラム (<http://www.gcg.com>で入手可能)を用いて決定される。パラメータの特に好ましい組(および特に規定されない限り使用されるべきもの)は、12のギャップペナルティ、4のギャップ伸長ペナルティ、および5のフレームシフトギャップペナルティを用いたBlossum 62スコアリングマトリックスである。

【0208】

2つのアミノ酸またはヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、PAM120重み付け残基表、12のギャップ長ペナルティおよび4のギャップペナルティを用いて、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているE. MeyersおよびW. Miller((1989) CABIOS、4:11-17)のアルゴリズムを用いて決定され得る。

【0209】

本明細書に記載される核酸およびタンパク質配列は、例えば、他のファミリーメンバーまたは関連する配列を同定するために、公共のデータベースに対する検索を実施するための「クエリ配列」として使用され得る。このような検索は、Altschul, et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム(バージョン2.0)を用いて行われ得る。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて実施されて、本発明の核酸(例えば、配列番号1)分子と相同のヌクレオチド配列が得られる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて実施されて、本発明のタンパク分子と相同のアミノ酸配列が得られる。比較目的のためにギャップアラインメントを得るために、Gapped BLASTが、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されるように用いられ得る。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを用いる場合、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメータが使用され得る。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

【0210】

本発明の分子が、それらの機能に実質的な影響を与えないさらなる保存的または非必須アミノ酸置換を有し得ることが理解される。

【0211】

「アミノ酸」という用語は、アミノ官能基および酸官能基の両方を含み、天然アミノ酸のポリマーに含まれることが可能な全ての分子(天然または合成にかかわらず)を包含することが意図される。例示的なアミノ酸は、天然アミノ酸;その類似体、誘導体および同族体;変異側鎖を有するアミノ酸類似体;および上記のいずれかのいずれかの全ての立体異性体を含む。本明細書において使用される際、「アミノ酸」という用語は、D-またはL-光学異性体の両方およびペプチド模倣体を含む。

【0212】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されたものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β -分枝側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸を含む。

【0213】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」(一本鎖の場合)という用語は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために本明細書において同義的に使用される。ポリマーは、直鎖状または分枝鎖状であってもよく、それは、修飾アミノ酸を含んでもよく

10

20

30

40

50

、それは、非アミノ酸によって介在されてもよい。この用語は、修飾されている、例えばジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、アセチル化、リン酸化、または標識成分とのコンジュゲーションなどの任意の他の操作をされているアミノ酸ポリマーも包含する。ポリペプチドは、天然源から単離され得、真核生物または原核生物宿主から組み換え技術によって産生され得、または合成手順の産物であり得る。

【0214】

「核酸」、「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」または「ポリヌクレオチド配列」および「ポリヌクレオチド」という用語は、同義的に使用される。それらは、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、またはその類似体のいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖のいずれかであってもよく、一本鎖である場合、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であり得る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含み得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって介在され得る。ポリヌクレオチドは、標識成分とのコンジュゲーションなどにより、重合後にさらに修飾され得る。核酸は、天然に存在しないかまたは非天然配置で別のポリヌクレオチドと連結された組み換えポリヌクレオチド、またはゲノム、cDNA、半合成、もしくは合成起源のポリヌクレオチドであり得る。

【0215】

本明細書において使用される際の「単離された」という用語は、その元のまたは天然の環境（例えば、それが天然である場合、自然な環境）から取り出された物質を指す。例えば、生きている動物中に存在する天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されていないが、自然系における共存物質のいくつかまたは全てからのヒトの介入によって分離された同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されている。このようなポリヌクレオチドは、ベクターの一部であり得、および／またはこのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、組成物の一部であり得、このようなベクターまたは組成物は、それが天然に見られる環境の一部ではない点でなお単離されている。

【0216】

本発明の様々な態様が、以下にさらに詳述される。さらなる定義が本明細書全体を通して示される。

【0217】

抗体分子

一実施形態において、抗体分子は、癌抗原、例えば腫瘍抗原または間質抗原に結合する。ある実施形態において、癌抗原は、例えば、哺乳動物、例えばヒト癌抗原である。他の実施形態において、抗体分子は、免疫細胞抗原、例えば哺乳動物、例えばヒト免疫細胞抗原に結合する。例えば、抗体分子は、エピトープ、例えば癌抗原または免疫細胞抗原上の線形または立体構造エピトープに特異的に結合する。

【0218】

一実施形態において、抗体分子は、単一特異性抗体分子であり、単一のエピトープに結合する。例えば、それぞれが同じエピトープに結合する複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列を有する単一特異性抗体分子である。

【0219】

一実施形態において、抗体分子は、多重特異性抗体分子であり、例えば、それは、複数の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、複数の第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列は、第1のエピトープに対する結合特異性を有し、複数の第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列は、第2のエピトープに対する結合特異性を有する。一実施形態において、第1および第2のエピトープは、同じ抗原、例えば同じタンパク質（または多量体タンパク質のサブユニット）上にある。一実施形態において、第1および第2のエピトープは重複する。一実施形態において、第1および第2のエピトープは重複しない。一実施形態において、第1および第2のエピトープは、異なる抗原、例えば異なるタンパク質（または多量体タンパク質の異なるサブユニット）上にある。一実施形態において、多重特異性抗体分

10

20

30

40

50

子は、第3、第4または第5の免疫グロブリン可変ドメインを含む。一実施形態において、多重特異性抗体分子は、二重特異性抗体分子、三重特異性抗体分子または四重特異性抗体分子である。

【0220】

一実施形態において、多重特異性抗体分子は、二重特異性抗体分子である。二重特異性抗体は、2つ以下の抗原に対する特異性を有する。二重特異性抗体分子は、第1のエピトープに対する結合特異性を有する第1の免疫グロブリン可変ドメイン配列および第2のエピトープに対する結合特異性を有する第2の免疫グロブリン可変ドメイン配列によって特徴付けられる。一実施形態において、第1および第2のエピトープは、同じ抗原、例えば同じタンパク質（または多量体タンパク質のサブユニット）上にある。一実施形態において、第1および第2のエピトープは重複する。一実施形態において、第1および第2のエピトープは重複しない。一実施形態において、第1および第2のエピトープは、異なる抗原、例えば異なるタンパク質（または多量体タンパク質の異なるサブユニット）上にある。一実施形態において、二重特異性抗体分子は、第1のエピトープに対する結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列ならびに第2のエピトープに対する結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列を含む。一実施形態において、二重特異性抗体分子は、第1のエピトープに対する結合特異性を有する半抗体および第2のエピトープに対する結合特異性を有する半抗体を含む。一実施形態において、二重特異性抗体分子は、第1のエピトープに対する結合特異性を有する半抗体またはその断片、および第2のエピトープに対する結合特異性を有する半抗体またはその断片を含む。一実施形態において、二重特異性抗体分子は、第1のエピトープに対する結合特異性を有するs c F vもしくはF a bまたはその断片、および第2のエピトープに対する結合特異性を有するs c F vもしくはF a bまたはその断片を含む。

【0221】

一実施形態において、抗体分子は、ダイアボディ、および一本鎖分子、ならびに抗体の抗原結合断片（例えば、F a b、F (a b')₂、およびF v）を含む。例えば、抗体分子は、重（H）鎖可変ドメイン配列（本明細書においてV Hと略記される）、および軽（L）鎖可変ドメイン配列（本明細書においてV Lと略記される）を含み得る。一実施形態において、抗体分子は、重鎖および軽鎖（本明細書において半抗体と呼ばれる）を含むまたはそれからなる。別の例において、抗体分子は、2つの重（H）鎖可変ドメイン配列および2つの軽（L）鎖可変ドメイン配列を含み、それによりF a b、F a b'、F (a b')₂、F c、F d、F d'、F v、一本鎖抗体（例えばs c F v）、単一の可変ドメイン抗体、ダイアボディ（D a b）（二価および二重特異性）、およびキメラ（例えば、ヒト化）抗体などの2つの抗原結合部位を形成し、これは、全抗体の修飾によって産生されてもよく、または組み換えDNA技術を用いてデノボ合成されたものである。これらの機能的抗体断片は、それらのそれぞれの抗原または受容体と選択的に結合する能力を保持する。抗体および抗体断片は、限定はされないが、I g G、I g A、I g M、I g D、およびI g Eを含む任意のクラスの抗体、および抗体の任意のサブクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4）に由来し得る。抗体分子の調製物は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。抗体分子はまた、ヒト、ヒト化、C D R移植、またはインビトロで産生された抗体であり得る。抗体は、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4から選択される重鎖定常領域を有し得る。抗体は、例えば、κまたはλから選択される軽鎖も有し得る。「免疫グロブリン」（I g）という用語は、本明細書における「抗体」という用語と同義的に使用される。

【0222】

抗体分子の抗原結合断片の例としては、(i) F a b断片、V L、V H、C LおよびC H 1ドメインからなる一価断片；(i i) F (a b')₂断片、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結される2つのF a b断片を含む二価断片；(i i i) V HおよびC H 1ドメインからなるF d断片；(i v) 抗体の単一アームのV LおよびV HドメインからなるF v断片、(v) V Hドメインからなるダイアボディ（d A b）断片；(v i) ラ

クダ科またはラクダ化可変ドメイン；(vii) 一本鎖Fv (scFv) (例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426；およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照)；(viii) 単一ドメイン抗体が挙げられる。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技術を用いて得られ、断片は、完全な抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。

【0223】

抗体分子は、完全な分子ならびにその機能性断片を含む。抗体分子の定常領域は、抗体の特性を調節するために(例えば、Fc受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基の数、エフェクター細胞機能、または補体機能の1つまたは複数を増加または減少させるために)、改変、例えば変異され得る。

【0224】

抗体分子はまた、単一ドメイン抗体であり得る。単一ドメイン抗体は、相補性決定領域が単一ドメインポリペプチドの一部である抗体を含み得る。例としては、限定はされないが、重鎖抗体、軽鎖を生来含まない抗体、従来の4鎖抗体に由来する単一ドメイン抗体、操作抗体および抗体に由来するもの以外の単一ドメイン足場が挙げられる。単一ドメイン抗体は、最先端のまたは任意の将来の単一ドメイン抗体のいずれかであり得る。単一ドメイン抗体は、限定はされないが、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、魚、サメ、ヤギ、ウサギ、およびウシを含む任意の種に由来し得る。本発明の別の態様によれば、単一ドメイン抗体は、軽鎖を含まない重鎖抗体として知られている天然の単一ドメイン抗体である。このような単一ドメイン抗体は、例えば、国際公開第9404678号パンフレットに開示されている。明確にするために、軽鎖を生来含まない重鎖抗体に由来するこの可変ドメインは、4鎖免疫グロブリンの従来のVHと区別するために、本明細書においてVHHまたはナノボディとして知られている。このようなVHH分子は、ラクダ科(Camelidae)種、例えばラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカおよびグアナコ中で育てられた抗体に由来し得る。ラクダ科(Camelidae)以外の他の種が、軽鎖を生来含まない重鎖抗体を産生することができ；このようなVHHは、本発明の範囲内である。

【0225】

VHおよびVL領域は、「フレームワーク領域」(FRまたはFW)と呼ばれる、より保存される領域が分散した、「相補性決定領域」(CDR)と呼ばれる超変異性の領域に細分され得る。

【0226】

フレームワーク領域およびCDRの程度は、いくつかの方法によって厳密に定義されている(Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; およびOxford Molecular's AbM抗体モデリングソフトウェアによって使用されるAbM定義を参照されたい。一般に、例えば、Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg)を参照されたい。

【0227】

本明細書において使用される際の「相補性決定領域」および「CDR」という用語は、抗原特異性および結合親和性を与える抗体可変領域内のアミノ酸の配列を指す。一般に、各重鎖可変領域に3つのCDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3)および各軽鎖可変領域に3つのCDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)がある。

【0228】

所与のCDRの厳密なアミノ酸配列境界は、Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (「Kabat」番号付けスキーム)、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (「Chothia」番号付けスキーム) によって記載されるものを含むいくつかの公知のスキームのいずれかを用いて決定され得る。本明細書において使用される際、「Chothia」番号付けスキームに従って定義されるCDRは、「高度可変ループ」と呼ばれることもある。

【0229】

例えば、Kabatにより、重鎖可変ドメイン(VH)中のCDRアミノ酸残基は、31~35(HCDR1)、50~65(HCDR2)、および95~102(HCDR3)と番号付けされ；軽鎖可変ドメイン(VL)中のCDRアミノ酸残基は、24~34(LCDR1)、50~56(LCDR2)、および89~97(LCDR3)と番号付けされる。Chothiaにより、VH中のCDRアミノ酸は、26~32(HCDR1)、52~56(HCDR2)、および95~102(HCDR3)と番号付けされ；VL中のアミノ酸残基は、26~32(LCDR1)、50~52(LCDR2)、および91~96(LCDR3)と番号付けされる。

【0230】

各VHおよびVLは、典型的に、アミノ末端からカルボキシ末端に以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置される3つのCDRおよび4つのFRを含む。

【0231】

抗体分子は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であり得る。

【0232】

本明細書において使用される際の「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、単一分子組成物の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術により、またはハイブリドーマ技術を使用しない方法(例えば、組み換え方法)により作製され得る。

【0233】

抗体は、組み換えにより産生され、例えばファージディスプレイによってまたはコンビナトリアル法によって産生され得る。

【0234】

抗体を産生するためのファージディスプレイおよびコンビナトリアル法は、当該技術分野において公知である(例えば、Ladnerらの米国特許第5,223,409号明細書；Kangらの国際公開第92/18619号パンフレット；Dowerらの国際公開第91/17271号パンフレット；Winterらの国際公開第92/20791号パンフレット；Marklandらの国際公開第92/15679号パンフレット；Breitlingらの国際公開第93/01288号パンフレット；McCaffertyらの国際公開第92/01047号パンフレット；Garrardらの国際公開第92/09690号パンフレット；Ladnerらの国際公開第90/02809号パンフレット；Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372；Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridoma 3:81-85；Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281；Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734；Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896；Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628；Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580；Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373

－1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19: 4133-4137; および Barbas et al. (1991) PNAS 88: 7978-7982 (これらの全ての内容が参照により本明細書に援用される) に記載されているように)。

【0235】

一実施形態において、抗体は、完全ヒト抗体（例えば、ヒト免疫グロブリン配列から抗体を産生するように遺伝子操作されたマウス中で作製された抗体）、または非ヒト抗体、例えばげっ歯類（マウスまたはラット）、ヤギ、霊長類（例えば、サル）、ラクダ抗体である。好ましくは、非ヒト抗体は、げっ歯類（マウスまたはラット抗体）である。げっ歯類抗体を産生する方法は、当該技術分野において公知である。

10

【0236】

ヒトモノクローナル抗体は、マウス系より、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスを用いて産生され得る。対象とする抗原で免疫化したこれらのトランスジェニックマウスに由来する脾細胞が、ヒトタンパク質からのエピトープに対する特異的親和性を有するヒトmAbを分泌するハイブリドーマを産生するのに使用される（例えば、Woodらの国際出願国際公開第91/00906号パンフレット、KucherlapatiらのPCT公開国際公開第91/10741号パンフレット; Lonbergらの国際出願国際公開第92/03918号パンフレット; Kayらの国際公開第92/03917号パンフレット; Lonberg, N. et al. 1994 Nature 368: 856-859; Green, L. L. et al. 1994 Nature Genet. 7: 13-21; Morrison, S. L. et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855; Bruggeman et al. 1993 Year Immunol 7: 33-40; Tuailon et al. 1993 PNAS 90: 3720-3724; Bruggeman et al. 1991 Eur J Immunol 21: 1323-1326を参照）。

20

【0237】

抗体分子は、可変領域またはその一部、例えばCDRが非ヒト生物、例えばラットまたはマウス中で産生されたものであり得る。キメラ、CDR移植、およびヒト化抗体は、本発明の範囲内である。非ヒト生物、例えばラットまたはマウス中で産生され、次にヒトにおける抗原性を減少させるように、例えば可変フレームワークまたは定常領域中で修飾された抗体分子は、本発明の範囲内である。

30

【0238】

「効果的ヒト」タンパク質は、中和抗体応答、例えばヒト抗マウス抗体（HAMA）応答を実質的に誘発しないタンパク質である。HAMAは、多くの状況において、例えば、抗体分子が、例えば慢性または再発性の病態の治療において繰り返し投与される場合に問題となり得る。HAMA応答は、血清からの抗体クリアランスの増加のため（例えば、Saleh et al., Cancer Immunol. Immunother., 32: 180-190 (1990) を参照）およびさらにアレルギー反応の可能性のため（例えば、LoBuglio et al., Hybridoma, 5: 5117-5123 (1986) を参照）、繰り返しの抗体投与を無効にする可能性があり得る。

40

【0239】

キメラ抗体は、当該技術分野において公知の組み換えDNA技術によって産生され得る（Robinsonら、国際特許公開PCT/米国特許第86/02269号明細書; Akiraら、欧州特許出願第184,187号明細書; Taniguchi, M., 欧州特許出願第171,496号明細書; Morrisonら、欧州特許出願第173,494号明細書; Neubergerら、国際出願国際公開第86/01533号パンフレット; Cabillyらの米国特許第4,816,567号明細書; Cabillyら、欧州特許出願第125,023号明細書; Better et al. (1988 Science 240: 1041-1043); Liu et al. (1987) PNAS 84: 3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:

50

3521-3526; Sun et al. (1987) PNAS 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; および Shaw et al., 1988, J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559を参照)。

【0240】

ヒト化またはCDR移植抗体は、ドナーCDRで置き換えられた、少なくとも1つまたは2つであるが、一般に3つ全ての（重およびまたは軽免疫グロブリン鎖の）レシピエントCDRを有する。抗体は、非ヒトCDRの少なくとも一部で置き換えられてもよく、またはCDRのいくつかのみが非ヒトCDRで置き換えられ得る。抗原への結合に必要な数のCDRを置き換えるのみでよい。好ましくは、ドナーは、げっ歯類抗体、例えばラットまたはマウス抗体であり、レシピエントは、ヒトフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークである。典型的に、CDRを提供する免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供する免疫グロブリンは、「アクセプター」と呼ばれる。一実施形態において、ドナー免疫グロブリンは、非ヒト（例えば、げっ歯類）である。アクセプターフレームワークは、天然（例えば、ヒト）フレームワークまたはコンセンサスフレームワーク、またはそれと約85%以上、好ましくは90%、95%、99%以上同一の配列である。

【0241】

本明細書において使用される際、「コンセンサス配列」という用語は、関連配列のファミリーにおいて最も高い頻度で存在するアミノ酸（またはヌクレオチド）から形成される配列を指す（例えば、Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987を参照)。タンパク質のファミリーにおいて、コンセンサス配列における各位置は、ファミリーにおけるその位置に最も高い頻度で存在するアミノ酸によって占有される。2つのアミノ酸が等しい頻度で存在する場合、いずれもコンセンサス配列に含まれ得る。「コンセンサスフレームワーク」は、コンセンサス免疫グロブリン配列におけるフレームワーク領域を指す。

【0242】

抗体分子は、当該技術分野において公知の方法によってヒト化され得る（例えば、Morrisson, S. L., 1985, Science 229:1202-1207、Oiet al., 1986, BioTechniques 4:214、およびQueenらの米国特許第5,585,089号明細書、米国特許第5,693,761号明細書および米国特許第5,693,762号明細書（これらの全ての内容が参照により本明細書に援用される）を参照）。

【0243】

ヒト化またはCDR移植抗体分子は、CDR移植またはCDR置換によって産生され得、免疫グロブリン鎖の1つ、2つまたは全てのCDRが置換され得る。例えば、米国特許第5,225,539号明細書; Jones et al. 1986 Nature 321:552-525; Verhoeyan et al. 1988 Science 239:1534; Beidler et al. 1988 J. Immunol. 141:4053-4060; Winterの米国特許第5,225,539号明細書（これらの全ての内容が参照により本明細書に明示的に援用される）を参照されたい。Winterは、本発明のヒト化抗体を調製するのに使用され得るCDR移植方法を記載しており（1987年3月26日に出版された英国特許出願GB 2188638A号明細書; Winterの米国特許第5,225,539号明細書）、その内容が参照により明示的に援用される。

【0244】

特異的アミノ酸が置換、欠失または付加されているヒト化抗体分子も本発明の範囲内である。ドナーからアミノ酸を選択する基準は、米国特許第5,585,089号明細書、例

10

20

30

40

50

例えば米国特許第5,585,089号明細書の第12～16欄、例えば米国特許第5,585,089号明細書の第12～16欄に記載され、これらの内容が参照により本明細書に援用される。抗体をヒト化するための他の技術は、1992年12月23日に公開されたPadlanらの欧州特許出願公開第519596 A1号明細書に記載されている。

【0245】

抗体分子は、一本鎖抗体であり得る。一本鎖抗体(s c F V)は、操作されていてもよい(例えば、Colcher, D. et al. (1999) Ann N Y Acad Sci 880:263-80; およびReiter, Y. (1996) Clin Cancer Res 2:245-52を参照)。一本鎖抗体は、同じ標的タンパク質の異なるエピトープに対する特異性を有する多価抗体を産生するように二量体化または多量体化され得る。

10

【0246】

さらに他の実施形態において、抗体分子は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、およびIgEの重鎖定常領域から選択され;特に例えばIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4の(例えば、ヒト)重鎖定常領域から選択される重鎖定常領域を有する。別の実施形態において、抗体分子は、例えば、κまたはλの(例えば、ヒト)軽鎖定常領域から選択される軽鎖定常領域を有する。定常領域は、抗体の特性を調節するために(例えば、Fc受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基の数、エフェクター細胞機能、および/または補体機能の1つまたは複数を増加または減少させるために)、改変、例えば変異され得る。一実施形態において、抗体は、エフェクター機能を有し;補体を固定することができる。他の実施形態において、抗体は、エフェクター細胞を動員せず;または補体を固定しない。別の実施形態において、抗体は、Fc受容体に結合する減少した能力を有するかまたはそのような能力を有さない。例えば、それは、Fc受容体への結合を支持しないアイソタイプまたはサブタイプ、断片または他の変異体であり、例えば、それは、突然変異したまたは欠失したFc受容体結合領域を有する。

20

【0247】

抗体定常領域を改変するための方法は、当該技術分野において公知である。改変された機能、例えば細胞上のFcR、または補体のC1成分などのエフェクターリガンドに対する改変された親和性を有する抗体は、抗体の定常部分中の少なくとも1つのアミノ酸残基を異なる残基で置換することによって生成され得る(例えば、欧州特許出願公開第388,151 A1号明細書、米国特許第5,624,821および米国特許第5,648,260号明細書(これらの全ての内容が参照により本明細書に援用される)を参照)。マウス、または他の種に適用される場合、免疫グロブリンがこれらの機能を減少させるかまたはなくす類似のタイプの改変が記載され得る。

30

【0248】

抗体分子は、別の機能的分子(例えば、別のペプチドまたはタンパク質)に誘導体化または連結され得る。本明細書において使用される際、「誘導体化」抗体分子は、修飾されているものである。誘導体化の方法としては、限定はされないが、蛍光部分、放射性ヌクレオチド、毒素、酵素またはビオチンなどの親和性リガンドの付加が挙げられる。したがって、本発明の抗体分子は、免疫接着分子を含む、本明細書に記載される抗体の、誘導体化および他の形態で修飾された形態を含むことが意図される。例えば、抗体分子は、別の抗体(例えば、二重特異性抗体またはダイアボディ)、検出可能薬剤、細胞毒性剤、医薬品、および/または抗体または抗体部分と別の分子との結合を媒介し得るタンパク質またはペプチド(ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグなど)などの1つまたは複数の他の分子実体に(化学的結合、遺伝子融合、非共有結合的結合またはその他によって)機能的に連結され得る。

40

【0249】

誘導体化抗体分子の1つのタイプは、(例えば、二重特異性抗体を産生するために同じタイプまたは異なるタイプの)2つ以上の抗体を架橋することによって産生される。好適な

50

架橋剤は、適切なスペーサによって隔てられた2つの明確に反応性の基を有するヘテロ二機能性（例えば、*m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）またはホモ二機能性（例えば、スベリン酸ジサクシンイミジル）であるものを含む。このようなリンカーは、Pierce Chemical Company (Rockford, IL) から入手可能である。

【0250】

多重特異性抗体分子

本明細書に定義される多重特異性および多機能性分子の例示的な構造が全体を通して記載されている。例示的な構造は、Weidle U et al. (2013) *The Intriguing Options of Multispecific Antibody Formats for Treatment of Cancer*. *Cancer Genomics & Proteomics* 10:1-18 (2013); および Spiess C et al. (2015) *Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies*. *Molecular Immunology* 67:95-106 (これらのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される) にさらに記載されている。

【0251】

実施形態において、多重特異性抗体分子は、2つ以上の抗原結合部位を含むことができ、異なる部位は、異なる抗原に対して特異的である。実施形態において、多重特異性抗体分子は、同じ抗原上の1つを超える（例えば、2つ以上の）エピトープに結合し得る。実施形態において、多重特異性抗体分子は、標的細胞（例えば、癌細胞）に対して特異的な抗原結合部位、および免疫エフェクター細胞に対して特異的な異なる抗原結合部位を含む。一実施形態において、多重特異性抗体分子は、二重特異性抗体分子である。二重特異性抗体分子は、5つの異なる構造グループ：(i) 二重特異性免疫グロブリンG (BsIgG)；(ii) さらに抗原結合部分が付加されたIgG；(iii) 二重特異性抗体断片；(iv) 二重特異性融合タンパク質；および(v) 二重特異性抗体コンジュゲートに分類され得る。

【0252】

BsIgGは、各抗原に対して一価のフォーマットである。例示的なBsIgGフォーマットとしては、限定はされないが、crossMab、DAF（ツウ・イン・ワン）、DAF（フォー・イン・ワン）、DutaMab、DT-IgG、ノブ・イン・ホール共通LC、ノブ・イン・ホールアセンブリ、荷電対、Fabアーム交換、SEEDボディ、トリオマブ、LUZ-Y、Fcab、κλ-ボディ、直交性Fabが挙げられる。Spiess et al. *Mol. Immunol.* 67 (2015): 95-106を参照されたい。例示的なBsIgGとしては、抗CD3アームおよび抗EpCAMアームを含有するカツマキソマブ (Fresenius Biotech, Trion Pharma, Neopharm)；およびCD3およびHER2を標的にするエルツマキソマブ (Neovii Biotech, Fresenius Biotech) が挙げられる。ある実施形態において、BsIgGは、ヘテロ二量体化のために操作される重鎖を含む。例えば、重鎖は、「ノブ・イントゥ・ホール」手法、SEEDプラットフォーム、共通の重鎖（例えば、κλ-ボディ中）、およびヘテロ二量体Fc領域の使用を用いてヘテロ二量体化のために操作され得る。Spiess et al. *Mol. Immunol.* 67 (2015): 95-106を参照されたい。BsIgG中のホモ二量体の重鎖対合を避けるのに使用されている手法としては、ノブ・イン・ホール、デュオボディ、アジメトリック、荷電対、HA-TF、SEEDボディ、および示差タンパク質A親和性が挙げられる。同文献を参照されたい。BsIgGは、異なる宿主細胞中の成分抗体の別個の発現およびその後の精製／BsIgGへの組み立てによって生成され得る。BsIgGはまた、単一の宿主細胞中の成分抗体の発現によって産生され得る。BsIgGは、親和性クロマトグラフィーを用いて、例えばタンパク質Aおよび逐次pH溶出を用いて精製され得る。

10

20

30

40

50

【0253】

さらなる抗原結合部分が付加されたIgGは、二重特異性抗体分子の別のフォーマットである。例えば、単一特異性IgGは、例えば、重鎖または軽鎖のいずれかのN-またはC末端において、さらなる抗原結合単位を単一特異性IgG上に付加することにより、二重特異性を有するように操作され得る。例示的なさらなる抗原結合単位としては、単一ドメイン抗体（例えば、可変重鎖または可変軽鎖）、操作タンパク質足場、および対になった抗体可変ドメイン（例えば、一本鎖可変断片または可変断片）が挙げられる。同文献を参照されたい。付加されたIgGフォーマットの例としては、二重可変ドメインIgG（DVD-Ig）、IgG（H）-scFv、scFv-（H）IgG、IgG（L）-scFv、scFv-（L）IgG、IgG（L，H）-Fv、IgG（H）-V、V（H）-IgG、IgG（L）-V、V（L）-IgG、KIH IgG-scFab、2scFv-IgG、IgG-2scFv、scFv4-Ig、ザイボディ、およびDVI-IgG（フォー・イン・ワン）が挙げられる。Spiess et al. Mol. Immunol. 67（2015）：95-106を参照されたい。IgG-scFvの例は、IGF-1RおよびHER3に結合するMM-141（Merrimack Pharmaceuticals）である。DVD-Igの例としては、IL-1αおよびIL-1βに結合するABT-981（AbbVie）；およびTNFおよびIL-17Aに結合するABT-122（AbbVie）が挙げられる。

10

【0254】

二重特異性抗体断片（BsAb）は、抗体定常ドメインのいくつかまたは全てを欠く二重特異性抗体分子のフォーマットである。例えば、いくつかのBsAbは、Fc領域を欠いている。実施形態において、二重特異性抗体断片は、単一の宿主細胞中のBsAbの効率的な発現を可能にするペプチドリンカーによって連結される重鎖および軽鎖領域を含む。例示的な二重特異性抗体断片としては、限定はされないが、ナノボディ、ナノボディーHAS、BiTE、ダイアボディ、DART、TandAb、scダイアボディ、scダイアボディーCH3、ダイアボディーCH3、トリプルボディ、ミニ抗体、ミニボディ、TriBiミニボディ、scFv-CH3 KIH、Fab-scFv、scFv-CH-CL-scFv、F（ab'）₂、F（ab'）₂-scFv₂、scFv-KIH、Fab-scFv-Fc、四価HCAb、scダイアボディーFc、ダイアボディーFc、タンデムscFv-Fc、および細胞内抗体が挙げられる。同文献を参照されたい。例えば、BiTEフォーマットは、タンデムscFvsを含み、成分scFvは、T細胞上のCD3および癌細胞上の表面抗原に結合する。

20

30

【0255】

二重特異性融合タンパク質は、例えば、さらなる特異性および／または機能性を付加するために、他のタンパク質に連結される抗体断片を含む。二重特異性融合タンパク質の例は、HLA提示ペプチドを認識する親和性成熟T細胞受容体に連結される抗CD3 scFvを含むimmTACである。実施形態において、ドック・アンド・ロック（DNL）方法を用いて、より高い原子価を有する二重特異性抗体分子を生成することができる。また、アルブミン結合タンパク質またはヒト血清アルブミンへの融合は、抗体断片の血清半減期を延長することができる。同文献を参照されたい。

40

【0256】

実施形態において、化学的コンジュゲーション、例えば、抗体および／または抗体断片の化学的コンジュゲーションを用いてBsAb分子を生成することができる。同文献を参照されたい。例示的な二重特異性抗体コンジュゲートとしては、低分子量薬剤が各Fabアームまたは抗体またはその断片中の単一の反応性リジンに部位特異的にコンジュゲートされる、CovX-ボディフォーマットが挙げられる。実施形態において、コンジュゲーションにより、低分子量薬剤の血清半減期が向上される。例示的なCovX-ボディは、VEGFまたはAng2のいずれかを阻害する2つの短鎖ペプチドにコンジュゲートされた抗体を含むCVX-241（NCT01004822）である。同文献を参照されたい。

【0257】

50

抗体分子は、例えば、宿主系における少なくとも1つまたは複数の成分の組み換え発現によって生成され得る。例示的な宿主系としては、真核細胞（例えば、哺乳類細胞、例えばCHO細胞、または昆虫細胞、例えばSF9またはS2細胞）および原核細胞（例えば、大腸菌（*E. coli*））が挙げられる。二重特異性抗体分子は、異なる宿主細胞中の成分の別個の発現およびその後の精製／組み立てによって生成され得る。あるいは、抗体分子は、単一の宿主細胞中の成分の発現によって生成され得る。二重特異性抗体分子の精製は、例えば、タンパク質Aおよび逐次pH溶出を用いた親和性クロマトグラフィーなどの様々な方法によって行われ得る。他の実施形態において、親和性タグは、精製、例えばヒスチジン含有タグ、mycタグ、またはストレプトアビジンタグに使用され得る。

【0258】

CDR移植足場

実施形態において、抗体分子は、CDR移植足場ドメインである。実施形態において、足場ドメインは、フィブロネクチンドメイン、例えばフィブロネクチンIII型ドメインに基づいている。フィブロネクチンIII型（Fn3）ドメインの全体的な折り畳みは、最小機能抗体断片、抗体重鎖の可変ドメインのものと密接に関連している。Fn3の末端に3つのループがあり；BC、DEおよびFGループの位置は、抗体のVHドメインのCDR1、2および3の位置にほぼ相当する。Fn3は、ジスルフィド結合を有さず；したがって、Fn3は、抗体およびそれらの断片と異なり、還元条件下で安定している（例えば、国際公開第98／56915号パンフレット；国際公開第01／64942号パンフレット；国際公開第00／34784号パンフレットを参照）。Fn3ドメインは、例えば、本明細書に記載される抗原／マーカー／細胞に結合するドメインを選択するように、（例えば、本明細書に記載されるCDRまたは高度可変ループを用いて）修飾または変異され得る。

【0259】

実施形態において、足場ドメイン、例えば折り畳みドメインは、抗体、例えばモノクローナル抗体の重鎖可変ドメインから3つのβ鎖を削除することによって作成される「ミニボディ」足場に基づいている（例えば、Tramontano et al., 1994, J Mol. Recognit. 7:9；およびMartin et al., 1994, EMBO J. 13:5303-5309を参照）。「ミニボディ」は、2つの高度可変ループを提示するように使用され得る。実施形態において、足場ドメインは、V様ドメイン（例えば、Coiaらの国際公開第99／45110号パンフレットを参照）または2つのジスルフィド結合によってつなが合わされた74残基の6鎖βシートサンドイッチであるテンダミスタチンに由来するドメイン（例えば、McConnell and Hoess, 1995, J Mol. Biol. 250:460を参照）である。例えば、テンダミスタチンのループは、例えば、本明細書に記載されるマーカー／抗原／細胞に結合するドメインを選択するように（例えば、CDRまたは高度可変ループを用いて）修飾または変異され得る。別の例示的な足場ドメインは、CTLA-4の細胞外ドメインに由来するβ-サンドイッチ構造である（例えば、国際公開第00／60070号パンフレットを参照）。

【0260】

他の例示的な足場ドメインとしては、限定はされないが、T細胞受容体；MHCタンパク質；細胞外ドメイン（例えば、フィブロネクチンIII型リピート、EGFリピート）；プロテアーゼ阻害剤（例えば、Kunitzドメイン、エコチン、BPTIなど）；TPRリピート；三葉構造；亜鉛フィンガードメイン；DNA結合タンパク質；特に、モノマーDNA結合タンパク質；RNA結合タンパク質；酵素、例えばプロテアーゼ（特に不活性化プロテアーゼ）、RNase；シャペロン、例えばチオレドキシン、および熱ショックタンパク質；および細胞内シグナル伝達ドメイン（SH2およびSH3ドメインなど）が挙げられる。例えば、米国特許出願公開第20040009530号明細書および米国特許第7,501,121号明細書（参照により本明細書に援用される）を参照されたい。

【0261】

実施形態において、足場ドメインは、例えば、以下の基準の1つまたは複数によって評価および選択される：（１）アミノ酸配列、（２）いくつかの相同ドメインの配列、（３）３次元構造、および／または（４）一連のpH、温度、塩分、有機溶媒、酸化剤濃度にわたる安定性データ。実施形態において、足場ドメインは、小さい安定したタンパク質ドメイン、例えば100、70、50、40または30未満のアミノ酸のタンパク質である。ドメインは、1つまたは複数のジスルフィド結合を含んでもよく、または金属、例えば亜鉛をキレートし得る。

【0262】

抗体に基づく融合

抗体のNまたはC末端に結合されるさらなる結合実体を含有する様々なフォーマットが生成され得る。一本鎖またはジスルフィド安定化FvまたはFabとのこれらの融合は、各抗原に対する二価結合特異性を有する四価分子の生成をもたらす。scFvおよびscFabと、IgGとの組合せは、3つ以上の異なる抗原を認識し得る分子の生成を可能にする。

【0263】

抗体-Fab融合

抗体-Fab融合は、第1の標的に対する従来の抗体、および抗体重鎖のC末端に融合された第2の標的に対するFabを含む二重特異性抗体である。一般的に、この抗体およびFabは、共通の軽鎖を有するであろう。抗体融合は、（１）標的融合のDNA配列を操作し、（２）融合タンパク質を発現するように、標的DNAを好適な宿主細胞へとトランスフェクトすることによって生成され得る。抗体-scFv融合は、Coloma, J. et al. (1997) Nature Biotech 15:159によって記載されているように、CH3ドメインのC末端とscFvのN末端との間の(Gly)-Serリンカーによって連結され得るようである。

【0264】

抗体-scFv融合

抗体-scFv融合は、従来の抗体、および抗体重鎖のC末端に融合された独自の特異性のscFvを含む二重特異性抗体である。scFvは、直接またはリンカーペプチドを介して、scFvの重鎖を介してC末端に融合され得る。抗体融合は、（１）標的融合のDNA配列を操作し、（２）融合タンパク質を発現するように、標的DNAを好適な宿主細胞へとトランスフェクトすることによって生成され得る。抗体-scFv融合は、Coloma, J. et al. (1997) Nature Biotech 15:159によって記載されているように、CH3ドメインのC末端とscFvのN末端との間の(Gly)-Serリンカーによって連結され得るようである。

【0265】

可変ドメイン免疫グロブリンDVD

関連するフォーマットは、短鎖リンカー配列によってVドメインのN末端に配置される、第2の特異性のVHおよびVLドメインから構成される二重可変ドメイン免疫グロブリン(DVD)である。

【0266】

他の例示的な多重特異性抗体フォーマットとしては、例えば、以下のもの、米国特許出願公開第20160114057A1号明細書、米国特許出願公開第20130243775A1号明細書、米国特許出願公開第20140051833号明細書、米国特許出願公開第20130022601号明細書、米国特許出願公開第20150017187A1号明細書、米国特許出願公開第20120201746A1号明細書、米国特許出願公開第20150133638A1号明細書、米国特許出願公開第20130266568A1号明細書、米国特許出願公開第20160145340A1号明細書、国際公開第2015127158A1号パンフレット、米国特許出願公開第20150203591A1号明細書、米国特許出願公開第20140322221A1号明細書、米国特許出願公開第20130303396A1号明細書、米国特許出願公開第20110293613号

10

20

30

40

50

明細書、米国特許出願公開第20130017200A1号明細書、米国特許出願公開第20160102135A1号明細書、国際公開第2015197598A2号パンフレット、国際公開第2015197582A1号パンフレット、米国特許第9359437号明細書、米国特許出願公開第20150018529号明細書、国際公開第2016115274A1号パンフレット、国際公開第2016087416A1号パンフレット、米国特許出願公開第20080069820A1号明細書、米国特許第9145588B号明細書、米国特許第7919257号明細書、および米国特許出願公開第20150232560A1号明細書に記載されるものが挙げられる。完全抗体-Fab/scFabフォーマットを用いる例示的な多重特異性分子としては、以下のもの、米国特許第9382323B2号明細書、米国特許出願公開第20140072581A1号明細書、米国特許出願公開第20140308285A1号明細書、米国特許出願公開第20130165638A1号明細書、米国特許出願公開第20130267686A1号明細書、米国特許出願公開第20140377269A1号明細書、米国特許第7741446B2号明細書、および国際公開第1995009917A1号パンフレットに記載されるものが挙げられる。ドメイン交換フォーマットを用いる例示的な多重特異性分子としては、以下のもの、米国特許出願公開第20150315296A1号明細書、国際公開第2016087650A1号パンフレット、米国特許出願公開第20160075785A1号明細書、国際公開第2016016299A1号パンフレット、米国特許出願公開第20160130347A1号明細書、米国特許出願公開第20150166670号明細書、米国特許第8703132B2号明細書、米国特許出願公開第20100316645号明細書、米国特許第8227577B2号明細書、米国特許出願公開第20130078249号明細書に記載されるものが挙げられる。

【0267】

Fc含有実体（ミニ抗体）

ミニ抗体としても知られているFc含有実体は、scFvを、定常重鎖領域ドメイン3（CH3-scFv）のC末端に、および／または異なる特異性を有する抗体のヒンジ領域（scFv-ヒンジーFc）に融合することによって生成され得る。IgGのCH3ドメインのC末端に融合されたジスルフィド安定化可変ドメイン（ペプチドリンカーを用いない）を有する三価実体も作製され得る。

【0268】

Fc含有多重特異性分子

ある実施形態において、本明細書に開示される多重特異性分子は、免疫グロブリン定常領域（例えば、Fc領域）を含む。例示的なFc領域は、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4の重鎖定常領域；より具体的にヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4の重鎖定常領域から選択され得る。

【0269】

ある実施形態において、免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）は、Fc受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基の数、エフェクター細胞機能または補体機能の1つまたは複数を増加または減少させるように改変され、例えば変異される。

【0270】

他の実施形態において、第1および第2の免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、第1および第2のFc領域）のインターフェースが、例えば、非改変インターフェース、例えば天然インターフェースと比べて二量体化を増加または減少させるように改変され、例えば変異される。例えば、免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）の二量体化が、例えば、非改変インターフェースと比べてヘテロ多量体対ホモ多量体のより高い比率が生じるように、第1および第2のFc領域のFcインターフェースに対になった突起-空洞（「ノブ・イン・ホール」）、静電相互作用または鎖交換の1つまたは複数を提供することによって促進され得る。

【0271】

ある実施形態において、多重特異性分子は、例えば、ヒトIgG1のFc領域の347、

10

20

30

40

50

349、350、351、366、368、370、392、394、395、397、398、399、405、407、または409の1つまたは複数から選択される位置に対になったアミノ酸置換を含む。例えば、免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）は、T366S、L368A、またはY407V（例えば、空洞またはホールに対応する）、およびT366W（例えば、突起またはノブに対応する）から選択される対になったアミノ酸置換を含み得る。

【0272】

他の実施形態において、多機能性分子は、半減期延長剤、例えばヒト血清アルブミンまたはヒト血清アルブミンに対する抗体分子を含む。

【0273】

ヘテロ二量体化抗体分子および作製方法

不適切な重鎖対合の問題に対処するように、多重特異性抗体を産生する様々な方法が開示されている。例示的な方法が後述される。例示的な多重特異性抗体フォーマットおよび前記多重特異性抗体を作製する方法はまた、例えば、Speiss et al. *Molecular Immunology* 67 (2015) 95-106; および Klein et al. *mAbs* 4:6, 653-663; 2012年11月/12月（これらのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される）に開示されている。

【0274】

ヘテロ二量体化二重特異性抗体は、天然IgG構造に基づいており、2つの結合アームは、異なる抗原を認識する。所定の一価（および同時）抗原結合を可能にするIgG由来のフォーマットは、軽鎖の誤対合（例えば、共通の軽鎖）を最小限に抑える技術と組み合わせられた、強制的な重鎖ヘテロ二量体化によって生成される。強制的な重鎖ヘテロ二量体化は、例えば、ノブ・イン・ホールまたは鎖交換操作ドメイン（SEED）を用いて得ることができる。

【0275】

ノブ・イン・ホール

米国特許第5,731,116号明細書、米国特許第7,476,724号明細書およびRidgway, J. et al. (1996) *Prot. Engineering* 9 (7): 617-621に記載されるノブ・イン・ホールは、概して、(1)ヘテロ二量体化を促進するように一方または両方の抗体のCH3ドメインを変異させ; (2)ヘテロ二量体化を促進する条件下で変異された抗体を組み合わせることを含む。「ノブ」または「突起」は、典型的に、親抗体中の小さいアミノ酸をより大きいアミノ酸（例えば、T366YまたはT366W）で置換することによって作成され; 「ホール」または「空洞」は、親抗体中のより大きい残基をより小さいアミノ酸（例えば、Y407T、T366S、L368Aおよび/またはY407V）で置換することによって作成される。

【0276】

Fcドメインを含む二重特異性抗体について、Fc部分の適切なヘテロ二量体化を促進するために、重鎖の定常領域への特異的変異の導入が用いられ得る。いくつかのこのような技術がKlein et al. (*mAbs* (2012) 4:6, 1-11)に概説され、この内容は、全体が参照により本明細書に援用される。これらの技術は、抗体重鎖の1つのCH3ドメインの1つへの嵩高の残基の導入を含む「ノブ・イントゥ・ホール」(KiH)手法を含む。この嵩高の残基は、重鎖の適切な対合を促進するように、対になった重鎖の他のCH3ドメインにおける相補的な「ホール」に適合する（例えば、米国特許第7642228号明細書を参照）。

【0277】

例示的なKiH変異としては、「ノブ」重鎖におけるS354C、T366W、および「ホール」重鎖におけるY349C、T366S、L368A、Y407Vが挙げられる。他の例示的なKiH変異がさらなる任意選択の安定化Fcシステイン変異とともに表1に示される。

【0278】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 19. 例示的な Fc KiH 変異および任意選択のシステイン変異

位置	ノブの変異	ホールの変異
T366	T366W	T366S
L368	-	L368A
Y407	-	Y407V
安定化ジスルフィド架橋を形成するためのさらなるシステイン変異		
位置	ノブ CH3	ホール CH3
S354	S354C	-
Y349	-	Y349C

10

【0279】

他の Fc 変異が、他の鎖の CH3 ドメイン中の 3 つの正に荷電した残基と対合する 1 つの鎖の CH3 ドメイン中の 3 つの負に荷電した残基を同定した Igawa および Tsunoda によって提供される。これらの特異的な荷電残基対は、E356-K439、E357-K370、D399-K409 であり、逆も同様である。鎖 A 中の以下の 3 つの変異：E356K、E357K および D399K、ならびに鎖 B 中の K370E、K409D、K439E の少なくとも 2 つを単独でまたは新たに同定されたジスルフィド架橋と組み合わせることで導入することにより、それらは、ホモ二量体化を抑制すると同時に、非常に効率的なヘテロ二量体化に有利に機能することができた (Martens T et al. A novel one-armed antic-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo. Clin Cancer Res 2006; 12: 6144-52; PMID: 17062691)。Xencor は、鎖 A における S364H、F405A (HA) と、鎖 B (TF) における Y349T、T394F との組合せを定義しながら、最大ヘテロ二量体化について後にスクリーニングされる構造計算および配列情報に基づいて 41 の変異体対を定義した (Moore GL et al. A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens. MAbs 2011; 3: 546-57; PMID: 22123055)。

20

30

【0280】

多重特異性抗体のヘテロ二量体化を促進するための他の例示的な Fc 変異としては、以下の参考文献（これらのそれぞれの内容が参照により本明細書に援用される）、国際公開第 2016071377A1 号パンフレット、米国特許出願公開第 20140079689A1 号明細書、米国特許出願公開第 20160194389A1 号明細書、米国特許出願公開第 20160257763 号明細書、国際公開第 2016071376A2 号パンフレット、国際公開第 2015107026A1 号パンフレット、国際公開第 2015107025A1 号パンフレット、国際公開第 2015107015A1 号パンフレット、米国特許出願公開第 20150353636A1 号明細書、米国特許出願公開第 20140199294A1 号明細書、米国特許第 7750128B2 号明細書、米国特許出願公開第 20160229915A1 号明細書、米国特許出願公開第 20150344570A1 号明細書、米国特許第 8003774A1 号明細書、米国特許出願公開第 20150337049A1 号明細書、米国特許出願公開第 20150175707A1 号明細書、米

40

50

国特許出願公開第20140242075A1号明細書、米国特許出願公開第20130195849A1号明細書、米国特許出願公開第20120149876A1号明細書、米国特許出願公開第20140200331A1号明細書、米国特許第9309311B2号明細書、米国特許第8586713号明細書、米国特許出願公開第20140037621A1号明細書、米国特許出願公開第20130178605A1号明細書、米国特許出願公開第20140363426A1号明細書、米国特許出願公開第20140051835A1号明細書および米国特許出願公開第20110054151A1号明細書に記載されるものが挙げられる。

【0281】

安定化システイン変異はまた、K i Hおよび他のF cヘテロ二量体化促進変異体と組み合わせ使用されている。例えば、米国特許第7183076号明細書を参照されたい。他の例示的なシステイン修飾としては、例えば、米国特許出願公開第20140348839A1号明細書、米国特許第7855275B2号明細書、および米国特許第9000130B2号明細書に開示されるものが挙げられる。

【0282】

鎖交換操作ドメイン (SEED)

鎖交換操作ドメイン (SEED) C (H) 3ヘテロ二量体を考案することにより、二重特異性および非対称融合タンパク質を支持するヘテロ二量体F cプラットフォームが公知である。ヒトIgGおよびIgA C (H) 3ドメインのこれらの誘導体は、ヒトIgAおよびIgG C (H) 3配列の交互のセグメントから構成される相補的ヒトSEED C (H) 3ヘテロ二量体を生成する。SEED C (H) 3ドメインの得られる対は、哺乳類細胞内で発現されるとき、ヘテロ二量体を形成するように優先的に結合する。SEEDボディ (S b) 融合タンパク質は、1つまたは複数の融合パートナーと遺伝的に連鎖し得る [IgG1ヒンジ] - C (H) 2 - [SEED C (H) 3] からなる (例えば、Davis JH et al. SEEDbodies: fusion proteins based on strand exchange engineered domain (SEED) CH3 heterodimers in an Fc analogue platform for asymmetric binders or immunofusions and bispecific antibodies. Protein Eng Des Sel 2010; 23: 195-202; PMID: 20299542および米国特許第8871912号明細書 (これらのそれぞれの内容が参照により本明細書に援用される) を参照)。

【0283】

デュオボディ

適切な重鎖対合を有する二重特異性抗体を産生するための「デュオボディ」技術が公知である。デュオボディ技術は、産生後 (post-production) 交換反応において安定した二重特異性ヒトIgG1抗体を産生するための3つの基本的工程を含む。第1の工程において、第3の定常 (CH3) ドメイン中に単一の適合した変異をそれぞれ含む2つのIgG1が標準的な哺乳動物組み換え細胞株を用いて別々に産生される。その後、これらのIgG1抗体は、回収および精製のための標準的なプロセスに従って精製される。産生および精製 (産生後) 後、2つの抗体は、調整された実験室条件下で再結合されて、非常に高い収率 (典型的に>95%) で二重特異性抗体産物をもたらす (例えば、Labrijn et al, PNAS 2013; 110 (13): 5145-5150およびLabrijn et al. Nature Protocols 2014; 9 (10): 2450-63 (これらのそれぞれの内容が参照により本明細書に援用される) を参照)。

【0284】

静電相互作用

ホモ二量体の形成が静電的に不利であるように、荷電アミノ酸によるCH3アミノ酸交換を用いて多重特異性抗体を作製する方法が開示されている。欧州特許第1870459号

10

20

30

40

50

明細書および国際公開第2009089004号パンフレットには、宿主細胞内の異なる抗体ドメインの共発現時にヘテロ二量体の形成に有利に機能する他の手法が記載されている。これらの方法において、両方のCH3ドメインにおけるCH3-CH3境界部である、重鎖定常ドメイン3(CH3)を構成する1つまたは複数の残基が荷電アミノ酸で置き換えられて、ホモ二量体の形成が静電的に不利であり、ヘテロ二量体化が静電的に有利であるようにする。静電相互作用を用いて多重特異性分子を作製するさらなる方法が、米国特許出願公開第20100015133号明細書、米国特許第8592562B2号明細書、米国特許第9200060B2号明細書、米国特許出願公開第20140154254A1号明細書、および米国特許第9358286A1号明細書を含む参考文献（これらのそれぞれの内容が参照により本明細書に援用される）に記載されている。

10

【0285】

共通の軽鎖

軽鎖の誤対合は、二重特異性IgGの均質な調製物を生成することを避ける必要がある。これを行うための1つの方法は、共通の軽鎖の原理の使用、すなわち1つの軽鎖を共有するが、別の特異性を依然として有する2つの結合剤を組み合わせることによる。モノマーの混合物からの所望の二重特異性抗体の形成を促進する例示的な方法は、二重特異性抗体の異種可変重鎖領域のそれぞれと相互作用する共通の可変軽鎖を提供することによる。例えば、米国特許第7183076B2号明細書、米国特許出願公開第20110177073A1号明細書、欧州特許出願公開第2847231A1号明細書、国際公開第2016079081A1号パンフレット、および欧州特許出願公開第3055329A1号明細書（これらのそれぞれの内容が参照により本明細書に援用される）に開示されるような、共通の軽鎖を有する二重特異性抗体を産生する組成物および方法である。

20

【0286】

CrossMab

軽鎖の誤対合を減少させるための別の選択肢は、二重特異性抗体の半分のFab中のCH1およびCLドメインを交換することにより、非特異的なL鎖の誤対合を避けるCrossMab技術である。このようなクロスオーバー変異体は、結合特異性および親和性を保持するが、L鎖の誤対合が防がれるほど2つのアームを異ならせる。CrossMab技術（上記のKlein et al. に概説されるように）は、適切な対合の形成を促進するように、重鎖と軽鎖との間のドメイン交換を含む。簡潔には、2つの異なる軽鎖-重鎖対を用いることによって2つの抗原に結合し得る二重特異性IgG様CrossMab抗体を構築するために、2工程の修飾プロセスが適用される。まず、二量体化の境界部が、ヘテロ二量体化手法、例えばノブ・イントゥ・ホール(KiH)技術を用いて各重鎖のC末端へと操作されて、1つの抗体（例えば、抗体A）および第2の抗体（例えば、抗体B）からの2つの異なる重鎖のヘテロ二量体のみが確実に効率的に形成される。次に、1つの抗体の定常重鎖1(CH1)および定常軽鎖(CL)ドメインが交換されて（抗体A）、可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)ドメインを不変に保つ。CH1およびCLドメインの交換は、修飾抗体（抗体A）軽鎖が修飾抗体（抗体A）重鎖とのみ効率的に二量体化し得る一方、非修飾抗体（抗体B）軽鎖が非修飾抗体（抗体B）重鎖とのみ効率的に二量体化し得ることを確実にし；したがって、所望の二重特異性CrossMabのみが効率的に形成されるであろう（例えば、Cain, C. SciBX 4(28); doi: 10.1038/scibx.2011.783（この内容が参照により本明細書に援用される）を参照）。

30

40

【0287】

共通の重鎖

モノマーの混合物からの所望の二重特異性抗体の形成を促進する例示的な方法は、二重特異性抗体の異種可変軽鎖領域のそれぞれと相互作用する共通の可変重鎖を提供することによる。共通の重鎖を有する二重特異性抗体を産生する組成物および方法は、例えば、米国特許出願公開第20120184716号明細書、米国特許出願公開第20130317200号明細書、および米国特許出願公開第20160264685A1号明細書（これ

50

らのそれぞれの内容が参照により本明細書に援用される)に開示されている。

【0288】

アミノ酸修飾

適切な軽鎖の対合を有する多重特異性抗体を産生する代替的な組成物および方法は、様々なアミノ酸修飾を含む。例えば、Zymeworksは、CH1および／またはCLドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸修飾、VHおよび／またはVLドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸修飾、またはその組合せを有するヘテロ二量体を記載しており、これらのドメインは、軽鎖と重鎖との間の境界部の一部であり、各重鎖と所望の軽鎖との間に優先的な対合を形成して、ヘテロ二量体対の2つの重鎖および2つの軽鎖が細胞内で共発現されるとき、第1のヘテロ二量体の重鎖が他のものより軽鎖の1つと優先的に対合するようになっている(例えば、国際公開第2015181805号パンフレットを参照)。他の例示的な方法は、国際公開第2016026943号パンフレット(Argen-X)、米国特許出願公開第20150211001号明細書、米国特許出願公開第20140072581A1号明細書、米国特許出願公開第20160039947A1号明細書、および米国特許出願公開第20150368352号明細書に記載されている。

10

【0289】

λ/κフォーマット

λ軽鎖ポリペプチドおよびκ軽鎖ポリペプチドを含む多重特異性分子(例えば、多重特異性抗体分子)は、ヘテロ二量体化を可能にするのに使用され得る。λ軽鎖ポリペプチドおよびκ軽鎖ポリペプチドを含む二重特異性抗体分子を生成するための方法が、2016年9月23日に出願された米国仮特許出願第62/399,319号明細書に開示され、これは、全体が参照により本明細書に援用される。

20

【0290】

実施形態において、多重特異性分子は、多重特異性抗体分子、例えば2つの結合特異性を含む抗体分子、例えば二重特異性抗体分子を含む。多重特異性抗体分子は、第1のエピトープに対して特異的なλ軽鎖ポリペプチド1(LLCP1)；第1のエピトープに対して特異的な重鎖ポリペプチド1(HCP1)；第2のエピトープに対して特異的なκ軽鎖ポリペプチド2(KLCP2)；および第2のエピトープに対して特異的な重鎖ポリペプチド2(HCP2)を含む。

30

【0291】

「λ軽鎖ポリペプチド1(LLCP1)」は、その用語が本明細書において使用される際、同種の重鎖可変領域と組み合わせられると、そのエピトープおよびHCP1との複合体に対する特異的結合を媒介し得るように、十分な軽鎖(LC)配列を含むポリペプチドを指す。一実施形態において、それは、CH1領域の全てまたは断片を含む。一実施形態において、LLCP1は、そのエピトープおよびHCP1との複合体の特異的結合を媒介するために、LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4、およびCH1、またはそれからの十分な配列を含む。LLCP1は、そのHCP1と一緒に、第1のエピトープに対する特異性を提供する(一方、KLCP2は、そのHCP2と一緒に、第2のエピトープに対する特異性を提供する)。本明細書の他の箇所に記載されるように、LLCP1は、HCP2よりHCP1に対する高い親和性を有する。

40

【0292】

「κ軽鎖ポリペプチド2(KLCP2)」は、その用語が本明細書において使用される際、同種の重鎖可変領域と組み合わせられると、そのエピトープおよびHCP2との複合体に対する特異的結合を媒介し得るように、十分な軽鎖(LC)配列を含むポリペプチドを指す。一実施形態において、それは、CH1領域の全てまたは断片を含む。一実施形態において、KLCP2は、そのエピトープおよびHCP2との複合体に対する特異的結合を媒介するために、LC-CDR1、LC-CDR2、LC-CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4、およびCH1、またはそれからの十分な配列を含む。KLCP2は、そのHCP2と一緒に、第2のエピトープに対する特異性を提供する(一方、LLCP1は、

50

そのHCP1と一緒に、第1のエピトープに対する特異性を提供する)。

【0293】

「重鎖ポリペプチド1(HCP1)」は、その用語が本明細書において使用される際、同種のLLCP1と組み合わせられると、そのエピトープおよびHCP1との複合体に対する特異的結合を媒介し得るように、十分な重鎖(HC)配列、例えば、HC可変領域配列を含むポリペプチドを指す。一実施形態において、それは、CH1領域の全てまたは断片を含む。一実施形態において、それは、CH2および／またはCH3領域の全てまたは断片を含む。一実施形態において、HCP1は、(i)そのエピトープおよびLLCP1との複合体の特異的結合を媒介するために、(ii)本明細書に記載されるように、KLCP2ではなくLLCP1と優先的に複合するために；および(iii)本明細書に記載されるように、HCP1の別の分子ではなくHCP2と優先的に複合するために、HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4、CH1、CH2、およびCH3、またはそれからの十分な配列を含む。HCP1は、そのLLCP1と一緒に、第1のエピトープに対する特異性を提供する(一方、KLCP2は、そのHCP2と一緒に、第2のエピトープに対する特異性を提供する)。

10

【0294】

「重鎖ポリペプチド2(HCP2)」は、その用語が本明細書において使用される際、同種のLLCP1と組み合わせられると、そのエピトープおよびHCP1との複合体に対する特異的結合を媒介し得るように、十分な重鎖(HC)配列、例えば、HC可変領域配列を含むポリペプチドを指す。一実施形態において、それは、CH1領域の全てまたは断片を含む。一実施形態において、それは、CH2および／またはCH3領域の全てまたは断片を含む。一実施形態において、HCP1は、(i)そのエピトープおよびKLCP2との複合体の特異的結合を媒介するために、(ii)本明細書に記載されるように、LLCP1ではなくKLCP2と優先的に複合するために；および(iii)本明細書に記載されるように、HCP2の別の分子ではなくHCP1に複合するために、HC-CDR1、HC-CDR2、HC-CDR3、FR1、FR2、FR3、FR4、CH1、CH2、およびCH3、またはそれからの十分な配列を含む。HCP2は、そのKLCP2と一緒に、第2のエピトープに対する特異性を提供する(一方、LLCP1は、そのHCP1と一緒に、第1のエピトープに対する特異性を提供する)。

20

【0295】

本明細書に開示される多重特異性抗体分子のある実施形態において、LLCP1は、HCP2よりHCP1に対してより高い親和性を有し；および／またはKLCP2は、HCP1よりHCP2に対してより高い親和性を有する。

30

【0296】

実施形態において、HCP1に対するLLCP1の親和性は、予め選択された条件下、例えば水性緩衝液中、例えばpH7において、生理食塩水中、例えばpH7において、または生理学的条件下において、多重特異性抗体分子分子の少なくとも75%、80、90、95、98、99、99.5、または99.9%が、HCP1と複合体化または結合されたLLCP1を有するように、HCP2に対するその親和性より十分に高い。

【0297】

本明細書に開示される多重特異性抗体分子のある実施形態において、HCP1は、HCP1の第2の分子よりHCP2に対してより高い親和性を有し；および／またはHCP2は、HCP2の第2の分子よりHCP1に対してより高い親和性を有する。

40

【0298】

実施形態において、HCP2に対するHCP1の親和性は、予め選択された条件下、例えば水性緩衝液中、例えばpH7において、生理食塩水中、例えばpH7において、または生理学的条件下において、多重特異性抗体分子分子の少なくとも75%、80、90、95、98、99、99.5または99.9%が、HCP2と複合体化または結合されたHCP1を有するように、HCP1の第2の分子に対するその親和性より十分に高い。

50

【0299】

別の態様において、多重特異性抗体分子を作製または生成するための方法が本明細書に開示される。本方法は、(i)～(iv)が関連する条件下において、

(i) 第1の重鎖ポリペプチド（例えば、第1の重鎖可変領域（第1のVH）、第1のCH1、第1の重鎖定常領域（例えば、第1のCH2、第1のCH3、または両方）の1つ、2つ、3つまたは全てを含む重鎖ポリペプチド）を提供すること；

(ii) 第2の重鎖ポリペプチド（例えば、第2の重鎖可変領域（第2のVH）、第2のCH1、第2の重鎖定常領域（例えば、第2のCH2、第2のCH3、または両方）の1つ、2つ、3つまたは全てを含む重鎖ポリペプチド）を提供すること；

(iii) 第1の重鎖ポリペプチド（例えば、第1のVH）と優先的に結合するλ鎖ポリペプチド（例えば、λ軽鎖可変領域（VLλ）、λ軽定常鎖（light constant chain）（VLλ）、または両方）を提供すること；および

(iv) 第2の重鎖ポリペプチド（例えば、第2のVH）と優先的に結合するκ鎖ポリペプチド（例えば、λ軽鎖可変領域（VLκ）、λ軽定常鎖（VLκ）、または両方）を提供すること

を含む。

【0300】

実施形態において、第1および第2の重鎖ポリペプチドは、ヘテロ二量体化を促進するFcインターフェースを形成する。

【0301】

実施形態において、(i)～(iv)（例えば、(i)～(iv)をコードする核酸）は、単一細胞、例えば単一の哺乳動物細胞、例えばCHO細胞に導入される。実施形態において、(i)～(iv)は、細胞内で発現される。

【0302】

実施形態において、(i)～(iv)（例えば、(i)～(iv)をコードする核酸）は、異なる細胞、例えば異なる哺乳類細胞、例えば2つ以上のCHO細胞に導入される。実施形態において、(i)～(iv)は、細胞内で発現される。

【0303】

一実施形態において、本方法は、例えば、λ-および/またはκ-特異的な精製、例えば親和性クロマトグラフィーを用いて細胞発現抗体分子を精製することをさらに含む。

【0304】

実施形態において、本方法は、細胞発現多重特異性抗体分子を評価することをさらに含む。例えば、精製された細胞発現多重特異性抗体分子は、質量分析法を含む、当該技術分野において公知の技術によって分析され得る。一実施形態において、精製された細胞発現抗体分子は、切断され、例えばパパインで消化されて、Fab部分を生じ、質量分析法を用いて評価される。

【0305】

実施形態において、本方法は、適切に対になったκ/λ多重特異性、例えば二重特異性抗体分子を高い収率、例えば少なくとも75%、80%、90%、95%、98%、99%、99.5%または99.9%で生成する。

【0306】

他の実施形態において、

(i) 第1の重鎖ポリペプチド（HCP1）（例えば、第1の重鎖可変領域（第1のVH）、第1のCH1、第1の重鎖定常領域（例えば、第1のCH2、第1のCH3、または両方）の1つ、2つ、3つまたは全てを含む重鎖ポリペプチド）（例えば、HCP1は、第1のエピトープに結合する）；

(ii) 第2の重鎖ポリペプチド（HCP2）（例えば、第2の重鎖可変領域（第2のVH）、第2のCH1、第2の重鎖定常領域（例えば、第2のCH2、第2のCH3、または両方）の1つ、2つ、3つまたは全てを含む重鎖ポリペプチド）（例えば、HCP2は、第2のエピトープに結合する）；

10

20

30

40

50

(i i i) 第 1 の重鎖ポリペプチド (例えば、第 1 の V H) と優先的に結合する λ 軽鎖ポリペプチド (L L C P 1) (例えば、λ 軽鎖可変領域 (V L l) 、 λ 軽定常鎖 (V L l) 、または両方) (例えば、 L L C P 1 は、第 1 のエピトープに結合する) ; および
(i v) 第 2 の重鎖ポリペプチド (例えば、第 2 の V H) と優先的に結合する κ 軽鎖ポリペプチド (K L C P 2) (例えば、λ 軽鎖可変領域 (V L k) 、 λ 軽定常鎖 (V L k) 、または両方) (例えば、 K L C P 2 は、第 2 のエピトープに結合する)
を含む多重特異性、例えば二重特異性抗体分子である。

【 0 3 0 7 】

実施形態において、第 1 および第 2 の重鎖ポリペプチドは、ヘテロ二量体化を促進する F c インターフェースを形成する。実施形態において、多重特異性抗体分子は、 F c 定常、
C H 2 - C H 3 ドメイン (ノブ修飾を有する) に連結される第 1 の重鎖可変領域にヘテロ二量体化されたハイブリッド V L l - C L l を含む第 1 の結合特異性、および F c 定常、
C H 2 - C H 3 ドメイン (ホール修飾を有する) に連結される第 2 の重鎖可変領域にヘテロ二量体化されたハイブリッド V L k - C L k を含む第 2 の結合特異性を有する。

【 0 3 0 8 】

例示的な多重特異性の立体配置 :

ある実施形態において、多重特異性分子は、第 1 および第 2 の非隣接ポリペプチドを含み、

(i) 第 1 のポリペプチドは、例えば、 N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャに連結される、例えば癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば抗体分子 (例えば、第 1 の抗原ドメインの第 1 の部分、例えば F a b 分子の第 1 の V H - C H 1) 、例えば抗体分子、例えば免疫細胞抗原に結合する s c F v を含み ;

(i i) 第 2 のポリペプチドは、例えば、 N から C の配向で、例えば腫瘍または間質抗原 (例えば、第 1 の V H - C H 1 によって結合される同じ腫瘍または間質抗原) に結合する、第 1 の抗原ドメインの第 2 の部分、例えば F a b の第 1 の V L - C L を含む。ある実施形態において、多重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、 s c F v に連結される F a b 分子を含む。実施形態において、多重特異性分子は、二重特異性分子である。

【 0 3 0 9 】

他の実施形態において、多重特異性分子は、第 1 、第 2 および第 3 の非隣接ポリペプチドを含み、

(i) 第 1 のポリペプチドは、例えば、 N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第 1 および第 2 のポリペプチドの間の結合を促進する第 1 のドメイン (例えば、第 1 の免疫グロブリン定常ドメイン (例えば、本明細書に記載される第 1 の F c 分子) に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば抗体分子 (例えば、第 1 の抗原ドメインの第 1 の部分、例えば F a b 分子の第 1 の V H - C H 1)) を含み ;

(i i) 第 2 のポリペプチドは、例えば、 N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第 1 および第 2 のポリペプチドの間の結合を促進する第 2 のドメイン (例えば、第 2 の免疫グロブリン定常ドメイン (例えば、本明細書に記載される第 2 の F c 分子) に連結されるサイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャ (例えば、抗体分子、例えば免疫細胞抗原に結合する s c F v)) を含み ; および

(i i i) 第 3 のポリペプチドは、例えば、 N から C の配向で、例えば腫瘍または間質抗原 (例えば、第 1 の V H - C H 1 によって結合される同じ腫瘍または間質抗原) に結合する、第 1 の抗原ドメインの第 2 の部分、例えば F a b の第 1 の V L - C L を含む。ある実施形態において、多重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、第 2 の F c 分子に連結される、任意選択的にリンカーを介して、第 1 の F c 分子、サイトカインまたは免疫細胞エンゲージャ (例えば、 s c F v) に連結される F a b 分子を含む。実施形態において、多重特異性分子は、二重特異性分子である。

【 0 3 1 0 】

他の実施形態において、多重特異性分子は、第 1 、第 2 および第 3 の非隣接ポリペプチドを含み、

(i) 第1のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1および第2のポリペプチドの間の結合を促進する第1のドメイン（例えば、第1の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第1のFc分子）に連結される、例えば癌抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば抗体分子（例えば、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えばFab分子の第1のVH-CH1）を含み；

(ii) 第2のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1および第2のポリペプチドの間の結合を促進する第2のドメイン（例えば、第2の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第2のFc分子）に連結されるサイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャ（例えば、抗体分子、例えば免疫細胞抗原に結合するscFv）を含み；および

(iii) 第3のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、例えば腫瘍または間質抗原（例えば、第1のVH-CH1によって結合される同じ腫瘍または間質抗原）に結合する、第1の抗原ドメインの第2の部分、例えばFabの第1のVL-CLを含む。ある実施形態において、多重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、第2のFc分子に連結される、任意選択的にリンカーを介して、第1のFc分子、サイトカインまたは免疫細胞エンゲージャ（例えば、scFv）に連結されるFab分子を含み、第1または第2のポリペプチドのいずれかは、第1または第2の免疫グロブリン定常ドメインのC末端に任意選択的に共有結合される、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャをさらに含む。実施形態において、多重特異性分子は、三重特異性分子である。

【0311】

他の実施形態において、多重特異性分子は、第1、第2および第3の非隣接ポリペプチドを含み、

(i) 第1のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1および第2のポリペプチドの間の結合を促進する第1のドメイン（例えば、第1の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第1のFc分子）に連結される、例えば腫瘍または間質抗原に結合する腫瘍標的化部分、例えば抗体分子（例えば、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えばFab分子の第1のVH-CH1）を含み；

(ii) 第2のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1および第2のポリペプチドの間の結合を促進する第2のドメイン（例えば、第2の免疫グロブリン定常ドメイン（例えば、本明細書に記載される第2のFc分子）に連結されるサイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャ（例えば、抗体分子、例えば免疫細胞抗原に結合するscFv）を含み；および

(iii) 第3のポリペプチドは、例えば、NからCの配向で、例えば腫瘍または間質抗原（例えば、第1のVH-CH1によって結合される同じ腫瘍または間質抗原）に結合する、第1の抗原ドメインの第2の部分、例えばFabの第1のVL-CLを含む。ある実施形態において、多重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、第2のFc分子に連結される、任意選択的にリンカーを介して、第1のFc分子、サイトカインまたは免疫細胞エンゲージャ（例えば、scFv）に連結されるFab分子を含み、第1および第2のポリペプチドのいずれかは、任意選択的に第1または第2の免疫グロブリン定常ドメインのC末端に共有結合されるサイトカイン分子、免疫細胞エンゲージャまたは両方をさらに含む。実施形態において、多重特異性分子は、四重特異性分子である。

【0312】

他の実施形態において、多重特異性分子は、第1および第2のポリペプチドを含み、第1のポリペプチドは、例えばNからC方向に：

腫瘍標的化部分；

（任意選択的に）第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子；および

免疫細胞エンゲージャまたはサイトカイン分子を含む第1のポリペプチドを含み；第2のポリペプチドは、例えば、NからC方向に：

腫瘍標的化部分、またはそのサブユニット；

10

20

30

40

50

(任意選択的に) 第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えば F c 分子；および

免疫細胞エンゲージャまたはサイトカイン分子を含む第2のポリペプチドを含み、第1および第2のポリペプチドは異なる。

【0313】

実施形態において、第1のポリペプチドの腫瘍標的化部分は、腫瘍標的化分子（例えば、F a b）の軽鎖可変ドメインを含み；第2のポリペプチドの腫瘍標的化部分は、腫瘍標的化分子（例えば、F a b）の重鎖可変ドメインを含む。

【0314】

他の実施形態において、第1のポリペプチドの第1の腫瘍標的化部分は、腫瘍標的化分子（例えば、F a b）の重鎖可変ドメインを含み；第2のポリペプチドの第2の腫瘍標的化部分は、腫瘍標的化分子（例えば、F a b）の軽鎖可変ドメインを含む。

10

【0315】

他の実施形態において、第1のポリペプチドの第1の腫瘍標的化部分は、腫瘍標的化分子（例えば、F a b）の軽鎖可変ドメインを含み；第2のポリペプチドの第2の腫瘍標的化部分は、腫瘍標的化分子（例えば、F a b）の重鎖可変ドメインを含む。

【0316】

他の実施形態において、第1のポリペプチドの腫瘍標的化部分は、腫瘍標的化 s c F v を含み；第2のポリペプチドの腫瘍標的化部分は、腫瘍標的化 s c F v を含む。

【0317】

20

他の実施形態において、多重特異性分子は、

a) 以下を含む第1のポリペプチド：

第1および第2のポリペプチドの結合を促進する第1のドメイン、例えば第1の F c 分子；および

腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャまたはサイトカイン分子から選択される2つのポリペプチド；ならびに

b) 以下を含む第2のポリペプチド：

第1および第2のポリペプチドの結合を促進する第2のドメイン、例えば第2の F c 分子；および

腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャまたはサイトカイン分子から選択される2つのポリペプチド

30

を含み、多重特異性分子は、腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子を含む。実施形態において、多重特異性分子は、以下のもの：

(i) 腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャおよび2つのサイトカイン分子；

(i i) 腫瘍標的化部分；2つの免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子；または

(i i i) 2つの腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャおよびサイトカイン分子

の1つを含む。

【0318】

他の実施形態において、多重特異性分子は、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドを含み、

40

i) 第1のポリペプチドは、例えば、N-CまたはC-N方向に、腫瘍標的化部分；第1および第2のポリペプチドの結合を促進する第1のドメイン、例えば第1の F c 分子および免疫細胞エンゲージャを含み；

i i) 第1のポリペプチドは、例えば、N-CまたはC-N方向に、腫瘍標的化部分；第1および第2のポリペプチドの結合を促進する第1のドメイン、例えば第1の F c 分子およびサイトカイン分子を含み；または

i i i) 第1のポリペプチドは、例えば、N-CまたはC-N方向に、サイトカイン；第1および第2のポリペプチドの結合を促進する第1のドメイン、例えば第1の F c 分子および免疫細胞エンゲージャを含み；

i v) 第2のポリペプチドは、例えば、N-CまたはC-N方向に、腫瘍標的化部分；第

50

1 および第2のポリペプチドの結合を促進する第2のドメイン、例えば第2のFc分子および免疫細胞エンゲージャを含み；

i i) 第2のポリペプチドは、例えば、N-CまたはC-N方向に、腫瘍標的化部分；第1および第2のポリペプチドの結合を促進する第2のドメイン、例えば第2のFc分子およびサイトカイン分子を含み；または

i i i) 第2のポリペプチドは、例えば、N-CまたはC-N方向に、サイトカイン；第1および第2のポリペプチドの結合を促進する第2のドメイン、例えば第2のFc分子および免疫細胞エンゲージャを含む。

【0319】

本出願のさらなる特徴および実施形態は、以下の1つまたは複数を含む。

【0320】

別の態様において、本発明は、N末端からC末端の配向で、下式を含む多重特異性（例えば、二重または三重特異性）分子を特徴とする：

R1 - (任意選択的にL1) - R2 - (任意選択的にL2) - R3；

R1 - (任意選択的にL1) - R3 - (任意選択的にL2) - R2；

R2 - (任意選択的にL1) - R1 - (任意選択的にL2) - R3；

R2 - (任意選択的にL1) - R3 - (任意選択的にL2) - R1；

R3 - (任意選択的にL1) - R1 - (任意選択的にL2) - R2；または

R3 - (任意選択的にL1) - R2 - (任意選択的にL2) - R1；

(i) R1は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分であり、R2およびR3が存在する場合のみ、R1は0であり得、またはR1は、1つ、2つまたはそれを超える腫瘍標的化部分（例えば、同じかまたは異なる腫瘍標的化部分）を含み；

(i i) R2は、本明細書に記載される免疫細胞エンゲージャであり、R1およびR3が存在する場合のみ、R2は0であり得、またはR2は、1つ、2つまたはそれを超える免疫細胞エンゲージャ（例えば、同じかまたは異なる免疫細胞エンゲージャ）を含み；

(i i i) R3は、本明細書に記載されるサイトカイン分子であり、R1およびR2が存在する場合のみ、R3は0であり得、またはR3は、1つ、2つまたはそれを超えるサイトカイン分子（例えば、同じかまたは異なるサイトカイン分子）を含み；

(i v) 任意選択的に、L1および／またはL2は、本明細書に記載されるリンカーのいずれかである。

【0321】

ある実施形態において、R1および／またはR2は、完全抗体（例えば、少なくとも1つ、好ましくは2つの完全な重鎖および少なくとも1つ、好ましくは2つの完全な軽鎖を含む抗体）、または抗原結合断片（例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、一本鎖Fv断片、単ドメイン抗体、ダイアボディ(dAb)、二価抗体、または二重特異性抗体もしくはその断片、その単ドメイン変異体、またはラクダ科抗体)である。

【0322】

他の実施形態において、R1およびR2は、共通の軽鎖二重特異性IgG；二重作用性Fab(DAF)、CrossMab、IgG-dssc-Fv2、DVD（二重可変ドメイン）、IgG-dsFv、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv2-Fc、Fab-scFv2、Fab-scFv、scFv-scFv、全抗体-Fab、全抗体-scFv、ダイアボディ、DART（二重親和性再標的化分子）、またはTandAbから選択される。

【0323】

他の実施形態において、多重特異性分子は、R4をさらに含み、R4は、第2の腫瘍標的化部分；第2の免疫細胞エンゲージャ（例えば、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャ）または第2のサイトカイン分子である。

【0324】

他の実施形態において、多重特異性分子は、L3をさらに含むことができ、L3は、リン

10

20

30

40

50

カー（例えば、本明細書に記載されるリンカー）である。

【0325】

ある実施形態において、R4は、完全抗体（例えば、少なくとも1つ、好ましくは2つの完全な重鎖および少なくとも1つ、好ましくは2つの完全な軽鎖を含む抗体）、または抗原結合断片（例えば、Fab、F(ab')₂、Fv、一本鎖Fv断片、単ドメイン抗体、ダイアボディ(dAb)、二価抗体、または二重特異性抗体もしくはその断片、その単ドメイン変異体、またはラクダ科抗体）である。

【0326】

他の実施形態において、R1およびR4は、共通の軽鎖二重特異性IgG；二重作用性Fab(DAF)、CrossMab、IgG-dssc-Fv2、DVD（二重可変ドメイン）、IgG-dsFv、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv2-Fc、Fab-scFv2、Fab-scFv、scFv-scFv、全抗体-Fab、全抗体-scFv、ダイアボディ、DART（二重親和性再標的化分子）、またはTandAbである。

10

【0327】

他の実施形態において、R2およびR4は、共通の軽鎖二重特異性IgG；二重作用性Fab(DAF)、CrossMab、IgG-dssc-Fv2、DVD（二重可変ドメイン）、IgG-dsFv、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv2-Fc、Fab-scFv2、Fab-scFv、scFv-scFv、全抗体-Fab、全抗体-scFv、ダイアボディ、DART（二重親和性再標的化分子）、またはTandAbである。

20

【0328】

別の態様において、本発明は、R1およびR2を含む多重特異性分子を特徴とし、

(i) R1は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分であり、例えば、R1は、1つ、2つまたはそれを超える腫瘍標的化部分（例えば、同じかまたは異なる腫瘍標的化部分）を含み；

(ii) R2は、本明細書に記載されるサイトカイン分子であり、例えば、R2は、1つ、2つまたはそれを超えるサイトカイン分子（例えば、同じかまたは異なるサイトカイン分子）を含み；および

(iii) 任意選択的に、L1および／またはL2は、本明細書に記載されるリンカーである。

30

【0329】

ある実施形態において、R1は、抗FAP Fabであり、R2は、IL-15ポリペプチドである。ある実施形態において、R1およびR2は、例えば第1および第2のFcを含むノブ・イン・ホールFc二量体を介して二量体化される（例えば、図XAに示されるように）。ある実施形態において、第1のFcは、T366S；L368AまたはY407Vから選択されるアミノ酸置換を含む。ある実施形態において、第2のFcは、T366Wから選択されるアミノ酸置換を含む。

【0330】

別の態様において、本発明は、R1、R2、およびR3を含む多重特異性分子を特徴とし、

40

(i) R1は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分であり、例えば、R1は、1つ、2つまたはそれを超える腫瘍標的化部分（例えば、同じかまたは異なる腫瘍標的化部分）を含み；

(ii) R2は、本明細書に記載される免疫細胞エンゲージャであり、例えば、R2は、1つ、2つまたはそれを超える免疫細胞エンゲージャ（例えば、同じかまたは異なる免疫細胞エンゲージャ）を含み；

(iii) R3は、本明細書に記載されるサイトカイン分子であり、例えば、R3は、1つ、2つまたはそれを超えるサイトカイン分子（例えば、同じかまたは異なるサイトカイン分子）を含み；

(iv) 任意選択的に、L1および／またはL2は、本明細書に記載されるリンカーであ

50

る。

【0331】

ある実施形態において、R1は、抗メソテリンFabであり、R2は、IL-15ポリペプチドであり、R3は、CD40Lポリペプチドである。ある実施形態において、R1およびR2は、例えば第1および第2のFcを含むノブ・イン・ホールFcを介して二量体化される。ある実施形態において、第1のFcは、例えば、T366S；L368AまたはY407Vから選択される、位置366、368および／または407におけるアミノ酸置換を含む。ある実施形態において、第2のFcは、位置366におけるアミノ酸置換、例えばT366Wを含む。

【0332】

別の態様において、本発明は、R1、R2、R3、およびR4を含む多重特異性分子を特徴とし、

(i) R1は、本明細書に記載される腫瘍標的化部分であり；

(ii) R2およびR4は、それぞれ本明細書に記載される第1および第2の免疫細胞エンゲージャであり；

(iii) R3は、本明細書に記載されるサイトカイン分子であり；および

(iv) 任意選択的に、L1および／またはL2は、本明細書に記載されるリンカーである。

【0333】

ある実施形態において、R1は、抗FAP Fabであり、R3は、IL-15ポリペプチドであり、R2は、CD40Lポリペプチドであり、R4は、B7H6ポリペプチドである。ある実施形態において、R1、R2、R3、およびR4は、Fc二量体を介して二量体化される。ある実施形態において、Fcは、T366S；L368AまたはY407Vから選択されるアミノ酸置換を含む。ある実施形態において、Fcは、T366Wから選択されるアミノ酸置換を含む。

【0334】

腫瘍標的化部分

本開示は、分子を腫瘍細胞に指向する1つまたは複数の腫瘍特異的標的化部分を含む、例えばそれを含むように操作される特に多重特異性（例えば、二重、三重、四重特異性）分子を提供する。

【0335】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される多重特異性分子は、腫瘍標的化部分を含む。腫瘍標的化部分は、抗体分子（例えば、本明細書に記載される抗原結合ドメイン）、受容体もしくは受容体断片、またはリガンドもしくはリガンド断片、またはその組合せから選択され得る。ある実施形態において、腫瘍標的化部分は、腫瘍細胞（例えば、腫瘍細胞の表面に存在する分子、例えば抗原）と関連する、例えばそれに結合する。いくつかの実施形態において、腫瘍標的化部分は、本明細書に開示される多重特異性分子を標的化し、例えばそれを癌（例えば、癌または腫瘍細胞）に指向する。ある実施形態において、癌は、血液癌、固形癌、転移性癌、またはその組合せから選択される。

【0336】

ある実施形態において、多重特異性分子、例えば腫瘍標的化部分は、固形腫瘍抗原または間質抗原に結合する。固形腫瘍抗原または間質抗原は、固形腫瘍、またはその転移性病変に存在し得る。ある実施形態において、固形腫瘍は、膵臓癌（例えば、膵臓腺癌）、乳癌、大腸癌、肺癌（例えば、小細胞または非小細胞肺癌）、皮膚癌、卵巣癌、または肝臓癌の1つまたは複数から選択される。一実施形態において、固形腫瘍は、線維性または線維形成性固形腫瘍である。例えば、固形腫瘍抗原または間質抗原は、腫瘍、例えば限定された腫瘍灌流、圧縮された血管、または線維性腫瘍間質の1つまたは複数を含むことが特徴である種類の腫瘍に存在し得る。

【0337】

いくつかの実施形態において、固形腫瘍抗原は、PDL1、CD47、メソテリン、ガン

10

20

30

40

50

グリオシド 2 (GD2)、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、前立腺特異的膜抗原 (PMSA)、前立腺特異的抗原 (PSA)、癌胎児性抗原 (CEA)、Ronキナーゼ、c-Met、未熟ラミニン受容体、TAG-72、BING-4、カルシウム活性化塩素イオンチャンネル 2、サイクリン-B1、9D7、Ep-CAM、EphA3、Her2/neu、テロメラーゼ、SAP-1、サバイビン、NY-ESO-1/LAGE-1、PRAME、SSX-2、メラニン-A/MART-1、Gp100/pmel17、チロシナーゼ、TRP-1/-2、MC1R、 β -カテニン、BRCA1/2、CDK4、CML66、フィブロネクチン、p53、Ras、TGF- β 受容体、AFP、ETA、MAGE、MUC-1、CA-125、BAGE、GAGE、NY-ESO-1、 β -カテニン、CDK4、CDC27、CD47、 α アクチニン-4、TRP1/gp75、TRP2、gp100、メラニン-A/MART1、ガングリオシド、WT1、EphA3、上皮成長因子受容体 (EGFR)、CD20、MART-2、MART-1、MUC1、MUC2、MUM1、MUM2、MUM3、NA88-1、NPM、OA1、OGT、RCC、RUI1、RUI2、SAGE、TRG、TRP1、TSTA、葉酸受容体 α 、L1-CAM、CAIX、EGFRvIII、gpA33、GD3、GM2、VEGFR、インテグリン (インテグリン α V β 3、インテグリン α 5 β 1)、炭水化物 (Le)、IGF1R、EphA3、TRAILR1、TRAILR2、またはRANKLの1つまたは複数から選択される。

10

【0338】

ある実施形態において、固形腫瘍抗原は、PDL1、メソテリン、CD47、GD2、PMSA、PSCA、CEA、Ronキナーゼ、またはc-Metから選択される。

20

【0339】

一実施形態において、腫瘍標的化部分は、メソテリンに結合する抗体分子 (例えば、FabまたはscFv) を含む。ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、

【化1】

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGGQTTVT
VSS (配列番号1)

30

の重鎖可変ドメイン配列からの1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば配列番号1のCDR配列からの少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有するCDRを含む。

【0340】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、GYSFTGYTMN (配列番号2) ; LITPYNGASSYNQKFRG (配列番号3) ; およびGGYDGRGFDY (配列番号4) から選択される1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有するCDRを含む。

40

【0341】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、3つのCDR (ここで、CDR1は、GYSFTGYTMN (配列番号2) を含み ; CDR2は、LITPYNGASSYNQKFRG (配列番号3) を含み ; およびCDR3は、GGYDGRGFDY (配列番号4) を含む) 、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有するCDRからなる。

【0342】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、3つのCDR (ここで、CDR1は、GYSFTGYTMN (配列番号2) からなり ; CDR2は、LITPYNGAS

50

S Y N Q K F R G (配列番号3) からなり; C D R 3 は、G G Y D G R G F D Y (配列番号4) からなる)、または密接に関連した C D R、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変(例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換)を有する C D R からなる。

【0343】

実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、

【化2】

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGGQTTVT
VSS (配列番号1)

10

の重鎖可変ドメイン配列またはそれと実質的に同一である(例えば、それと95%~99.9%同一であるか、または配列番号1のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変(例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換)を有するアミノ酸配列を含む。

【0344】

実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、F a b であり、アミノ酸配列:

【化3】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT (配列番号5)

20

またはそれと実質的に同一である(例えば、それと95%~99.9%同一であるか、または配列番号5のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変(例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換)を有するアミノ酸配列を有する重鎖定常領域(CH1)をさらに含む。ある実施形態において、抗体分子は、シグナルペプチド、例えばアミノ酸配列: M E F G L S W V F L V A L F R G V Q C (配列番号6) を含むシグナルペプチドをさらに含む。

【0345】

あるいは、または本明細書に開示されるメソテリンに対する重鎖と組み合わせて、メソテリンに対する抗体分子は、

【化4】

DIELTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISVVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIK (配列番号7)

30

の軽鎖可変ドメイン配列からの1つ、2つ、3つの C D R、または密接に関連した C D R、例えば配列番号7の C D R 配列からの少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変(例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換)を有する C D R を含む。

【0346】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、S A S S S V S Y M H (配列番号8); D T S K L A S (配列番号9); および Q Q W S G Y P L T (配列番号10) からの1つ、2つ、3つの C D R、または密接に関連した C D R、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変(例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換)を有する C D R を含む。

【0347】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、3つの C D R (ここで、C D R 1 は、S A S S S V S Y M H (配列番号8) を含み; C D R 2 は、D T S K L A S (配列

40

50

番号 9) を含み; C D R 3 は、Q Q W S G Y P L T (配列番号 10) を含む)、または密接に関連した C D R、例えば少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、2 つ、3 つまたは 4 つ以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有する C D R からなる。

【0348】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、3 つの C D R (ここで、C D R 1 は、S A S S S V S Y M H (配列番号 8) からなり; C D R 2 は、D T S K L A S (配列番号 9) からなり; C D R 3 は、Q Q W S G Y P L T (配列番号 10) からなる)、または密接に関連した C D R、例えば少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、2 つ、3 つまたは 4 つ以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有する C D R からなる。

【0349】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、

【化 5】

DIELTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIK (配列番号 7)

の軽鎖可変ドメイン配列またはそれと実質的に同一である (例えば、それと 95% ~ 99.9% 同一であるか、または配列番号 7 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 または 15 個以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有するアミノ酸配列を含む。

【0350】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、F a b であり、アミノ酸配列:

【化 6】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 11)

またはそれと実質的に同一である (例えば、それと 95% ~ 99.9% 同一であるか、または配列番号 11 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 または 15 個以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有するアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域 (C L 1) をさらに含む。実施形態において、抗体分子は、シグナルペプチド、例えばアミノ酸配列: M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A (配列番号 12) を含むシグナルペプチドをさらに含む。

【0351】

他の実施形態において、多重特異性分子、例えば腫瘍標的化部分は、間質抗原に結合する。実施形態において、間質抗原は、線維芽細胞活性化プロテアーゼ (F A P)、T G F - β 、ヒアルロン酸、コラーゲン、例えばコラーゲン I V、テネイシン C、またはテネイシン W の 1 つまたは複数から選択される。

【0352】

一実施形態において、腫瘍標的化部分は、F A P、例えばヒト F A P に結合する抗体分子 (例えば、F a b または s c F v) を含む。ある実施形態において、F A P に対する抗体分子は、図 12 C に下線で示される重鎖可変ドメイン配列 (配列番号 13) からの 1 つ、2 つ、3 つの C D R、または密接に関連した C D R、例えば配列番号 13 の C D R 配列からの少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、2 つ、3 つまたは 4 つ以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有する C D R を含む。ある実施形態において、F A P に対する抗体分子は、図 12 C に下線で示される重鎖可変ドメイン配列 (配列番号 13) またはそれと実質的に同一である (例えば、それと 95% ~ 99.9% 同一であるか、または配列番号 13 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変で

あるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0353】

実施形態において、FAPに対する抗体分子は、Fabであり、アミノ酸配列：

【化7】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC (配列番号14)

またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号14のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を有する重鎖定常領域（CH1）をさらに含む。実施形態において、抗体分子は、シグナルペプチド、例えばアミノ酸配列：MEFGLSWVFLVALFRGVQCEV（配列番号15）を含むシグナルペプチドをさらに含む。

【0354】

あるいは、または本明細書に開示されるFAPに対する重鎖と組み合わせて、FAPに対する抗体分子は、図12Dに下線で示される軽鎖可変ドメイン配列（配列番号16）からの1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば配列番号16のCDR配列からの少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRを含む。ある実施形態において、FAPに対する抗体分子は、図12Dに下線で示される軽鎖可変ドメイン配列（配列番号16）またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号16のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0355】

実施形態において、FAPに対する抗体分子は、Fabであり、アミノ酸配列：

【化8】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ

DSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号11)

またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号11のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域（CL1）をさらに含む。ある実施形態において、抗体分子は、シグナルペプチド、例えばアミノ酸配列：MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA（配列番号12）を含むシグナルペプチドをさらに含む。

【0356】

他の実施形態において、多重特異性分子、例えば腫瘍標的化部分は、血液癌、例えば白血病またはリンパ腫の表面に存在する分子、例えば抗原に結合する。ある実施形態において、血液癌は、B細胞またはT細胞悪性腫瘍である。ある実施形態において、血液癌は、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（例えば、B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、有毛細胞白血病）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群（MDS）、多発性骨髄腫、または急性リンパ球性白血病の1つまたは複数から選択される。実施形態において、癌は、急性骨髄性白血病（AML）または骨髄異形成症候群（MDS）以外である。実施形態において、血液抗原は、CD19、CD33、CD123、またはCD20から選

10

20

30

40

50

択される。実施形態において、血液抗原は、CD33、CD19以外である。実施形態において、血液抗原は、CD19、CD20、CD33、CD47、CD123、CD20、CD99、CD30、BCMA、CD38、CD22、SLAMF7、またはNY-ESO1から選択される。

【0357】

サイトカイン分子

サイトカインは、一般に、例えば、シグナル伝達経路を介して細胞活性に影響を与えるポリペプチドである。したがって、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカインは、有用であり、細胞内の応答を調節するように細胞膜の外部から信号を伝達する受容体媒介シグナル伝達に関連し得る。サイトカインは、免疫応答のメディエータであるタンパク性シグナル伝達化合物である。それらは、増殖、分化および細胞生存／アポトーシスを含む多くの異なる細胞機能を制御し；サイトカインはまた、ウイルス感染および自己免疫疾患を含むいくつかの病態生理学的過程に関与する。サイトカインは、自然（単球、マクロファージ、樹枝状細胞）および適応（TおよびB細胞）免疫系の両方の様々な細胞によって様々な刺激下で合成される。サイトカインは、2つのグループ：炎症性および抗炎症性に分類され得る。IFN γ 、IL-1、IL-6およびTNF- α を含む炎症性サイトカインは、主に、自然免疫細胞およびTh1細胞に由来する。IL-10、IL-4、IL-13およびIL-5を含む抗炎症性サイトカインは、Th2免疫細胞から合成される。

【0358】

本開示は、1つまたは複数のサイトカイン分子、例えば免疫調節（例えば、炎症性）サイトカインおよびその変異体、例えばその機能的変異体を含む、例えばそれを含むように操作される特に多重特異性（例えば、二重、三重、四重特異性）タンパク質を提供する。したがって、ある実施形態において、サイトカイン分子は、インターロイキンまたはその変異体、例えばその機能的変異体である。ある実施形態において、インターロイキンは、炎症性インターロイキンである。ある実施形態において、インターロイキンは、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-12（IL-12）、インターロイキン-15（IL-15）、インターロイキン-18（IL-18）、インターロイキン-21（IL-21）、インターロイキン-7（IL-7）、またはインターフェロン γ から選択される。ある実施形態において、サイトカイン分子は、炎症性サイトカインである。

【0359】

いくつかの実施形態において、サイトカインは、一本鎖サイトカインである。いくつかの実施形態において、サイトカインは、多連鎖サイトカインである（例えば、サイトカインは、2つ以上の（例えば、2つの）ポリペプチド鎖を含む。例示的な多連鎖サイトカインは、IL-12である。

【0360】

有用なサイトカインの例としては、限定はされないが、GM-CSF、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-21、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TGF- β 、TNF- α 、およびTNF β が挙げられる。一実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカインは、GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、IFN- α 、IFN- γ 、MIP-1 α 、MIP-1 β およびTGF- β からなる群から選択されるサイトカインである。一実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカインは、IL-2、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IFN- α 、およびIFN- γ からなる群から選択されるサイトカインである。いくつかの実施形態において、サイトカインは、N-および／またはO-グリコシル化部位を除去するように変異される。グリコシル化の除去により、組み換え産生で得られる産物の均質性が増加される。

【0361】

一実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカインは、ＩＬ－２である。特定の実施形態において、ＩＬ－２サイトカインは、活性化Ｔリンパ球細胞における増殖、活性化Ｔリンパ球細胞における分化、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）活性、活性化Ｂ細胞における増殖、活性化Ｂ細胞における分化、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞における増殖、ＮＫ細胞における分化、活性化Ｔ細胞またはＮＫ細胞によるサイトカイン分泌、およびＮＫ／リンパ球活性化キラー（ＬＡＫ）抗腫瘍細胞毒性からなる群から選択される細胞応答の１つまたは複数を引き起こし得る。別の特定の実施形態において、ＩＬ－２サイトカインは、ＩＬ－２受容体のαサブユニットに対する減少した結合親和性を有する変異ＩＬ－２サイトカインである。βおよびγサブユニット（それぞれＣＤ１２２およびＣＤ１３２としても知られている）と一緒に、αサブユニット（ＣＤ２５としても知られている）は、ヘテロ三量体高親和性ＩＬ－２受容体を形成する一方、βおよびγサブユニットのみからなる二量体受容体は、中間親和性ＩＬ－２受容体と呼ばれる。全体が参照により本明細書に援用されるＰＣＴ特許出願番号ＰＣＴ／欧州特許出願公開第２０１２／０５１９９１号明細書に記載されるように、ＩＬ－２受容体のαサブユニットに対する減少した結合を有する変異ＩＬ－２ポリペプチドは、野生型ＩＬ－２ポリペプチドと比較して、制御性Ｔ細胞内のＩＬ－２シグナル伝達を誘導する減少した能力を有し、Ｔ細胞内のより少ない活性化誘導細胞死（ＡＩＣＤ）を誘導し、インビボでの減少した毒性プロフィールを有する。減少した毒性を有するこのようなサイトカインの使用は、Ｆｃドメインの存在により長い血清半減期を有する、本発明に係る多重特異性または多機能性ポリペプチドにおいて特に有利である。一実施形態において、本発明に係る多重特異性または多機能性ポリペプチドの変異ＩＬ－２サイトカインは、非変異ＩＬ－２サイトカインと比較して、ＩＬ－２受容体（ＣＤ２５）のαサブユニットに対する変異ＩＬ－２サイトカインの親和性を減少させるかまたはなくすが、中間親和性ＩＬ－２受容体（ＩＬ－２受容体のβおよびγサブユニットからなる）に対する変異ＩＬ－２サイトカインの親和性を保つ少なくとも１つのアミノ酸変異を含む。一実施形態において、１つまたは複数のアミノ酸変異は、アミノ酸置換である。特定の実施形態において、変異ＩＬ－２サイトカインは、ヒトＩＬ－２の残基４２、４５、および７２に対応する位置から選択される１つ、２つまたは３つの位置に１つ、２つまたは３つのアミノ酸置換を含む。より具体的な実施形態において、変異ＩＬ－２サイトカインは、ヒトＩＬ－２の残基４２、４５および７２に対応する位置に３つのアミノ酸置換を含む。さらに一層具体的な実施形態において、変異ＩＬ－２サイトカインは、アミノ酸置換Ｆ４２Ａ、Ｙ４５ＡおよびＬ７２Ｇを含むヒトＩＬ－２である。一実施形態において、変異ＩＬ－２サイトカインは、ＩＬ－２のＯーグリコシル化部位を除去する、ヒトＩＬ－２の位置３に対応する位置にアミノ酸変異をさらに含む。特に、前記さらなるアミノ酸変異は、トレオニン残基をアラニン残基で置換するアミノ酸置換である。本発明に有用な特定の変異ＩＬ－２サイトカインは、ヒトＩＬ－２の残基３、４２、４５および７２に対応する位置に４つのアミノ酸置換を含む。特異的なアミノ酸置換は、Ｔ３Ａ、Ｆ４２Ａ、Ｙ４５ＡおよびＬ７２Ｇである。ＰＣＴ特許出願番号ＰＣＴ／欧州特許出願公開第２０１２／０５１９９１号明細書および添付の実施例に示されるように、前記四重変異ＩＬ－２ポリペプチド（ＩＬ－２_{qm}）は、ＣＤ２５への検出可能な結合を示さず、Ｔ細胞内でアポトーシスを誘導する減少した能力、Ｔ_{reg}細胞内のＩＬ－２シグナル伝達を誘導する減少した能力、およびインビボでの減少した毒性プロフィールを示す。しかしながら、それは、エフェクター細胞内のＩＬ－２シグナル伝達を活性化し、エフェクター細胞の増殖を誘導し、ＮＫ細胞によって二次サイトカインとしてＩＦＮ－γを生成する能力を保持する。

【０３６２】

上記の実施形態のいずれかに係るＩＬ－２または変異ＩＬ－２サイトカインは、増加した発現または安定性などのさらなる利点を提供するさらなる変異を含み得る。例えば、位置１２５におけるシステインは、ジスルフィド架橋ＩＬ－２二量体の形成を避けるために、アラニンなどの中性アミノ酸で置換され得る。したがって、いくつかの実施形態において、本発明に係る多重特異性または多機能性ポリペプチドのＩＬ－２または変異ＩＬ－２サ

10

20

30

40

50

イトカインは、ヒト IL-2 の残基 125 に対応する位置にさらなるアミノ酸変異を含む。一実施形態において、前記さらなるアミノ酸変異は、アミノ酸置換 C125A である。

【0363】

特定の実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドの IL-2 サイトカインは、配列番号 227

【化9】

[APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN
YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL
RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT]

10

のポリペプチド配列を含む。別の特定の実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドの IL-2 サイトカインは、配列番号 228

【化10】

[APASSSTKKT QLQLEHLLLD
LQMILNGINN YKNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLQCLE
EELKPLEEVLNGAQSKNFHL RPRDLISNIN
VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT]

20

のポリペプチド配列を含む。

【0364】

別の実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカインは、IL-12 である。特定の実施形態において、前記 IL-12 サイトカインは、一本鎖 IL-12 サイトカインである。さらに一層具体的な実施形態において、一本鎖 IL-12 サイトカインは、配列番号 229

【化11】

[IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVK
EFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGR
FTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVEQCEDSA
CPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEY
PDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSS
SWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFCLHHSQNLLRAVSNMLQ
KARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRK
TSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFN
SETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS]

30

40

のポリペプチド配列を含む。一実施形態において、IL-12 サイトカインは、NK 細胞における増殖、NK 細胞における分化、T 細胞における増殖、および T 細胞における分化からなる群から選択される細胞応答の 1 つまたは複数を引き起こし得る。

【0365】

別の実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカインは、IL-10 である。特定の実施形態において、前記 IL-10 サイトカインは、一本鎖 IL-10 サイトカインである。さらに一層具体的な実施形態において、一本鎖 IL-10 サイトカインは、配列番号 230

50

【化 1 2】

[SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKG
YLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENK
SKAVEQVKNAPNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRNGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLE
DFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLP
CENKSKAVEQVKNAPNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN]

10

のポリペプチド配列を含む。別の特定の実施形態において、I L - 1 0 サイトカインは、モノマー I L - 1 0 サイトカインである。より具体的な実施形態において、モノマー I L - 1 0 サイトカインは、配列番号 2 3 1

【化 1 3】

[SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKG
YLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENG
GGSGGKSKAVEQVKNAPNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN]

のポリペプチド配列を含む。一実施形態において、I L - 1 0 サイトカインは、サイトカイン分泌の阻害、抗原提示細胞による抗原提示の阻害、酸素ラジカル放出の減少、および T 細胞増殖の阻害からなる群から選択される細胞応答の 1 つまたは複数を引き起こし得る。サイトカインが I L - 1 0 である、本発明に係る多重特異性または多機能性ポリペプチドは、例えば炎症性疾患の治療における、炎症の抑制に特に有用である。

20

【0 3 6 6】

別の実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカインは、I L - 1 5 である。特定の実施形態において、前記 I L - 1 5 サイトカインは、I L - 1 5 受容体の α -サブユニットに対する減少した結合親和性を有する変異 I L - 1 5 サイトカインである。理論に制約されることを望むものではないが、I L - 1 5 受容体の α -サブユニットに対する減少した結合を有する変異 I L - 1 5 ポリペプチドは、全身にわたって線維芽細胞に結合する減少した能力を有し、野生型 I L - 1 5 ポリペプチドと比較して、向上した薬物動態および毒性プロファイルをもたらす。記載される変異 I L - 2 および変異 I L - 1 5 エフェクター部分などの減少した毒性を有するサイトカインの使用は、F c ドメインの存在により長い血清半減期を有する、本発明に係る多重特異性または多機能性ポリペプチドにおいて特に有利である。一実施形態において、本発明に係る多重特異性または多機能性ポリペプチドの変異 I L - 1 5 サイトカインは、非変異 I L - 1 5 サイトカインと比較して、I L - 1 5 受容体の α -サブユニットに対する変異 I L - 1 5 サイトカインの親和性を減少させるかまたはなくすが、中間親和性 I L - 1 5 / I L - 2 受容体 (I L - 1 5 / I L - 2 受容体の β -および γ -サブユニットからなる) に対する変異 I L - 1 5 サイトカインの親和性を保つ少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含む。一実施形態において、アミノ酸変異は、アミノ酸置換である。特定の実施形態において、変異 I L - 1 5 サイトカインは、ヒト I L - 1 5 の残基 5 3 に対応する位置にアミノ酸置換を含む。より具体的な実施形態において、変異 I L - 1 5 サイトカインは、アミノ酸置換 E 5 3 A を含むヒト I L - 1 5 である。一実施形態において、変異 I L - 1 5 サイトカインは、I L - 1 5 の N-グリコシル化部位を除去する、ヒト I L - 1 5 の位置 7 9 に対応する位置にアミノ酸変異をさらに含む。特に、前記さらなるアミノ酸変異は、アスパラギン残基をアラニン残基で置換するアミノ酸置換である。さらに一層具体的な実施形態において、I L - 1 5 サイトカインは、配列番号 2 3 2

30

40

50

【化 1 4】

[NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLASGDASIH
DTVENLIILANNSLSSNGAVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS]

のポリペプチド配列を含む。一実施形態において、IL-15 サイトカインは、活性化Tリンパ球細胞における増殖、活性化Tリンパ球細胞における分化、細胞傷害性T細胞（CTL）活性、活性化B細胞における増殖、活性化B細胞における分化、ナチュラルキラー（NK）細胞における増殖、NK細胞における分化、活性化T細胞またはNK細胞によるサイトカイン分泌、およびNK／リンパ球活性化キラー（LAK）抗腫瘍細胞毒性からなる群から選択される細胞応答の1つまたは複数を引き起こし得る。

10

【0367】

多重特異性または多機能性ポリペプチドにおけるエフェクター部分として有用な変異サイトカイン分子は、当該技術分野において周知の遺伝的または化学的方法を用いて、欠失、置換、挿入または修飾によって調製され得る。遺伝的方法は、コードDNA配列の部位特異的突然変異、PCR、遺伝子合成などを含み得る。適切なヌクレオチド変化は、例えばシーケンシングによって確認され得る。置換または挿入は、天然ならびに非天然アミノ酸残基を含み得る。アミノ酸修飾は、グリコシル化部位または炭水化物結合の付加または除去などの化学修飾の周知の方法を含む。

【0368】

20

一実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカイン、特に一本鎖サイトカインは、GM-CSFである。特定の実施形態において、GM-CSF サイトカインは、顆粒球、単球または樹枝状細胞における増殖および／または分化を引き起こし得る。一実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカイン、特に一本鎖サイトカインは、IFN- α である。特定の実施形態において、IFN- α サイトカインは、ウイルス感染細胞におけるウイルス複製の阻害、および主要組織適合性複合体I（MHC I）の発現の上方制御からなる群から選択される細胞応答の1つまたは複数を引き起こし得る。別の特定の実施形態において、IFN- α サイトカインは、腫瘍細胞における増殖を阻害し得る。一実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカイン、特に一本鎖サイトカインは、IFN- γ である。特定の実施形態において、IFN- γ サイトカインは、増加したマクロファージ活性、MHC分子の増加した発現、および増加したNK細胞活性からなる群から選択される細胞応答の1つまたは複数を引き起こし得る。一実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカイン、特に一本鎖サイトカインは、IL-7である。特定の実施形態において、IL-7 サイトカインは、Tおよび／またはBリンパ球の増殖を引き起こし得る。一実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカイン、特に一本鎖サイトカインは、IL-8である。特定の実施形態において、IL-8 サイトカインは、好中球における走化性を引き起こし得る。一実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカイン、特に一本鎖サイトカインは、MIP-1 α である。特定の実施形態において、MIP-1 α サイトカインは、単球およびTリンパ球細胞における走化性を引き起こし得る。一実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカイン、特に一本鎖サイトカインは、MIP-1 β である。特定の実施形態において、MIP-1 β サイトカインは、単球およびTリンパ球細胞における走化性を引き起こし得る。一実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドのサイトカイン、特に一本鎖サイトカインは、TGF- β である。特定の実施形態において、TGF- β サイトカインは、単球における走化性、マクロファージにおける走化性、活性化マクロファージにおけるIL-1発現の上方制御、および活性化B細胞におけるIgA発現の上方制御からなる群から選択される細胞応答の1つまたは複数を引き起こし得る。

30

40

【0369】

一実施形態において、本発明の多重特異性または多機能性ポリペプチドは、対照サイトカ

50

インの解離定数 (K_D) より少なくとも約 1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5 または 10 倍大きい解離定数 (K_D) でサイトカイン受容体に結合する。別の実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、2 つ以上のエフェクター部分を含む対応する多重特異性または多機能性ポリペプチドの K_D より少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 倍大きい K_D でサイトカイン受容体に結合する。別の実施形態において、多重特異性または多機能性ポリペプチドは、2 つ以上のサイトカインを含む対応する多重特異性または多機能性ポリペプチドの解離定数 K_D より約 10 倍大きい解離定数 K_D でサイトカイン受容体に結合する。

【0370】

ある実施形態において、本明細書に開示される多重特異性分子は、サイトカイン分子を含む。実施形態において、サイトカイン分子は、サイトカインの完全長、断片もしくは変異体；サイトカイン受容体ドメイン、例えばサイトカイン受容体二量体化ドメインまたはサイトカイン受容体のアゴニスト、例えばサイトカイン受容体に対する抗体分子（例えば、作動性抗体）を含む。

【0371】

ある実施形態において、サイトカイン分子は、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-7、IL-21 もしくはインターフェロン γ 、またはその断片もしくは変異体、あるいは上記のサイトカインのいずれかの組合せから選択される。サイトカイン分子は、モノマーまたは二量体であり得る。実施形態において、サイトカイン分子は、サイトカイン受容体二量体化ドメインをさらに含み得る。

【0372】

他の実施形態において、サイトカイン分子は、サイトカイン受容体のアゴニスト、例えば IL-15Ra または IL-21R から選択される、サイトカイン受容体に対する抗体分子（例えば、作動性抗体）である。

【0373】

一実施形態において、サイトカイン分子は、IL-15、例えばヒト IL-15 である（例えば、アミノ酸配列：

【化15】

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLES GDASH
DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (配列番号17)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと 95%～99.9% 同一であるか、または配列番号 17 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 または 15 個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0374】

ある実施形態において、サイトカイン分子は、受容体二量体化ドメイン、例えば IL15R α 二量体化ドメインを含む。一実施形態において、IL15R α 二量体化ドメインは、アミノ酸配列：

【化16】

MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICN
SGFKRKAGTSSLTECVL (配列番号18)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと 95%～99.9% 同一であるか、または配列番号 18 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 または 15 個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。ある実施形態において、多重特異性分子のサイトカ

イン分子（例えば、 $IL-15$ ）および受容体二量体化ドメイン（例えば、 $IL15R\alpha$ 二量体化ドメイン）は、例えば、リンカー（例えば、 $Gly-Ser$ リンカー、例えばアミノ酸配列 $SGSGSGSGSGSGSGSLQ$ （配列番号19）を含むリンカーを介して共有結合される。他の実施形態において、多重特異性分子のサイトカイン分子（例えば、 $IL-15$ ）および受容体二量体化ドメイン（例えば、 $IL15R\alpha$ 二量体化ドメイン）は、共有結合されず、例えば非共有結合的に結合される。

【0375】

他の実施形態において、サイトカイン分子は、 $IL-2$ 、例えばヒト $IL-2$ である（例えば、アミノ酸配列：

【化17】

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
EEELKPLEEVNLNAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFCQSIISTLT（配列番号20）

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号20のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

【0376】

他の実施形態において、サイトカイン分子は、 $IL-18$ 、例えばヒト $IL-18$ である（例えば、アミノ酸配列：

【化18】

YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGM
AVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSY
EGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED（配列番号21）

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号21のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

【0377】

他の実施形態において、サイトカイン分子は、 $IL-21$ 、例えばヒト $IL-21$ である（例えば、アミノ酸配列：

【化19】

QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSA
NTGNNERIINVSIKCLKRKPPSTNAGRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMI
HQHLSSRTHGSEDS（配列番号22）

30

40

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号22のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

【0378】

さらに他の実施形態において、サイトカイン分子は、インターフェロン γ 、例えばヒトインターフェロン γ である（例えば、アミノ酸配列：

50

【化 20】

QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFK
NFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVM
AELSPA AKTGKRKRSQMLFRG (配列番号23)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号23のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

10

【0379】

免疫細胞エンゲージャ

本明細書に開示される多重特異性分子の免疫細胞エンゲージャは、免疫細胞、例えば免疫エフェクター細胞への結合、および／またはその活性化を媒介し得る。ある実施形態において、免疫細胞は、NK細胞、B細胞、樹枝状細胞、またはマクロファージ細胞エンゲージャ、またはその組合せから選択される。ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、T細胞エンゲージャ、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャ、またはその組合せの1つ、2つ、3つまたは全てから選択される。免疫細胞エンゲージャは、免疫系のアゴニストであり得る。ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、抗体分子、リガンド分子（例えば、免疫グロブリン定常領域、例えばFc領域をさらに含むリガンド）、小分子、ヌクレオチド分子であり得る。

20

【0380】

ナチュラルキラー細胞エンゲージャ

ナチュラルキラー（NK）細胞は、抗体に依存しない方法で腫瘍およびウイルス感染細胞を認識し、破壊する。NK細胞の制御は、NK細胞表面上の受容体を活性化および阻害することによって媒介される。受容体を活性化する1つのファミリーは、NKp30、NKp44およびNKp46を含む天然細胞毒性受容体（NCR）である。NCRは、癌細胞上のヘパラン硫酸の認識によって腫瘍標的化を開始させる。NKGD2は、細胞傷害性活性をもたらす活性化キラー（NK）細胞における刺激および共刺激自然免疫応答の両方を提供する受容体である。DNAM1は、細胞間接着、リンパ球シグナル伝達、細胞毒性、ならびに細胞傷害性T-リンパ球（CTL）およびNK細胞によって媒介されるリンホカイン分泌に関与する受容体である。DAP10（HCSTとしても知られている）は、KLK1と結合して、リンパ細胞および骨髄細胞内で活性化受容体KLK1-HCSTを形成する膜貫通アダプタータンパク質であり；この受容体は、MHCクラスI鎖関連MIC AおよびMIC B、およびU（任意選択的にL1）6-結合タンパク質（ULBP）などの細胞表面リガンドを発現する標的細胞に対する細胞毒性を引き起こす際に大きい役割を果たし；KLK1-HCST受容体は、腫瘍に対する免疫学的監視において役割を果たし、腫瘍細胞の細胞溶解に必要とされ；実際に、KLK1リガンドを発現しない黒色腫細胞は、NK細胞によって媒介される免疫学的監視から逃れる。CD16は、複合体化または凝集IgGおよびさらにモノマーIgGに結合し、それにより抗体依存性細胞傷害（ADCC）および食作用などの他の抗体依存性応答を媒介する、IgGのFc領域の受容体である。

30

40

【0381】

ある実施形態において、NK細胞エンゲージャは、ウイルス赤血球凝集素（HA）であり、HAは、インフルエンザウイルスの表面に見られる糖タンパク質である。それは、上気道または赤血球中の細胞などの細胞に、膜上のシアル酸でウイルスを結合させるのに関与する。HAは、少なくとも18の異なる抗原を有する。これらのサブタイプは、H1～H18と名付けられる。NCRは、ウイルスタンパク質を認識し得る。NKp46は、センダイウイルスおよびニューカッスル病ウイルスを含む、インフルエンザのHAおよびパラ

50

ミクソウイルスのHA-N Aと相互作用することができることが示されている。NK p 4 6に加えて、NK p 4 4も様々なインフルエンザサブタイプのHAと機能的に相互作用し得る。

【0382】

本開示は、NK細胞への結合および／またはその活性化を媒介する1つまたは複数のNK細胞エンゲージャを含むように操作される特に多重特異性（例えば、二重、三重、四重特異性）タンパク質を提供する。したがって、ある実施形態において、NK細胞エンゲージャは、NK p 3 0、NK p 4 0、NK p 4 4、NK p 4 6、NKG2D、DNAM1、DAP10、CD16（例えば、CD16a、CD16b、または両方）、CRTAM、CD27、PSGL1、CD96、CD100（SEMA4D）、NK p 8 0、CD244（SLAMF4または2B4としても知られている）、SLAMF6、SLAMF7、KIR2DS2、KIR2DS4、KIR3DS1、KIR2DS3、KIR2DS5、KIR2DS1、CD94、NKG2C、NKG2E、またはCD160に結合する（例えば、それを活性化する）抗原結合ドメインまたはリガンドから選択される。

【0383】

一実施形態において、NK細胞エンゲージャは、B7-6であるNK p 3 0のリガンドであり、例えば、

【化21】

DLKVEMMAGGTQITPLNDNVTIFCNIFYSQPLNITSMGITWFWKSLTFDKEVKVFEFFGD
HQEAFRPGAIVSPWRLKSGDASRLRPGIQLLEEAGEYRCEVVVTPLKAQGTVQLEVVASP
ASRLLLDQVGMKENEDKYMCESSGFYPEAINITWEKQTQKFPHPPIEISEDVITGPTIKNM
DGTFNVTSLKLNSSQEDPGTVYQCVRHASLHTPLRSNFTLTAARHSLSETEKTDNFS
(配列番号24)

のアミノ酸配列、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号24のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0384】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、ウイルスHAである、NK p 4 4またはNK p 4 6のリガンドである。ウイルスヘماغグチニン（HA）は、ウイルスの表面にある糖タンパク質である。HAタンパク質は、細胞膜とのウイルス膜の融合に寄与するシアル酸糖部分を介して、細胞の膜にウイルスを結合させる（例えば、Eur J Immunol. 2001 Sep; 31 (9) : 2680-9 “Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30” ; および Nature. 2001 Feb 22; 409 (6823) : 1055-60 “Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells”（これらのそれぞれの内容が参照により本明細書に援用される）を参照）。

【0385】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、MICA、MICB、またはULBP1から選択されるNKG2Dのリガンドであり、例えば、

(i) MICAは、アミノ酸配列：

10

20

30

40

50

【化 2 2】

EPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFLRCRQKCRAPQGQWAEDVLGNK
TWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFFYYDGEL
FLSQNLETKEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLK
SGVVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWG
DVLDPDNGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHW (配列
番号25)

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号25のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含み；

(ii) MICBは、アミノ酸配列：

【化 2 3】

AEPHSLRYNLMVLSQDESQSGFLAEGHLDGQPFLRYDRQKRRAPQGQWAEDVLGA
KTWDTETEDLTENGQDLRRTLTHIKDQKGGLHSLQEIRVCEIHEDSSSTRGSRHFYYDGEL
FLSQNLETQESTVPQSSRAQTLAMNVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRYLK
SGVAIRRTVPPMVNVTCSEVSEGNITVTCRASSFYPRNITLTWRQDGVSLSHNTQQWGD
VLPDNGNGTYQTWVATRIRQGEEQRFTCYMEHSGNHGTHPVPSGKVLVLQSQRTD (配列
番号26)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号26のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含み；または

(iii) ULBP1は、アミノ酸配列：

【化 2 4】

GWVDTHCLCYDFIITPKSRPEPQWCEVQGLVDERPFLHYDCVNHKAKAFASLGKKVNV
TKTWEEQTETLRDVVDLKGQLLDIQVENLIPIEPLTLQARMSCEHEAHGHGRGSWQFL
FNGQKFLFLFDSNNRKWTALHPGAKKMTEKWEKNRDVTMFFQKISLGDCCKMWLEEFL
MYWEQMLDPTKPPSLAPG (配列番号27)

30

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号27のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0386】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、NECTIN2またはNECL5から選択されるDNAM1のリガンドであり、例えば、

(i) NECTIN2は、アミノ酸配列：

50

【化 2 5】

QDVRVQVLPEVRGQLGGTVELPCHLLPPVPGLYISLVTWQRPDAPANHQNVAAFHHPKM
 GPSFPSPKPGSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTCEFATFPKGS
 VRGMTWLRVIAKPKNQAEAQKVTFSDPTTVALCISKEGRPPARISWLSSLDWEAKETQ
 VSGTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTCKVEHESFEEPALIPVTLVRYPPPEVSISGYD
 DNWYLGRTDATLSCDVRSNPEPTGYDWSTTSGTFPTSAVAQGSQVLVIHAVDSLNTTFV
 CTVTNAVGMGRAEQVIFVRETPNTAGAGATGG (配列番号28)

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号28のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含み；または

(ii) NECL5は、アミノ酸配列：

【化 2 6】

WPPPGTGDVVVQAPTQVPGFLGDSVTLP CYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSMAY
 FHQTQGPSYSESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVD
 IWLRLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQITWHSDLGGMPNTSQVPG
 FLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPPEVSISGYDNN
 WYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPVDKPIINTTLICN
 VTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGISRN (配列番号29)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号29のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0387】

30

さらに他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、NK G2Dのアダプターである、DAP10のリガンドである（例えば、Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May 24; 102 (21): 7641-7646; および Blood, 15 September 2011 Volume 118, Number 11 (これらのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される)を参照)。

【0388】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、CD16a/bリガンドである、CD16のリガンドであり、例えば、CD16a/bリガンドは、抗体Fc領域をさらに含む（例えば、どのように抗体がFcを用いて、CD16を介してNK細胞を誘発するかを記載している Front Immunol. 2013; 4: 76 (この全内容が本明細書に援用される)を参照)。

40

【0389】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、NECL2である、CRTAMのリガンドであり、例えば、NECL2は、アミノ酸配列：

【化 2 7】

QNLFTKDVTVIEGEVATISCQVNKSDDSVIQLLNPNRQTIYFRDFRPLKDSRFQLLNFS
 ELKVSLTNVSISDEGRYFCQLYTDPPQESYTTITVLVPPRNLMIDIQKDTAVEGEEIEVNC
 TAMASKPATTIRWFKGNTELKKGKSEVEEWSDMYTVTSQMLMLKVHKEDDGVVICQVE
 HPAVTGNLQTRYLEVQYKPQVHIQMTYPLQGLTREGDALELTCEAIGKPQPMVTWV
 RVDDEMPQHAVLSGPNLFNNLNKTDNGTYRCEASNIVGKAHSDYMLYVYDPPTTIPPP
 TTTTTTTTTTTTTILTITDSRAGEEGSIRAVDH (配列番号30)

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号30のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0390】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、CD70である、CD27のリガンドであり、例えば、CD70は、アミノ酸配列：

【化 2 8】

QRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPDLKGG
 LRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQR
 LTPLARGDTLCTNLTGTLPSRNTDETFQGVQWVRP (配列番号31)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号31のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0391】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、L-セレクチン（CD62L）である、PSGL1のリガンドであり、例えば、L-セレクチンは、アミノ酸配列：

30

【化 2 9】

WTYHYSEKPMNWQRARRFCRDNYTDLVAIQNKAEIEYLEKTLPFSSRSYYWIGIRKIGGI
 WTWVGTNKSLEEAENWGDGEPNNKKNKEDCVEIYIKRNKDAGKWNDACHKLKAA
 LCYTASCQPWSCSGHGECVEIINNYTCNCDVGYYGPQCQFVIQCEPLEAPELGTMDCTH
 PLGNFSFSSQCAFSCSEGTLTGIEETTCGPFGNWSSPEPTCQVIQCEPLSAPDLGIMNCSH
 PLASFSTSACTFICSEGTELIGKKKTICSSGIWSNPSPICQKLDKSFMSIKEGDYN (配列
 番号32)

40

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号32のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0392】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、NECL5である、CD96のリガンドであり、例えば、NECL5は、アミノ酸配列：

50

【化 3 0】

WPPPGTGDVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSMVAV
FHQTQGPSYSESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVD
IWLRLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQITWHSDLGGMPNTSQVPG
FLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPPEVSISGYDNN
WYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLRPVDKPIINTLICN
VTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGISRN (配列番号29)

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号30のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0393】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、CD72である、CD100（SEMA4D）のリガンドであり、例えば、CD72は、アミノ酸配列：

【化 3 1】

RYLQVSQQLQQTNRVLEVTNSSLRQQRLKITQLGQSAEDLQGSRRRLAQSQEALQVEQ
RAHQAAEGQLQACQADRQKTKETLQSEEQRRRALEQKLSNMENRLKPFFTCGSADTCC
PSGWIMHQKSCFYISLTSKNWQESQKQCETLSSKLATFSEIYPQSHSYFLNSLLPNGGS
GNSYWTGLSSNKDWKLTDDTQRTRTYAQSSKCNKVHKTWSWWTLESESCRSSLPYICE
MTAFRFPD (配列番号33)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号33のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0394】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、CLEC2B（AICL）である、NKP80のリガンドであり、例えば、CLEC2B（AICL）は、アミノ酸配列：

【化 3 2】

KLTRDSQSLCPYDWIGFQNKCYFYSKEEGDWNSSKYNCSTQHADLTIIDNIEEMNFLRR
YKCSSDHWIGLKMAKNRTGQWVDGATFTKSFGMRGSEGCAYLSDDGAATARCYTER
KWICKRKRIH (配列番号34)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号34のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0395】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、CD48である、CD244のリガンドであり、例えば、CD48は、アミノ酸配列：

50

【化 3 3】

QGHVLHMTVVSGSNVTNLNISESLPENYKQLTWFYTFDQKIVEWDSRKSKEYFESKFKGR
 VRLDPQSGALYISKVQKEDNSTYIMRVLKKTGNEQEWKIKLQVLDPVKPKVIEKIEDM
 DDNCYLKLSCVIPGESVNYTWYGDKRPFKELQNSVLETTLMPHNYSRCYTCQVSNSVS
 SKNGTVCLSPCTLARS (配列番号35)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号35のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0396】

T細胞エンゲージャ

本開示は、T細胞への結合および／またはその活性化を媒介する1つまたは複数のT細胞エンゲージャを含むように操作される特に多重特異性（例えば、二重、三重、四重特異性）タンパク質を提供する。したがって、ある実施形態において、T細胞エンゲージャは、CD3、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR ζ 、ICOS、CD28、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、SLAM、CD2、またはCD226の1つまたは複数に結合する（例えば、ある実施形態において、それを活性化する）抗原結合ドメインまたはリガンドから選択される。他の実施形態において、T細胞エンゲージャは、CD3、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、TCR ζ 、ICOS、CD28、CD27、HVEM、LIGHT、CD40、4-1BB、OX40、DR3、GITR、CD30、TIM1、SLAM、CD2、またはCD226の1つまたは複数に結合し、それを活性化しない抗原結合ドメインまたはリガンドから選択される。ある実施形態において、T細胞エンゲージャは、CD3に結合する。

【0397】

B細胞、マクロファージおよび樹枝状細胞エンゲージャ

概して、Bリンパ球としても知られているB細胞は、リンパ球サブタイプの白血球のタイプである。それらは、抗体を分泌することにより、適応免疫系の体液性免疫成分中で機能する。さらに、B細胞は、抗原（それらは、プロフェッショナル抗原提示細胞（APC）としても分類される）を提示し、サイトカインを分泌する。マクロファージは、食作用により、細胞残屑、異物、微生物、癌細胞を取り込み、消化する白血球のタイプである。食作用に加えて、それらは、非特異的防御（自然免疫）において重要な役割を果たし、また、リンパ球などの他の免疫細胞を動員することによって特異的防御機構（適応免疫）を開始させるのに役立つ。例えば、それらは、T細胞に対する抗原提示因子（antigen presenter）として重要である。炎症の増加および免疫系の刺激に加えて、マクロファージは、重要な抗炎症の役割も果たし、サイトカインの放出によって免疫反応を減少させ得る。樹枝状細胞（DC）は、抗原物質をプロセッシングし、免疫系のT細胞に対する細胞表面にそれを提示する際に機能する抗原提示細胞である。

【0398】

本開示は、B細胞、マクロファージ、および／または樹枝状細胞への結合および／またはその活性化を媒介する、1つまたは複数のB細胞、マクロファージ、および／または樹枝状細胞エンゲージャを含む、例えば含むように操作される特に多重特異性（例えば、二重、三重、四重特異性）タンパク質を提供する。

【0399】

したがって、ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、CD40リガンド（CD40L）もしくはCD70リガンド；CD40もしくはCD70に結合する抗体分子；OX40に対する抗体分子；OX40リガンド（OX40L）；Toll様受容体のアゴニスト（例えば、本明細書に記載されるような例えばTLR4、例えば構成的活性型TLR

4 (c a T L R 4) もしくは T L R 9 アゴニスト) ; 4 1 B B ; C D 2 ; C D 4 7 または S T I N G アゴニストあるいはその組合せの 1 つまたは複数から選択される B 細胞、マクロファージおよび／または樹枝状細胞エンゲージャを含む。

【0400】

ある実施形態において、B 細胞エンゲージャは、C D 4 0 L、O X 4 0 L もしくは C D 7 0 リガンドまたは O X 4 0、C D 4 0 もしくは C D 7 0 に結合する抗体分子である。

【0401】

ある実施形態において、マクロファージエンゲージャは、C D 2 アゴニストである。ある実施形態において、マクロファージエンゲージャは、C D 4 0 L に結合する抗原結合ドメイン、または C D 4 0 に結合する抗原結合ドメインまたはリガンド、T o l l 様受容体 (T L R) アゴニスト (例えば、本明細書に記載されるような)、例えば T L R 9 または T L R 4 (例えば、c a T L R 4 (構成的活性型 T L R 4))、C D 4 7、または S T I N G アゴニストである。ある実施形態において、S T I N G アゴニストは、環状ジヌクレオチド、例えば環状ジ-GMP (c d GMP) または環状ジ-AMP (c d AMP) である。ある実施形態において、S T I N G アゴニストは、ビオチン化されている。

【0402】

ある実施形態において、樹枝状細胞エンゲージャは、C D 2 アゴニストである。ある実施形態において、樹枝状細胞エンゲージャは、リガンド、受容体アゴニスト、または O X 4 0 L、4 1 B B の 1 つまたは複数に結合する抗体分子、T L R アゴニスト (例えば、本明細書に記載されるような) (例えば、T L R 9 アゴニスト、T L R 4 (例えば、c a T L R 4 (構成的活性型 T L R 4))、C D 4 7、またはおよび S T I N G アゴニストである。ある実施形態において、S T I N G アゴニストは、環状ジヌクレオチド、例えば環状ジ-GMP (c d GMP) または環状ジ-AMP (c d AMP) である。ある実施形態において、S T I N G アゴニストは、ビオチン化されている。

【0403】

他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、B 細胞、マクロファージ、および／または樹枝状細胞の 1 つまたは複数への結合、またはその活性化を媒介する。例示的な B 細胞、マクロファージ、および／または樹枝状細胞エンゲージャは、C D 4 0 リガンド (C D 4 0 L) もしくは C D 7 0 リガンド ; C D 4 0 もしくは C D 7 0 に結合する抗体分子 ; O X 4 0 に対する抗体分子 ; O X 4 0 リガンド (O X 4 0 L) ; T o l l 様受容体アゴニスト (例えば、T L R 4、例えば構成的活性型 T L R 4 (c a T L R 4) もしくは T L R 9 アゴニスト) ; 4 1 B B アゴニスト ; C D 2 ; C D 4 7 または S T I N G アゴニストあるいはその組合せの 1 つまたは複数から選択され得る。

【0404】

ある実施形態において、B 細胞エンゲージャは、C D 4 0 L、O X 4 0 L もしくは C D 7 0 リガンドまたは O X 4 0、C D 4 0 もしくは C D 7 0 に結合する抗体分子の 1 つまたは複数から選択される。

【0405】

他の実施形態において、マクロファージ細胞エンゲージャは、C D 2 アゴニスト ; C D 4 0 L ; O X 4 0 L ; O X 4 0、C D 4 0 もしくは C D 7 0 に結合する抗体分子 ; T o l l 様受容体アゴニストもしくはその断片 (例えば、T L R 4、例えば構成的活性型 T L R 4 (c a T L R 4)) ; C D 4 7 アゴニスト ; または S T I N G アゴニストの 1 つまたは複数から選択される。

【0406】

他の実施形態において、樹枝状細胞エンゲージャは、C D 2 アゴニスト、O X 4 0 抗体、O X 4 0 L、4 1 B B アゴニスト、T o l l 様受容体アゴニストもしくはその断片 (例えば、T L R 4、例えば構成的活性型 T L R 4 (c a T L R 4))、C D 4 7 アゴニストまたは S T I N G アゴニストの 1 つまたは複数から選択される。

【0407】

一実施形態において、O X 4 0 L は、アミノ酸配列：

【化 3 4】

QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDFYLIISLKGYSFSQ
EVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGE
LILIHQNPGEFCVL (配列番号36)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号36のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保守的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0408】

別の実施形態において、CD40Lは、アミノ酸配列：

【化 3 5】

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLY
YIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFE
LQPGASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL (配列番号37)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号37のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保守的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0409】

さらに他の実施形態において、STINGアゴニストは、任意選択的に、2'，5'または3'，5'リン酸塩結合とともに環状ジヌクレオチド、例えば環状ジ-GMP（cdGMP）、環状ジ-AMP（cdAMP）、またはその組合せを含む。

【0410】

一実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、例えば、アミノ酸配列：

【化 3 6】

ACPWAVSGARASPGSAASPRRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS
WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALH
LQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH
AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (配列番号38)

30

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号38のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保守的置換）を有するアミノ酸配列を含む、41BBリガンドを含む。

【0411】

40

Toll様受容体

Toll様受容体（TLR）は、ショウジョウバエTollタンパク質のホモログである進化的に保存された受容体であり、微生物病原体によってのみ発現される、病原体関連微生物パターン（PAMP）として知られている高度に保存された構造モチーフ、または壊死または死細胞から放出される内因性分子である危険関連分子パターン（DAMP）を認識する。PAMPは、リポ多糖（LPS）、ペプチドグリカン（PGN）およびリポペプチド、ならびにフラジェリン、細菌DNAおよびウイルス二本鎖RNAなどの様々な細菌細胞壁成分を含む。DAMPは、熱ショックタンパク質などの細胞内タンパク質ならびに細胞外基質からのタンパク質断片を含む。対応するPAMPまたはDAMPによるTLRの刺激は、シグナル伝達カスケードを開始させて、AP-1、NF-κBおよびインター

50

フェロン調節因子 (IRF) などの転写因子の活性化をもたらす。TLRによるシグナル伝達は、適応免疫応答を指向する、インターフェロン (IFN)、炎症性サイトカインおよびエフェクターサイトカインの産生を含む様々な細胞応答をもたらす。TLRは、いくつかの炎症性および免疫障害に関与し、癌において役割を果たす (Rakoff-Nahoum S. & Medzhitov R., 2009. Toll-like receptors and cancer. Nat Revs Cancer 9:57-63)。

【0412】

TLRは、ロイシンリッチリピート (LRR) を含有する細胞外ドメイン、およびToll/IL-1受容体 (TIR) ドメインと呼ばれる保存領域を含有する細胞質尾部によって特徴付けられるI型膜貫通タンパクである。10人のヒトおよび12匹のマウスのTLRが、特徴付けられており、ヒトではTLR1~TLR10、およびマウスではTLR1~TLR9、TLR11、TLR12およびTLR13であり、TLR10のホモログは、偽遺伝子である。TLR2は、細菌リポタンパク質、リポマンナンおよびリポタイコ酸を含む、グラム陽性菌からの様々なPAMPの認識のために極めて重要である。TLR3は、ウイルスに由来する二本鎖RNAに関与する。TLR4は、主に、リポ多糖によって活性化される。TLR5は、細菌フラジェリンを検出し、TLR9は、非メチル化CpG DNAに対する応答に必要とされる。最後に、TLR7およびTLR8は、小型の合成抗ウイルス分子を認識し、一本鎖RNAは、それらの天然リガンドであることが報告されている。TLR11は、尿路病原性大腸菌 (E. coli) およびトキソプラズマ (Toxoplasma gondii) 由来のプロフィリン様タンパク質を認識することが報告されている。TLRの特異性のレパートリーは、互いにヘテロ二量体化するTLRの能力によって拡大されるようである。例えば、TLR2およびTLR6の二量体が、ジアシル化リポタンパク質に対する応答に必要とされる一方、TLR2およびTLR1は、相互作用して、トリアシル化リポタンパク質を認識する。TLRの特異性はまた、LPSに应答してTLR4との複合体を形成するMD-2およびCD14などの様々なアダプターおよびアクセサリー分子によって影響される。

【0413】

TLRシグナル伝達は、少なくとも2つの異なる経路：炎症性サイトカインの産生をもたらすMyD88依存性経路、およびIFN- β の刺激および樹枝状細胞の成熟に関連するMyD88非依存性経路からなる。MyD88依存性経路は、TLR3を除いて、全てのTLRに共通である (Adachi O. et al., 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. Immunity. 9 (1): 143-50)。PAMPまたはDAMPによる活性化により、TLRは、ヘテロ二量体化またはホモ二量体化して、細胞質TIRドメインを介したアダプタータンパク質の動員を誘導する。個々のTLRは、異なるアダプター分子の使用によって異なるシグナル伝達応答を誘導する。TLR4およびTLR2シグナル伝達は、MyD88依存性経路に関与するアダプターTIRAP/Malを必要とする。TLR3は、アダプターTRIF/TICAM-1を介して、MyD88に依存しない方法で、二本鎖RNAに应答してIFN- β の産生を引き起こす。TRAM/TICAM-2は、機能がTLR4経路に限られるMyD88非依存性経路に関与する別のアダプター分子である。

【0414】

TLR3、TLR7、TLR8およびTLR9は、ウイルス核酸を認識し、I型IFNを誘導する。I型IFNの誘導をもたらすシグナル伝達機構は、活性化されるTLRに応じて異なる。それらは、インターフェロン調節因子、IRF、抗ウイルス防御、細胞増殖および免疫調節において重要な役割を果たすことが知られている転写因子のファミリーを含む。3つのIRF (IRF3、IRF5およびIRF7) は、ウイルス媒介性TLRシグナル伝達の直接のトランスデューサとして機能する。TLR3およびTLR4は、IRF3およびIRF7を活性化する一方、TLR7およびTLR8は、IRF5およびIRF7を活性化する (Doyle S. et al., 2002. IRF3 mediates

10

20

30

40

50

a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity*. 17 (3): 251-63)。さらに、TLR9リガンド CpG-A によって刺激される I 型 IFN 産生は、PI (3) K および mTOR によって媒介されることが示されている (Costa-Mattoli M. & Sonenberg N. 2008. RApping production of type I interferon in pDCs through mTOR. *Nature Immunol.* 9: 1097-1099)。

【0415】

TLR-9

TLR9 は、DNA 分子中の非メチル化 CpG 配列を認識する。CpG 部位は、細菌ゲノムまたはウイルス DNA と比較して脊椎動物ゲノムにおいて比較的稀である (約 1%)。TLR9 は、B リンパ球、単球、ナチュラルキラー (NK) 細胞および形質細胞様樹状細胞などの免疫系の多くの細胞によって発現される。TLR9 は、エンドソーム区画内で、細胞内で発現され、CpG モチーフに富む DNA に結合することにより、免疫系にウイルスおよび細菌感染を警告するように機能する。TLR9 シグナルは、細胞の活性化をもたらして、炎症反応を開始させて、I 型インターフェロンおよび IL-12 などのサイトカインの産生をもたらす。

【0416】

TLR アゴニスト

TLR アゴニストは、1 つまたは複数の TLR、例えばヒト TLR-1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 の 1 つまたは複数を作動させ得る。ある実施形態において、本明細書に記載される補助剤は、TLR アゴニストである。ある実施形態において、TLR アゴニストは、ヒト TLR-9 を特異的に作動させる。ある実施形態において、TLR-9 アゴニストは、CpG 部分である。本明細書において使用される際、CpG 部分は、配列：5'-C-ホスフェート-G-3'、すなわち 1 つのみのホスフェートによって隔てられたシトシンおよびグアニンを有する線状ジヌクレオチドである。

【0417】

ある実施形態において、CpG 部分は、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、またはそれを超える CpG ジヌクレオチドを含む。ある実施形態において、CpG 部分は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または 30 の CpG ジヌクレオチドからなる。ある実施形態において、CpG 部分は、1~5、1~10、1~20、1~30、1~40、1~50、5~10、5~20、5~30、10~20、10~30、10~40、または 10~50 の CpG ジヌクレオチドを有する。

【0418】

ある実施形態において、TLR-9 アゴニストは、合成 ODN (オリゴデオキシヌクレオチド) である。CpG ODN は、特定の配列コンテキスト (CpG モチーフ) において非メチル化 CpG ジヌクレオチドを含有する短い合成一本鎖 DNA 分子である。CpG ODN は、ゲノム細菌 DNA に見られる天然ホスホジエステル (PO) 骨格ではなく、部分的にまたは完全にホスホロチオエート化された (PS) 骨格を有する。CpG ODN の 3 つの主なクラス：クラス A、B および C があり、これらは、その免疫刺激活性が異なる。CpG-A ODN は、PO 中心 CpG 含有回文モチーフ (palindromic motif) および PS-修飾 3' ポリ-G スtring によって特徴付けられる。それらは、pDC からの高い IFN- α 産生を誘導するが、TLR9 依存性 NF- κ B シグナル伝達および炎症性サイトカイン (例えば IL-6) 産生の弱い刺激因子である。CpG-B ODN は、1 つまたは複数の CpG ジヌクレオチドを有する完全 PS 骨格を含む。それらは、B 細胞および TLR9 依存性 NF- κ B シグナル伝達を強く活性化するが、IFN- α 分泌を弱く刺激する。CpG-C ODN は、クラス A および B の両方の特徴を兼ね備

10

20

30

40

50

えている。それらは、完全なP S骨格およびC p G含有回文モチーフを含む。CークラスC p G ODNは、p D Cからの強いI F N- α 産生ならびにB細胞刺激を誘導する。

【0419】

間質調節部分

固形腫瘍は、正常組織の構造に類似した異なる構造を有し、異なるが互いに依存する2つの区画：腫瘍細胞が生じ、それらが分散される、実質（腫瘍細胞）および間質を含む。全ての腫瘍は、間質を有し、栄養補給および老廃物の除去のために間質を必要とする。細胞懸濁液として成長する腫瘍（例えば、白血病、腹水腫瘍）の場合、血漿が間質として機能する（Connolly JL et al. Tumor Structure and Tumor Stroma Generation. In: Kufe DW et al., editors. Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. Hamilton: BC Decker; 2003）。間質は、細胞外基質（ECM）および細胞外分子とともに、線維芽細胞／筋線維芽細胞、グリア、上皮、脂肪、血管、平滑筋、および免疫細胞を含む様々な細胞型を含む（Li Hanchen et al. Tumor Microenvironment: The Role of the Tumor Stroma in Cancer. J of Cellular Biochemistry 101: 805-815 (2007)）。

10

【0420】

本明細書に記載される間質調節部分は、間質の成分、例えばECM成分、例えばグリコサミノグリカン、例えばヒアルロナン（ヒアルロン酸またはHAとしても知られている）、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸、ヘパリン硫酸、ヘパリン、エンタクチン、テネシン、アグリカンおよびケラチン硫酸；または細胞外タンパク質、例えばコラーゲン、ラミニン、エラスチン、フィブリノゲン、フィブロネクチン、およびビトロネクチンを分解することが可能な部分（例えば、タンパク質、例えば酵素）を含む。

20

【0421】

間質調節酵素

ある実施形態において、間質調節部分は、酵素である。例えば、間質調節部分は、限定はされないが、ヒアルロニダーゼ、コラゲナーゼ、コンドロイチナーゼ、マトリックスメタロプロテイナーゼ（例えば、マクロファージメタロエラスターゼ）を含み得る。

【0422】

ヒアルロニダーゼ

ヒアルロニダーゼは、動物界全体に見られる中性および酸活性酵素の群である。ヒアルロニダーゼは、基質特異性、および作用機序に関して様々である。ヒアルロニダーゼの3つの一般的クラスがある：（1）主な最終産物として四糖類および六糖類を伴うエンドー β -N-アセチルヘキソサミニダーゼである哺乳動物型ヒアルロニダーゼ（EC 3.2.1.35）。それらは、加水分解およびトランスグリコシダーゼ活性の両方を有し、ヒアルロナンおよびコンドロイチン硫酸を分解することができ；（2）細菌ヒアルロニダーゼ（EC 4.2.99.1）は、ヒアルロナンおよび様々な程度にコンドロイチン硫酸およびデルマトン硫酸を分解する。それらは、主に二糖類最終産物を生じる β 脱離反応によって作用するエンドー β -N-アセチルヘキソサミニダーゼであり；（3）ヒル類、他の寄生生物、および甲殻類からのヒアルロニダーゼ（EC 3.2.1.36）は、 β 1-3結合の加水分解によって四糖類および六糖類最終産物を生成するエンドー β -グルクロニダーゼである。

30

40

【0423】

哺乳動物ヒアルロニダーゼは、2つのグループ：（1）中性活性および（2）酸活性酵素にさらに分類され得る。ヒトゲノム中の6つのヒアルロニダーゼ様遺伝子、HYAL1、HYAL2、HYAL3、HYAL4、HYALP1およびPH20/SPAM1がある。HYALP1は、偽遺伝子であり、HYAL3は、任意の公知の基質に対する酵素活性を有することは示されていない。HYAL4は、コンドロイチナーゼであり、ヒアルロナンに対する活性を欠いている。HYAL1は、典型的な酸活性酵素であり、PH20は、典

50

型的な中性活性酵素である。HYAL1およびHYAL2などの酸活性ヒアルロニダーゼは、中性pHで触媒活性を欠いている。例えば、HYAL1は、pH4.5超で、インビトロで触媒活性を有さない（Frost and Stern, “A Microtiter-Based Assay for Hyaluronidase Activity Not Requiring Specialized Reagents”, Analytical Biochemistry, vol. 251, pp. 263–269 (1997)）。HYAL2は、インビトロで非常に低い比活性を有する酸活性酵素である。

【0424】

ある実施形態において、ヒアルロニダーゼは、哺乳動物ヒアルロニダーゼである。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼは、組み換えヒトヒアルロニダーゼである。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼは、中性活性ヒアルロニダーゼである。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼは、中性活性可溶性ヒアルロニダーゼである。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼは、組み換えPH20中性活性酵素である。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼは、組み換えPH20中性活性可溶性酵素である。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼは、グリコシル化されている。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼは、少なくとも1つのN-結合グリカンを含む。組み換えヒアルロニダーゼは、当業者に公知の従来の方法を用いて産生され得る（例えば、米国特許第7767429号明細書（この全内容が参照により本明細書に援用される））。

【0425】

ある実施形態において、ヒアルロニダーゼは、rHuPH20である（Hylenex（登録商標）とも呼ばれる；Halozymeによって現在製造されている；2005年にFDAによって承認されている（例えば、Scodeller P (2014) Hyaluronidase and other Extracellular Matrix Degrading Enzymes for Cancer Therapy: New Uses and Nano-Formulations. J Carcinog Mutagen 5:178；米国特許第7767429号明細書；米国特許第8202517号明細書；米国特許第7431380号明細書；米国特許第8450470号明細書；米国特許第8772246号明細書；米国特許第8580252号明細書（これらの全内容が参照により本明細書に援用される）を参照）。rHuPH20は、ヒトヒアルロニダーゼPH20の可溶性断片をコードするDNAプラスミドを含む遺伝子操作されたCHO細胞によって産生される。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼは、グリコシル化されている。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼは、少なくとも1つのN-結合グリカンを含む。組み換えヒアルロニダーゼは、当業者に公知の従来の方法を用いて産生され得る（例えば、米国特許第7767429号明細書（この全内容が参照により本明細書に援用される））。ある実施形態において、rHuPH20は、

【化37】

LNFRAPPVIPNVPFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGGVVTIFYVDRL
GYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW
ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRP
NHLWGYLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRNDLWSLWNESTALYPSIYLNTQQS
PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVA
LGASGIVIWGTLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAKMCSQVLCQEQQVCIRK
NWNSSDYLHLNPDNFAIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFYCSCYSTLSCKEKADV
KDTDAVDVCIADGVCIDAFLLKPPMETEEPQIFYNASPSTLS (配列番号39)

のアミノ酸配列と少なくとも95%（例えば、少なくとも96%、97%、98%、99%、100%）同一の配列を有する。

【0426】

本明細書において提供される方法のいずれかにおいて、抗ヒアルロナン剤は、ヒアルロナンを分解する薬剤であり得、またはヒアルロナンの合成を阻害する薬剤であり得る。例えば、抗ヒアルロナン剤は、ヒアルロナン分解酵素であり得る。別の例において、抗ヒアルロナン剤は、ヒアルロナン合成を阻害する薬剤である。例えば、抗ヒアルロナン剤は、H Aシンターゼに対するセンスまたはアンチセンス核酸分子などのヒアルロナン合成を阻害する薬剤であるか、または小分子薬剤である。例えば、抗ヒアルロナン剤は、4-メチルウンベリフェロン(MU)もしくはその誘導体、またはレフルノミドもしくはその誘導体である。このような誘導体としては、例えば、6,7-ジヒドロキシ-4-メチルクマリンまたは5,7-ジヒドロキシ-4-メチルクマリンである、4-メチルウンベリフェロン(MU)の誘導体が挙げられる。

10

【0427】

本明細書において提供される方法のさらなる例において、ヒアルロナン分解酵素は、ヒアルロニダーゼである。ある例において、ヒアルロナン分解酵素は、C末端グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)付着部位またはGPI付着部位の一部を欠いている、PH20ヒアルロニダーゼまたはその切断型である。具体例において、ヒアルロニダーゼは、ヒト、サル、ウシ、ヒツジ、ラット、マウスまたはモルモットPH20から選択されるPH20である。例えば、ヒアルロナン分解酵素は、中性活性であり、かつおよびN-グリコシル化されたヒトPH20ヒアルロニダーゼであり、(a)完全長PH20であるかまたはPH20のC末端切断型であるヒアルロニダーゼポリペプチド(ここで、切断型は、少なくとも、配列番号39のアミノ酸残基36-464、例えば36-481、36-482、36-483を含み、完全長PH20は、配列番号39に記載されるアミノ酸の配列を有する)；または(b)配列番号39に記載されるアミノ酸の配列のポリペプチドまたは切断型と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸の配列を含むヒアルロニダーゼポリペプチド；または(c)アミノ酸置換を含む(a)または(b)のヒアルロニダーゼポリペプチドであって、それにより、配列番号39に記載されるポリペプチドまたはその対応する切断型との少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを超える配列同一性を有するアミノ酸の配列を有するヒアルロニダーゼポリペプチドの中から選択される。例示的な例において、ヒアルロナン分解酵素は、組成が示されたrHuPH20を含むPH20である。

20

30

【0428】

他の例において、抗ヒアルロナン剤は、ポリマーへのコンジュゲーションによって修飾されるヒアルロナン分解酵素である。ポリマーは、PEGおよび抗ヒアルロナン剤PEG化ヒアルロナン分解酵素であり得る。したがって、本明細書において提供される方法のある例において、ヒアルロナン分解酵素は、ポリマーへのコンジュゲーションによって修飾される。例えば、ヒアルロナン分解酵素は、PEGにコンジュゲートされ、したがって、ヒアルロナン分解酵素は、PEG化される。例示的な例において、ヒアルロナン分解酵素は、PEG化PH20酵素(PEGPH20)である。本明細書において提供される方法において、コルチコステロイドは、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロンおよびプレドニゾンの中から選択されるグルココルチコイドであり得る。

40

【0429】

コンドロイチナーゼ

コンドロイチナーゼは、エンドグリコシダーゼ反応を介して、グリコサミノグリカン、特にコンドロイチンおよびコンドロイチン硫酸を分解する、動物界全体に見られる酵素である。ある実施形態において、コンドロイチナーゼは、哺乳動物コンドロイチナーゼである。ある実施形態において、コンドロイチナーゼは、組み換えヒトコンドロイチナーゼである。ある実施形態において、コンドロイチナーゼは、HYAL4である。他の例示的なコ

50

ンドロイチナーゼとしては、コンドロイチナーゼABC（プロテウス・ブルガリス（*Proteus vulgaris*）に由来する；特開平6-153947号公報、T. Yamagata et al. J. Biol. Chem., 243, 1523（1968）、S. Suzuki et al. J. Biol. Chem., 243, 1543（1968））、コンドロイチナーゼAC（フラボバクテリウム・ヘパリナム（*Flavobacterium heparinum*）に由来する；T. Yamagata et al., J. Biol. Chem., 243, 1523（1968））、コンドロイチナーゼACII（アルスロバクター・アウレッセンス（*Arthrobacter aurescens*）に由来する；K. Hiyama, and S. Okada, J. Biol. Chem., 250, 1824（1975）、K. Hiyama and S. Okada, J. Biochem. (Tokyo), 80, 1201（1976））、ヒアルロニダーゼACIII（フラボバクテリウム属（*Flavobacterium* sp.）Hp102に由来する；Hirofumi Miyazono et al., Seikagaku, 61, 1023（1989））、コンドロイチナーゼB（フラボバクテリウム・ヘパリナム（*Flavobacterium heparinum*）に由来する；Y. M. Michelacci and C. P. Dietrich, Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 973（1974）、Y. M. Michelacci and C. P. Dietrich, Biochem. J., 151, 121（1975））、Kenichi Maeyama et al, Seikagaku, 57, 1189（1985））、コンドロイチナーゼC（フラボバクテリウム属（*Flavobacterium* sp.）Hp102に由来する；Hirofumi Miyazono et al, Seikagaku, 61, 1023（1989））などが挙げられる。

【0430】

マトリックスメタロプロテアーゼ

マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）は、細胞外基質（ECM）分解に関与する主なプロテアーゼである亜鉛依存性エンドペプチダーゼである。MMPは、広範囲の細胞外分子および多くの生物活性分子を分解することが可能である。24のMMP遺伝子が、ヒトにおいて同定されており、これは、ドメイン構成および基質選択に基づいて6つのグループに分けることができる：コラゲナーゼ（MMP-1、-8および-13）、ゼラチナーゼ（MMP-2およびMMP-9）、ストロメリシン（MMP-3、-10および-11）、マトリリシン（MMP-7およびMMP-26）、膜タイプ（MT）-MMP（MMP-14、-15、-16、-17、-24および-25）およびその他（MMP-12、-19、-20、-21、-23、-27および-28）。ある実施形態において、間質調節部分は、ヒト組み換えMMP（例えば、MMP-1、-2、-3、-4、-5、-6、-7、-8、-9、10、-11、-12、-13、-14、15、-15、-17、-18、-19、20、-21、-22、-23、または-24）である。

【0431】

コラゲナーゼ

3つの哺乳動物コラゲナーゼ（MMP-1、-8、および-13）は、コラーゲン細胞外基質を切断することが可能である、主な分泌されるエンドペプチダーゼである。線維性コラーゲンに加えて、コラゲナーゼは、成長因子を含むいくつかの他のマトリックスおよび非マトリックスタンパク質を切断し得る。コラゲナーゼは、不活性プロフォーム（pro-form）として合成され、活性化されると、それらの活性は、メタロプロテイナーゼの特異的組織阻害剤、TIMPにより、ならびに非特異的プロテイナーゼ阻害剤により阻害される（Ala-aho Ret al. Biochimie. Collagenases in cancer. 2005 Mar-Apr; 87（3-4）：273-86）。ある実施形態において、間質調節部分は、コラゲナーゼである。ある実施形態において、コラゲナーゼは、ヒト組み換えコラゲナーゼである。ある実施形態において、コラゲナーゼは、MMP-1である。ある実施形態において、コラゲナーゼは、MMP-8である。ある実施形態において、コラゲナーゼは、MMP-13である。

【0432】

マクロファージメタロエラスターゼ

MMP-12としても知られているマクロファージメタロエラスターゼ（MME）は、MMPのストロメリシンサブグループのメンバーであり、可溶性および不溶性エラスチンならびにIV型コラーゲン、フィブロンネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、エンタクチン、ヘパラン、およびコンドロイチン硫酸を含む、広範囲のマトリックスおよび非マトリックス基質の加水分解を触媒する（Erja Kerkela et al. Journal of Investigative Dermatology (2000) 114, 1113-1119; doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00993）。ある実施形態において、間質調節部分は、MMEである。ある実施形態において、MMEは、ヒト組み換えMMEである。ある実施形態において、MMEは、MMP-12である。

10

【0433】

例示的な多重特異性分子

本開示は、（i）腫瘍標的化部分；および（ii）免疫細胞エンゲージャ（例えば、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャの1つ、2つ、3つまたは全てから選択される）；および／または（iii）サイトカイン分子の一方または両方を含む、特に新規な多重特異性分子に関する。理論に制約されるものではないが、本明細書に開示される多重特異性分子は、癌細胞において、免疫細胞（例えば、NK細胞、B細胞、樹枝状細胞またはマクロファージから選択される免疫エフェクター細胞）を標的化（例えば、局在化、架橋および／または活性化）することが予想される。本明細書に記載される多重特異性分子を用いて、免疫細胞の近接および／または活性を増大させることは、癌細胞に対する免疫応答を促進し、それにより、より有効な癌治療を提供することが予想される。したがって、特に上記の部分を含む多重特異性分子（例えば、多重特異性抗体分子）、それをコードする核酸、上記の分子を生成する方法、および上記の分子を用いて癌を治療する方法が本明細書において提供される。

20

【0434】

したがって、一態様において、本開示は、

（i）例えば、癌抗原（例えば、固形腫瘍抗原、間質抗原、または血液抗原）に結合する腫瘍標的化部分と；

30

（ii）例えば、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャもしくはマクロファージ細胞エンゲージャの1つ、2つ、3つもしくは全てから選択される免疫細胞エンゲージャ；または

（iii）サイトカイン分子

の1つまたは2つと

を含む多重特異性分子を特徴とする。

【0435】

一実施形態において、多重特異性分子は、2つの結合特異性または機能を含み、例えば、それは、例えば、

i）腫瘍標的化部分およびサイトカイン分子；または

40

ii）腫瘍標的化部分および免疫細胞エンゲージャ

を含む二重特異性または二機能性分子である。

【0436】

他の実施形態において、多重特異性分子は、3つまたは4つの結合特異性または機能を含み、例えば、それは、三重特異性または四重特異性分子である。例示的な三重特異性および四重特異性分子は、

（i）1つの腫瘍標的化部分、1つの免疫細胞エンゲージャ、および1つのサイトカイン分子；

（ii）1つの腫瘍標的化部分および2つの免疫細胞エンゲージャ（例えば、同じかまたは異なる免疫細胞エンゲージャ）；

50

(i i i) 1つの腫瘍標的化部分および2つのサイトカイン（例えば、同じかまたは異なるサイトカイン）；

(i v) 1つの腫瘍標的化部分、2つの免疫細胞エンゲージャ（例えば、同じかまたは異なる免疫細胞エンゲージャ）、および1つのサイトカイン分子；

(v) 1つの腫瘍標的化部分、1つの免疫細胞エンゲージャ、および2つのサイトカイン分子（例えば、同じかまたは異なるサイトカイン分子）；

(v i) 1つの腫瘍標的化部分および3つの免疫細胞エンゲージャ（例えば、同じかまたは異なる免疫細胞エンゲージャ）；

(v i i) 1つの腫瘍標的化部分および3つのサイトカイン分子（例えば、同じかまたは異なるサイトカイン分子）；

(v i i i) 2つの腫瘍標的化部分（例えば、同じかまたは異なる標的化部分）および1つの免疫細胞エンゲージャ；

(i x) 2つの腫瘍標的化部分（例えば、同じかまたは異なる標的化部分）および1つのサイトカイン分子；および

(i x) 2つの腫瘍標的化部分（例えば、同じかまたは異なる標的化部分）、1つの免疫細胞エンゲージャ、および1つのサイトカイン分子を含む。

【0437】

ある実施形態において、多重特異性分子は、一本鎖抗体分子、例えば単ドメイン抗体、s c F v、ラクダ科、またはサメ抗体、および第2の部分を含む。ある実施形態において、多重特異性分子は、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第2の部分に連結されるs c F vのV HからV Lを含み（例えば、図1 Aおよび1 Bに示されるように）；s c F vは、第1の結合特異性を形成し得る（図1 A～1 Bに結合部分「1」として示される）。ある実施形態において、第2の部分（図1 A～1 BにパートナーAとして示される）は、NーからCーの配向で、s c F vのV H領域の前に（例えば、図1 Aに示されるように）、またはNーからCーの配向で、s c F vのV L領域の後に配置され（例えば、図1 Bに示されるように）；第2の部分は、第2の結合特異性を形成し得る（図1 A～1 Bに結合部分「2」として示される）。他の実施形態において、多重特異性分子は、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第2の部分に連結されるs c F vのV LからV Hを含み（例えば、図2 Aおよび2 Bに示されるように）；s c F vは、第1の結合特異性を形成し得る（図2 A～2 Bに結合部分「1」として示される）。ある実施形態において、第2の部分（図2 A～2 BにパートナーAとして示される）は、NーからCーの配向で、s c F vのV L領域の前に（例えば、図2 Aに示されるように）、またはNーからCーの配向で、s c F vのV H領域の後に配置され（例えば、図2 Bに示されるように）；第2の部分は、第2の結合特異性を形成し得る（図2 A～2 Bに結合部分「2」として示される）。実施形態において、s c F vは、腫瘍標的化部分であり得（例えば、癌抗原、例えば固形腫瘍、間質、または血液抗原に結合する）、または免疫細胞エンゲージャであり得る（例えば、免疫細胞抗原に結合する）。他の実施形態において、第2の部分（例えば、図1 A～1 Bまたは2 A～2 BにパートナーAとして示される）は、腫瘍標的化部分（例えば、s c F vが腫瘍標的化部分でない実施形態において）、免疫細胞エンゲージャ（例えば、s c F vが免疫細胞エンゲージャでない実施形態において）、またはサイトカイン分子（例えば、本明細書に記載されるような）である。実施形態において、パートナーAは、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、s c F v）またはF a b）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。一実施形態において、腫瘍標的化部分は、癌細胞抗原に対するs c F vであり、第2の部分は、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャから選択される。ある実施形態において、第2の部分は、第2の抗体分子（例えば、第2のs c F vまたはF a b）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）である。

【0438】

他の実施形態において、多重特異性分子は、一本鎖ポリペプチド、例えば隣接単一ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなる三重特異性または三機能性である。例えば、多重特異性分子は、腫瘍標的化部分（例えば、癌抗原、例えば本明細書に記載されるような固形腫瘍、間質、または血液抗原に対する第1の結合特異性）、本明細書に記載されるサイトカイン分子、および免疫細胞エンゲージャ（例えば、本明細書に記載される免疫細胞抗原に対する第2の結合特異性）、または上記のいずれかの少なくとも2つの任意の組合せを含み得る。

【0439】

ある実施形態において、多重特異性分子は、一本鎖抗体分子、例えば単ドメイン抗体、s c F v、ラクダ科、またはサメ抗体、および第2の部分を含む。ある実施形態において、多重特異性分子は、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第2の部分および／または第3の部分に連結されるs c F vのV HからV Lを含み（例えば、図1 Cに示されるように）；s c F vは、第1の結合特異性を形成し得る（図1 Cに結合部分「1」として示される）。ある実施形態において、第2または第3の部分（図1 CにパートナーAおよびBとして示される）は、N-からC-の配向で、s c F vのV H領域の前に配置され（例えば、図1 Cに示されるように）、第3の部分（パートナーB）は、N-からC-の配向で、s c F vのV L領域の後に配置され（例えば、図1 Cに示されるように）；第2および第3の部分は、第2および第3の結合特異性を形成し得る（図1 Cにそれぞれ結合部分「2」および結合部分「3」として示される）。他の実施形態において、多重特異性分子は、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第2の部分および／または第3の部分に連結されるs c F vのV LからV Hを含む（例えば、図2 Cに示されるように）。ある実施形態において、第2の部分（図2 CにパートナーAとして示される）は、N-からC-の配向で、s c F vのV L領域の前に配置され（例えば、図2 Cに示されるように）、第3の部分（パートナーB）は、N-からC-の配向で、s c F vのV H領域の後に配置され（例えば、図2 Cに示されるように）；第2および第3の部分は、第2および第3の結合特異性を形成し得る（図2 Cにそれぞれ結合部分「2」および結合部分「3」として示される）。実施形態において、上記の多重特異性分子のいずれかのs c F vは、腫瘍標的化部分（例えば、癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する）または免疫細胞エンゲージャ（例えば、免疫細胞抗原に結合する）であり得る。実施形態において、第2の部分および第3の部分（例えば、図1 Cまたは2 CにパートナーAおよびパートナーBとして示される）は、独立して、腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、またはサイトカイン分子（例えば、本明細書に記載されるような）から選択される。実施形態において、パートナーAおよび／またはパートナーBは、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、s c F vまたはF a b）、受容体分子、またはリガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子））であり得る。一実施形態において、腫瘍標的化部分は、癌細胞抗原に対するs c F vであり、第2の部分および第3の部分は、独立して、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャから選択される。ある実施形態において、第2および第3の部分は、独立して、第2の抗体分子（例えば、第2のs c F vまたはF a b）、受容体分子、またはリガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から選択される。

【0440】

ある実施形態において、多重特異性分子は、C D 1 6（F c □ R I I I）に結合するN K細胞エンゲージャ（すなわちs c F v）の一本鎖ポリペプチド、および腫瘍標的化部分、すなわちC D 3 3を標的化するs c F vからなっていない。他の実施形態において、多重特異性分子は、C D 1 6に結合するs c F vの一本鎖ポリペプチド、I L - 1 5 サイトカイン、およびC D 3 3を標的化するs c F vからなっていない。

【0441】

実施形態において、多重特異性分子は、二重特異性または二機能性分子であり、第1および第2のポリペプチド（i）および（i i）は不連続であり、例えば、2つの別個のポリペプチド鎖である。実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、図3 A～3 B

または図4A～4Bに示される立体配置を有する。実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、第1の結合特異性、例えば、抗原結合ドメイン（例えば、図3A～3Bおよび図4A～4Bに結合部分「1」として示される）を形成する。実施形態において、第2の部分（パートナーAとして示される）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのいずれかに連結される。実施形態において、第2の部分は、第2の結合特異性（例えば、図3A～3Bおよび図4A～4Bに結合部分「2」として示される）を形成する。

【0442】

図3A～3Bに示される一実施形態において、第2の部分（例えば、パートナーA）は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのC末端（例えば、第2のポリペプチドのCL領域のC末端）に連結される（例えば、図3Aに示されるように）。他の実施形態において、第2の部分（例えば、パートナーA）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのC末端（例えば、第1のポリペプチドのCH1領域のC末端）に連結される（例えば、図3Bに示されるように）。

10

【0443】

図4A～4Bに示される別の実施形態において、第2の部分（例えば、パートナーA）は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのN末端（例えば、第2のポリペプチドのVL領域のN末端）に連結される（例えば、図4Aに示されるように）。他の実施形態において、第2の部分（例えば、パートナーA）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのN末端（例えば、第1のポリペプチドのVH領域のN末端）に連結される（例えば、図4Bに示されるように）。

20

【0444】

実施形態において、第1および第2のポリペプチド（例えば、VHおよびVL領域）は、結合部分（例えば、図3A～3Bおよび4A～4B中の結合部分1）を形成することができ；例えば、第1および第2のポリペプチドは、腫瘍標的化部分（例えば、癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する）または免疫細胞エンゲージャ（例えば、免疫細胞抗原に結合する）であり得る。実施形態において、第2の部分（例えば、図3A～3Bおよび4A～4BにパートナーAとして示される）は、第2の結合部分を形成し、例えば、それは、腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、またはサイトカイン分子（例えば、本明細書に記載されるような）から選択される。実施形態において、第2の部分、例えばパートナーAは、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。一実施形態において、多重特異性分子は、Fab分子を含み、第2の部分は、第2の抗体分子（例えば、scFvまたは第2のFab）、受容体分子、または受容体リガンド分子、またはサイトカイン分子から選択される。一実施形態において、腫瘍標的化部分は、癌細胞抗原に対するFabであり、第2の部分は、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャから選択される。ある実施形態において、第2の部分は、第2の抗体分子（例えば、第2のscFvまたはFab）、受容体分子、または受容体リガンド分子、またはサイトカイン分子である。

30

【0445】

実施形態において、多重特異性分子は、二重特異性または二機能性分子であり、第1および第2のポリペプチド（i）および（ii）は不連続であり、例えば、2つの別個のポリペプチド鎖である。実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、図3A～3Bまたは図4A～4Bに示される立体配置を有する。実施形態において、第2の部分（パートナーAとして示される）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのいずれか（例えば、第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのN末端またはC末端のいずれか）に連結される。

40

【0446】

図3A～3Bに示される二重特異性または二機能性分子の一実施形態において、第2の部分（例えば、パートナーA）は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのCL領

50

域（例えば、C L 領域の C 末端）に連結される（例えば、図 3 A に示されるように）。他の実施形態において、第 2 の部分（例えば、パートナー A）は、例えば、リンカーを介して第 1 のポリペプチドの C H 1 領域（例えば、C H 1 領域の C 末端）に連結される（例えば、図 3 B に示されるように）。

【0447】

図 4 A ～ 4 B に示される二重特異性または二機能性分子の別の実施形態において、第 2 の部分（例えば、パートナー A）は、例えば、リンカーを介して第 2 のポリペプチドの V L 領域（例えば、V L 領域の N 末端）に連結される（例えば、図 4 A に示されるように）。他の実施形態において、第 2 の部分（例えば、パートナー A）は、例えば、リンカーを介して第 1 のポリペプチドの V H 領域（例えば、V H 領域の N 末端）に連結される（例えば、図 4 B に示されるように）。

【0448】

二重特異性または二機能性分子の実施形態において、第 1 および第 2 のポリペプチド（例えば、V H および V L 領域）は、結合部分（例えば、図 3 A ～ 3 B および 4 A ～ 4 B 中の結合部分 1）を形成することができ；例えば、第 1 および第 2 のポリペプチドは、腫瘍標的化部分（例えば、癌抗原、例えば腫瘍、間質または血液抗原に結合する）または免疫細胞エンゲージャ（例えば、免疫細胞抗原に結合する）であり得る。実施形態において、第 2 の部分（例えば、図 3 A ～ 3 B および 4 A ～ 4 B にパートナー A として示される）は、第 2 の結合部分を形成し、例えば、それは、腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、またはサイトカイン分子（例えば、本明細書に記載されるような）から選択される。実施形態において、第 2 の部分、例えばパートナー A は、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、s c F v）または F a b）、受容体分子、またはリガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。一実施形態において、多重特異性分子は、F a b 分子を含み、第 2 の部分は、第 2 の抗体分子（例えば、s c F v または第 2 の F a b）、受容体分子、またはリガンド分子（例えば、サイトカイン分子）から選択される。一実施形態において、腫瘍標的化部分は、癌細胞抗原に対する F a b であり、第 2 の部分は、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャから選択される。ある実施形態において、第 2 の部分は、第 2 の抗体分子（例えば、第 2 の s c F v または F a b）、受容体分子、受容体リガンド分子、またはサイトカイン分子である。

【0449】

他の実施形態において、多重特異性分子は、三重特異性または三機能性分子であり、第 1 および第 2 のポリペプチド（i）および（i i）は不連続であり、例えば、2 つの別個のポリペプチド鎖である。実施形態において、第 1 および第 2 のポリペプチドは、図 3 C および 4 C に示される立体配置を有する。実施形態において、第 2 の部分および第 3 の部分（それぞれパートナー A および B として示される）は、例えば、リンカーを介して第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドのそれぞれの C 末端、N 末端、または両方に連結される。一実施形態において、第 2 の部分および第 3 の部分は、第 2 および第 1 のポリペプチド（または第 1 および第 2 のポリペプチド）のそれぞれの C 末端に連結される。別の実施形態において、第 2 の部分および第 3 の部分は、第 2 および第 1 のポリペプチド（または第 1 および第 2 のポリペプチド）のそれぞれの N 末端に連結される。一実施形態において、第 2 の部分および第 3 の部分は、第 2 および第 1 のポリペプチド（または第 1 および第 2 のポリペプチド）のそれぞれの N および C 末端に連結される。図 3 C および 4 C に例示されるものを含む任意の立体配置が本開示によって意図される。

【0450】

図 3 C ～ 4 C に示される三重特異性または三機能性分子の一実施形態において、第 2 の部分（例えば、第 2 の結合特異性「2」に対応するパートナー A）は、例えば、リンカーを介して第 2 のポリペプチドの C 末端（例えば、第 2 のポリペプチドの C L 領域の C 末端）に連結され（例えば、図 3 C に示されるように）、第 3 の部分（例えば、第 3 の結合特異性「3」に対応するパートナー B）は、例えば、リンカーを介して第 1 のポリペプチドの

10

20

30

40

50

C末端（例えば、第1のポリペプチドのCH1領域のC末端）に連結される（例えば、図3Cに示されるように）。

【0451】

図3C～4Cに示される三重特異性または三機能性分子の別の実施形態において、第2の部分（例えば、第2の結合特異性「2」に対応するパートナーA）は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのN末端（例えば、第2のポリペプチドのVL領域のN末端）に連結され（例えば、図4Cに示されるように）、第3の部分（例えば、第3の結合特異性「3」に対応するパートナーB）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのN末端（例えば、第1のポリペプチドのVH領域のN末端）に連結される（例えば、図4Cに示されるように）。

10

【0452】

三重特異性または三機能性分子の別の実施形態において、第2の部分（例えば、第2の結合特異性「2」に対応するパートナーA）は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのN末端（例えば、第2のポリペプチドのVL領域のN末端）に連結され、第3の部分（例えば、第3の結合特異性「3」に対応するパートナーB）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのC末端（例えば、第1のポリペプチドのCH1領域のC末端）に連結される。

【0453】

三重特異性または三機能性分子の別の実施形態において、第2の部分（例えば、第2の結合特異性「2」に対応するパートナーA）は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのC末端（例えば、第2のポリペプチドのCL領域のN末端）に連結され、第3の部分（例えば、第3の結合特異性「3」に対応するパートナーB）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのN末端（例えば、第1のポリペプチドのVH領域のN末端）に連結される。

20

【0454】

三重特異性または三機能性分子の実施形態において、第1および第2のポリペプチド（例えば、VHおよびVL領域）は、第1の結合特異性（例えば、図3Cおよび4C中の結合部分「1」）を形成することができ；例えば、第1および第2のポリペプチドは、腫瘍標的化部分（例えば、癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する）または免疫細胞エンゲージャ（例えば、免疫細胞抗原に結合する）であり得る。実施形態において、第2の部分および第3の部分（例えば、図3Cおよび4CにパートナーAおよびBとして示される）は、第2および第3の結合特異性を形成し、例えば、それは、独立して、腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、またはサイトカイン分子（例えば、本明細書に記載されるような）から選択される。実施形態において、第2および第3の結合特異性、例えば、パートナーAおよびBは、独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。一実施形態において、多重特異性分子は、Fab分子を含み、第2の部分および第3の部分は、独立して、第2の抗体分子（例えば、scFvまたは第2のFab）、受容体分子、またはリガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から選択される。ある実施形態において、第1の結合特異性、第2の結合特異性および第3の結合特異性は、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択され得る。一実施形態において、腫瘍標的化部分は、癌細胞抗原に対するFabであり、第2および第3の部分は、独立して、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャから選択される。一実施形態において、腫瘍標的化部分は、癌細胞抗原に対するFabであり；第2の部分は、サイトカイン分子であり；第3の部分は、免疫細胞エンゲージャである。

30

40

【0455】

一実施形態において、多重特異性分子は、少なくとも2つまたは少なくとも3つまたは少

50

なくとも4つの非隣接ポリペプチドを含み、

(i) 第1のポリペプチドは、N-からC-の配向で、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第1のFc領域）を含み；および
(ii) 第2のポリペプチドは、N-からC-の配向で、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第2のFc領域）を含む。

【0456】

実施形態において、多重特異性分子は、二重特異性または二機能性分子であり、第1および第2のポリペプチド(i)および(ii)は不連続であり、例えば、2つの別個のポリペプチド鎖である。ある実施形態において、第1および第2のポリペプチド(i)および(ii)は、例えば、ヒトIgG1のFc領域の347、349、350、351、366、368、370、392、394、395、397、398、399、405、407、または409の1つまたは複数から選択される位置に対になったアミノ酸置換を含む。例えば、第1の免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、第1のFc領域）は、T366S、L368A、またはY407V（例えば、空洞またはホールに対応する）から選択されるアミノ酸置換を含むことができ、第2の免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、第2のFc領域）は、T366W（例えば、突起またはノブに対応する）を含む。ある実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、ヘテロ二量体の第1および第2のFc領域の第1および第2のメンバーである。

【0457】

実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、二重特異性分子を形成する。ある実施形態において、第1のポリペプチドは、第1の結合特異性（例えば、図5A中のパートナーAまたは結合特異性1）を含み、第2のポリペプチドは、第2の結合特異性（例えば、図5A中のパートナーBまたは結合特異性2）を含む。実施形態において、第1および第2の結合特異性（それぞれパートナーAおよびパートナーB）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から選択される。実施形態において、第1および第2の結合特異性は、第1または第2のポリペプチドのいずれかまたはポリペプチドのそれぞれ（例えば、ヘテロ二量体Fc分子の一方または両方のメンバー）に連結される。一実施形態において、第1の結合特異性（例えば、パートナーA）は、第1のポリペプチドのN末端（例えば、第1のFc分子の-CH2-CH3-領域）に連結され、第2の結合特異性（例えば、パートナーB）は、第2のポリペプチドのN末端（例えば、第2のFc分子の-CH2-CH3-領域）に連結される。あるいは、第1の結合特異性（例えば、パートナーA）は、第1のポリペプチドのC末端（例えば、第1のFc分子の-CH2-CH3-領域）に連結され、第2の結合特異性（例えば、パートナーB）は、第2のポリペプチドのC末端（例えば、第2のFc分子の-CH2-CH3-領域）に連結される。あるいは、第1の結合特異性（例えば、パートナーA）は、第1のポリペプチドのN末端（例えば、第1のFc分子の-CH2-CH3-領域）に連結され、第2の結合特異性（例えば、パートナーB）は、第2のポリペプチドのC末端（例えば、第2のFc分子の-CH2-CH3-領域）に連結される。他の実施形態において、第2の結合特異性（例えば、パートナーB）は、第1のポリペプチドのN末端（例えば、第1のFc分子の-CH2-CH3-領域）に連結され、第1の結合特異性（例えば、パートナーA）は、第2のポリペプチドのC末端（例えば、第2のFc分子の-CH2-CH3-領域）に連結される。一実施形態において、第1の-CH2-CH3領域は、突起またはノブを含み、第2の-CH2-CH3領域は、例えば、図5Aに示されるように）空洞またはホールを含む。

【0458】

ある実施形態において、二重特異性分子の第1および第2の結合特異性（結合部分1および結合部分2）は、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、T細胞エンゲージャ、NK細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択され得る。ある実施形態において、第1の結合

10

20

30

40

50

特異性は、腫瘍標的化部分であり、第2の結合特異性は、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージ、T細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。

【0459】

図5Aに示されるある実施形態において、二重特異性分子は、パートナーAおよびBを有することができ、これらは、それぞれ第1および第2の結合特異性（結合部分1および2）として示される（図5A）。第1および第2の結合特異性は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、第1の結合特異性は、腫瘍標的化部分であり、第2の結合特異性は、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージ、T細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。

10

【0460】

実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、三重特異性または四重特異性分子を形成する（例えば、それぞれ図5B～5Cに示されるように）。

【0461】

三重特異性分子のある実施形態において、第1のポリペプチドは、第1の結合特異性（例えば、図5B中のパートナーAまたは結合部分1）を含み、第2のポリペプチドは、第2の結合特異性（例えば、図5B中のパートナーBまたは結合特異性2）を含み、第1または第2のポリペプチドのいずれかは、第3の結合特異性（例えば、図5B中のパートナーCまたは結合部分3）をさらに含む。実施形態において、第1および第2の結合特異性は、第1または第2のポリペプチドのいずれかまたはポリペプチドのそれぞれ（例えば、ヘテロ二量体Fc分子の一方または両方のメンバー）に連結される。一実施形態において、第1および第2の結合特異性は、例えば、リンカーを介して第1および第2のポリペプチドのそれぞれのN末端に連結され、第3の結合特異性は、例えば、リンカーを介して第1または第2のポリペプチドのいずれかのC末端に連結される。一実施形態において、第3の結合特異性は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのC末端（例えば、図5Bに示される第1の-CH₂-CH₃領域のC末端）に連結される。一実施形態において、第3の結合特異性は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのC末端（例えば、第2の-CH₂-CH₃領域のC末端）に連結される。一実施形態において、第1の-CH₂-CH₃領域は、突起またはノブを含み、第2の-CH₂-CH₃領域は、例えば、図5Bに示されるように）ホールまたは空洞を含む。

20

30

【0462】

実施形態において、第1、第2および第3の結合特異性（それぞれパートナーA、パートナーB、およびパートナーC）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から選択される。一実施形態において、第1の結合特異性（例えば、パートナーA）は、第1のポリペプチドのN末端（例えば、第1のFc分子の-CH₂-CH₃-領域）に連結され；第2の結合特異性（例えば、パートナーB）は、第2のポリペプチドのN末端（例えば、第2のFc分子の-CH₂-CH₃-領域）に連結され；第3の結合特異性（例えば、パートナーC）は、第1のポリペプチドのC末端（例えば、第2のFc分子の-CH₂-CH₃-領域）に連結される。他の実施形態において、第1の結合特異性（例えば、パートナーA）は、第1のポリペプチドのN末端（例えば、第1のFc分子の-CH₂-CH₃-領域）に連結され；第2の結合特異性（例えば、パートナーB）は、第2のポリペプチドのN末端（例えば、第1のFc分子の-CH₂-CH₃-領域）に連結され；第3の結合特異性（例えば、パートナーC）は、第2のポリペプチドのC末端（例えば、第2のFc分子の-CH₂-CH₃-領域）に連結される。第1、第2および第3の結合特異性は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例え

40

50

ば、s c F v) または F a b)、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、第1、第2および第3の結合特異性（それぞれ結合部分1～3に対応するパートナーA～C）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージ、T細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。実施形態において、第1の結合特異性は、腫瘍標的化部分であり、第2および第3の結合特異性は、それぞれ独立して、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージ、T細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。

【0463】

四重特異性分子のある実施形態において、第1のポリペプチドは、第1の結合特異性（例えば、図5C中のパートナーAまたは結合部分1）および第3の結合特異性（例えば、図5C中のパートナーCまたは結合部分3）を含み、第2のポリペプチドは、第2の結合特異性（例えば、図5C中のパートナーBまたは結合部分2）および第4の結合特異性（例えば、図5C中のパートナーDまたは結合部分4）を含む。一実施形態において、第1および第2の結合特異性は、例えば、リンカーを介して第1および第2のポリペプチドのそれぞれのN末端に連結され、第3および第4の結合特異性は、例えば、リンカーを介して第1および第2のポリペプチドのそれぞれのC末端に連結される。第1または第2のポリペプチドのN-またはC末端への結合特異性のいずれの置き換えも本開示によって包含される。一実施形態において、第1の結合特異性（例えば、パートナーA）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのN末端（例えば、図5Cに示される第1の-CH₂-CH₃領域のN末端）に連結され；第2の結合特異性（例えば、パートナーB）は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのN末端（例えば、図5Cに示される第2の-CH₂-CH₃領域のN末端）に連結され；第3の結合特異性（例えば、パートナーC）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのC末端（例えば、図5Cに示される第1の-CH₂-CH₃領域のC末端）に連結され；第4の結合特異性（例えば、パートナーD）は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのC末端（例えば、第2の-CH₂-CH₃領域のC末端）に連結される。一実施形態において、第1の-CH₂-CH₃領域は、突起またはノブを含み、第2の-CH₂-CH₃領域は、例えば、図5Cに示されるように）空洞またはホールを含む。実施形態において、第1、第2、第3および第4の結合特異性（それぞれパートナーA、パートナーB、パートナーCおよびパートナーD）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、s c F v) または F a b)、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から選択される。第1、第2、第3および第4の結合特異性は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、s c F v) または F a b)、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、第1、第2、第3および第4の結合特異性（それぞれ結合部分1～4に対応するパートナーA～D）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージ、T細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。実施形態において、第1の結合特異性は、腫瘍標的化部分であり、第2、第3および第4の結合特異性は、それぞれ独立して、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージ、T細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。

【0464】

一実施形態において、多重特異性分子は、2つの非隣接第1および第2のポリペプチドを含む二重特異性分子である。実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、s c F v) または F a b)、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカ

10

20

30

40

50

イン分子) から独立して選択される第1および第2の結合部位をそれぞれ含む。ある実施形態において、第1および第2の結合特異性(それぞれ結合部位1~2)は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。ある実施形態において、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置: 任意選択的にリンカーを介して、第2の結合特異性(例えば、結合部位#2)に連結される、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えば腫瘍または間質抗原に結合する、例えばFab分子の第1のVH-CH1(例えば、結合部位#1)を有し; 第2のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置: 第1の抗原ドメインの第2の部分、例えば癌抗原(例えば、第1のVH-CH1、例えば、結合部位#1によって結合される同じ癌抗原)に結合する、例えばFabの第1のVL-CLを有する(例えば、この立体配置の例が図6に示される)。一実施形態において、任意選択的にリンカーを介して、第2の結合特異性(例えば、結合部位#2)に連結される第1の結合特異性(結合部位#1)に対応するFabを含む二重特異性分子である。ある実施形態において、第1の結合特異性(例えば、図6中の結合部位#1)は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍または間質抗原に結合し; 第2の結合特異性(例えば、図6中の結合部位#2)は、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択され、例えば受容体、受容体リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子(例えば、scFv)から選択される。抗体分子がscFvである実施形態において、scFvは、VH-VLまたはVL-VH立体配置で第1のポリペプチドのC末端に連結され得る。

【0465】

別の実施形態において、多重特異性分子は、2つまたは少なくとも3つの非隣接第1および第2のポリペプチドを含む二重特異性分子であり、

(i) 第1のポリペプチドは、N-からC-の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域(例えば、CH3領域に連結されたCH2)(例えば、第1のFc領域)に連結される、第1の結合特異性、例えば第1の抗体分子を含み;

(ii) 第2のポリペプチドは、N-からC-の配向で、第2の免疫グロブリン定常領域(例えば、CH3領域に連結されたCH2)(例えば、第2のFc領域)を含み; および (任意選択的に) (iii) 第3のポリペプチドは、第1の抗体分子または第2の抗体分子の一部を含む。

【0466】

実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子(例えば、一本鎖抗体分子(例えば、scFv)またはFab)、受容体分子、リガンド分子(例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子)から独立して選択される第1および第2の結合特異性(例えば、部位)をそれぞれ含む。ある実施形態において、第1および第2の結合特異性(それぞれ結合部位1~2)は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。

【0467】

ある実施形態において、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置:

(a) 任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域(例えば、CH3領域に連結されたCH2)(例えば、第1のFc領域)に連結される、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えば癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する、例えばFab分子の第1のVH-CH1(例えば、結合部位#1);

(b) 任意選択的にリンカーを介して、第2の免疫グロブリン定常領域(例えば、CH3領域に連結されたCH2)(例えば、第2のFc領域)に連結される、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択される第2の結合特異性(例えば、第2の結合部位)

を有し；および

(c) 第3のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：第1の抗原ドメインの第2の部分、例えば癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原（例えば、第1のVH-CH1、例えば、結合部位#1によって結合される同じ癌抗原）に結合する、例えばFabの第1のVL-CLを有する（例えば、この立体配置の例が図7に示される）。

【0468】

一実施形態において、任意選択的にリンカーを介して、第1のFc領域に連結される第1の結合特異性（結合部位#1）、および任意選択的にリンカーを介して、第2のFc領域に連結される第2の結合特異性（例えば、結合部位#2）に対応するFabを含む二重特異性分子である。ある実施形態において、第1の結合特異性（例えば、図7中の結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；第2の結合特異性（例えば、図7中の結合部位#2）は、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択され、例えば受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、scFv）から選択される。抗体分子がscFvである実施形態において、scFvは、VH-VLまたはVL-VH立体配置で第1のポリペプチドのC末端に連結され得る。

【0469】

実施形態において、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、第1のCH2-CH3領域）は、例えば、本明細書に記載されるような突起またはノブを含む。

【0470】

実施形態において、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、第2のCH2-CH3領域）は、空洞またはホールを含む。実施形態において、第1および第2の免疫グロブリン定常領域は、二重特異性分子のヘテロ二量体化を促進する。

【0471】

一実施形態において、多重特異性分子は、2つの非隣接第1および第2のポリペプチドを含む三重特異性分子である。実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から独立して選択される第1、第2および第3の結合特異性をそれぞれ含む。ある実施形態において、第1、第2および第3の結合特異性（それぞれ結合部位1〜3）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。

【0472】

ある実施形態において、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：

(i) 任意選択的にリンカーを介して、第2の結合特異性（例えば、結合部位#3、例えば、サイトカイン、リガンドまたは第2の抗体分子、例えばscFv）に連結される、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えば腫瘍または間質抗原に結合する、例えばFab分子の第1のVH-CH1（例えば、結合部位#1）を有し；

(ii) 第2のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：任意選択的にリンカーを介して、第3の結合特異性（例えば、結合部位#2、例えば、サイトカイン、リガンドまたは第2の抗体分子、例えばscFv）に連結される、第1の抗原ドメインの第2の部分、例えば腫瘍または間質抗原（例えば、第1のVH-CH1、例えば、結合部位#1によって結合される同じ腫瘍または間質抗原）に結合する、例えばFabの第1のVL-CLを有する（例えば、この立体配置の例が図8A〜8Cに示される）。

【0473】

一実施形態において、任意選択的にリンカーを介して、第2および第3の結合特異性（例えば、結合部位#2および#3）に連結される第1の結合特異性（結合部位#1）に対応するFabを含む二重特異性分子である。ある実施形態において、第1の結合特異性（例えば、図8A〜8C中の結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例え

10

20

30

40

50

ば腫瘍、間質または血液抗原に結合し；第2および第3の結合特異性（例えば、図8A～8C中の結合部位#2および#3）は、独立して、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択され、例えば受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択される。一実施形態において、第1の結合特異性（例えば、図8A中の結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍、間質または血液抗原に結合し；第2の結合特異性（例えば、図8A中の結合部位#3）は、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択され、例えば受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択され；第3の結合特異性（例えば、図8A中の結合部位#2）は、免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）である。他の実施形態において、第1の結合特異性（例えば、図8B中の結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍、間質または血液抗原に結合し；第2の結合特異性（例えば、図8B中の結合部位#3）は、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択され、例えば受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択され；第3の結合特異性（例えば、図8B中の結合部位#2）は、リガンドまたは免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）である。他の実施形態において、第1の結合特異性（例えば、図8C中の結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍、間質または血液抗原に結合し；第2の結合特異性（例えば、図8C中の結合部位#3）は、例えば、受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択される免疫細胞エンゲージャであり；第3の結合特異性（例えば、図8C中の結合部位#2）は、リガンドまたは免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）である。抗体分子がs c F vである実施形態において、s c F vは、V H - V LまたはV L - V H立体配置で第1のポリペプチドのC末端に連結され得る。

【0474】

別の実施形態において、多重特異性分子は、2つのまたは少なくとも3つの非隣接第1および第2のポリペプチドを含む三重特異性分子であり、

（i）第1のポリペプチドは、N-からC-の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、C H 3領域に連結されたC H 2）（例えば、第1のF c領域）に連結される、第1の結合特異性、例えば第1の抗体分子を含み；

（i i）第2のポリペプチドは、N-からC-の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、C H 3領域に連結されたC H 2）（例えば、第2のF c領域）に連結される第2の結合特異性を含み；および

（任意選択的に）（i i i）第3のポリペプチドは、第1の抗体分子または第2の抗体分子の一部を含み、

第1または第2のポリペプチドのいずれかは、第3の結合特異性をさらに含む。

【0475】

実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、s c F v）またはF a b）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から独立して選択される第1、第2、および第3の結合特異性（例えば、部位）をそれぞれ含む。ある実施形態において、第1、第2および第3の結合特異性（それぞれ結合部位1～3）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、N K細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。

【0476】

ある実施形態において、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：

（a）任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、C H 3領域に連結されたC H 2）（例えば、第1のF c領域）に連結される、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えば腫瘍または間質抗原に結合する、例えばF a b分子の第1のV H - C H 1（例えば、結合部位#1）；

(b) 任意選択的にリンカーを介して、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第2のFc領域）に連結される、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択される第2の結合特異性（例えば、第2の結合部位）

を有し；および

(c) 第3のポリペプチドは、N-からC-に以下の立体配置：第1の抗原ドメインの第2の部分、例えば腫瘍または間質抗原（例えば、第1のVH-CH1、例えば、結合部位#1によって結合される同じ腫瘍または間質抗原）に結合する、例えばFabの第1のVL-C1を有し、

第1または第2のポリペプチドのいずれかは、任意選択的にリンカーを介して、第1または第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第1または第2のFc領域）に連結される第3の結合特異性をさらに含む。一実施形態において、第3の結合特異性は、任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第1のFc領域）に連結される。別の実施形態において、第3の結合特異性は、任意選択的にリンカーを介して、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第2のFc領域）に連結される。これらの立体配置の例が図9A～9Bに示される。

【0477】

一実施形態において、三重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、第1のFc領域に連結される第1の結合特異性（結合部位#1）；および任意選択的にリンカーを介して、第3の結合特異性（例えば、結合部位#3）をさらに含む第2のFc領域に連結される第2の結合特異性（例えば、結合部位#2）に対応するFabを含む（例えば、図9Aに示されるように）。他の実施形態において、三重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、第3の結合特異性（例えば、結合部位#3）をさらに含む第1のFc領域に連結される第1の結合特異性（結合部位#1）；および任意選択的にリンカーを介して、第2のFc領域に連結される第2の結合特異性（例えば、結合部位#2）に対応するFabを含む（例えば、図9Bに示されるように）。

【0478】

ある実施形態において、(a) 第1の結合特異性（例えば、図9A～9B中の結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；(b) 第2の結合特異性（例えば、図9A～9B中の結合部位#2）は、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択され、例えば受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、scFv）から選択され；(c) 第3の結合特異性（例えば、図9A～9B中の結合部位#3）は、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択され、例えば受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、scFv）から選択される。抗体分子がscFvである実施形態において、scFvは、VH-VLまたはVL-VH立体配置で第1のポリペプチドのC末端に連結され得る。

【0479】

実施形態において、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、第1のCH2-CH3領域）は、例えば、本明細書に記載されるような突起またはノブを含む。

【0480】

実施形態において、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、第2のCH2-CH3領域）は、空洞またはホールを含む。実施形態において、第1および第2の免疫グロブリン定常領域は、二重特異性分子のヘテロ二量体化を促進する。

【0481】

別の実施形態において、多重特異性分子は、2つまたは少なくとも3つの非隣接第1および第2のポリペプチドを含む四重特異性分子であり、

(i) 第1のポリペプチドは、N-からC-の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第

10

20

30

40

50

1 の F c 領域) に連結される、第 1 の結合特異性、例えば第 1 の抗体分子を含み；

(i i) 第 2 のポリペプチドは、N-からC-の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第 2 の免疫グロブリン定常領域 (例えば、C H 3 領域に連結された C H 2) (例えば、第 2 の F c 領域) に連結される第 2 の結合特異性を含み；および

(任意選択的に) (i i i) 第 3 のポリペプチドは、第 1 の抗体分子または第 2 の抗体分子の一部を含み、

第 1 または第 2 のポリペプチドは、第 3 および第 4 の結合特異性をさらに含む。

【 0 4 8 2 】

実施形態において、第 1 および第 2 のポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子 (例えば、一本鎖抗体分子 (例えば、s c F v) または F a b)、受容体分子、リガンド分子 (例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子) から独立して選択される第 1、第 2、第 3 および第 4 の結合特異性 (例えば、部位) をそれぞれ含む。ある実施形態において、第 1、第 2、第 3 および第 4 の結合特異性 (それぞれ結合部位 1 ~ 4) は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、NK 細胞エンゲージャ、T 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。

【 0 4 8 3 】

ある実施形態において、第 1 のポリペプチドは、N-からC-に以下の立体配置：

(a) 任意選択的にリンカーを介して、第 1 の免疫グロブリン定常領域 (例えば、C H 3 領域に連結された C H 2) (例えば、第 1 の F c 領域) に連結される、第 1 の抗原ドメインの第 1 の部分、例えば腫瘍または間質抗原に結合する、例えば F a b 分子の第 1 の V H - C H 1 (例えば、結合部位 # 1) ；

(b) 任意選択的にリンカーを介して、第 2 の免疫グロブリン定常領域 (例えば、C H 3 領域に連結された C H 2) (例えば、第 2 の F c 領域) に連結される、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択される第 2 の結合特異性 (例えば、第 2 の結合部位)

を有し；および

(c) 第 3 のポリペプチドは、N-からC-に以下の立体配置：第 1 の抗原ドメインの第 2 の部分、例えば腫瘍または間質抗原 (例えば、第 1 の V H - C H 1、例えば、結合部位 # 1 によって結合される同じ腫瘍または間質抗原) に結合する、例えば F a b の第 1 の V L - C L を有し、

第 1 および第 2 のポリペプチドは、それぞれ任意選択的にリンカーを介して、第 1 および第 2 の免疫グロブリン定常領域 (例えば、C H 3 領域に連結された C H 2) (例えば、第 1 および第 2 の F c 領域) にそれぞれ連結される第 3 および第 4 の結合特異性をさらに含む。一実施形態において、第 3 の結合特異性は、任意選択的にリンカーを介して、第 2 の免疫グロブリン定常領域 (例えば、C H 3 領域に連結された C H 2) (例えば、第 2 の F c 領域) に連結され；第 4 の結合特異性は、任意選択的にリンカーを介して、第 1 の免疫グロブリン定常領域 (例えば、C H 3 領域に連結された C H 2) (例えば、第 1 の F c 領域) に連結される。これらの立体配置の例が図 1 0 A ~ 1 0 C に示される。

【 0 4 8 4 】

一実施形態において、四重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、第 4 の結合特異性 (例えば、結合部位 # 4) をさらに含む第 1 の F c 領域に連結される第 1 の結合特異性 (結合部位 # 1) ；および任意選択的にリンカーを介して、第 3 の結合特異性 (例えば、結合部位 # 3) をさらに含む第 2 の F c 領域に連結される第 2 の結合特異性 (例えば、結合部位 # 2) に対応する F a b を含む (例えば、図 1 0 A に示されるように)。他の実施形態において、四重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、第 3 の結合特異性 (例えば、結合部位 # 3) をさらに含む第 1 の F c 領域に連結される第 1 の結合特異性 (結合部位 # 1) ；および任意選択的にリンカーを介して、第 4 の結合特異性 (例えば、結合部位 # 4) をさらに含む第 2 の F c 領域に連結される第 2 の結合特異性 (例えば、結合部位 # 2) に対応する F a b を含む。

【0485】

ある実施形態において、(a) 第1の結合特異性（例えば、図10A～10C中の結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍、間質または血液抗原に結合し；第2、第3および第4の結合特異性（例えば、図10A中の結合部位#2～4）は、それぞれ独立して、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択され、例えば受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択される。抗体分子がs c F Vである実施形態において、s c F vは、V H－V LまたはV L－V H立体配置で第1のポリペプチドのC末端に連結され得る。

【0486】

一実施形態において、(a) 第1の結合特異性（例えば、図10B中の結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍、間質または血液抗原に結合し；(b) 第2の結合特異性（例えば、図10B中の結合部位#2）は、受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択される免疫細胞エンゲージャ（例えば、NK細胞エンゲージャ）であり；(c) 第3の結合特異性（例えば、図10B中の結合部位#3）は、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャであり；(d) 第4の結合特異性（例えば、図10B中の結合部位#4）は、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択される免疫細胞エンゲージャ（例えば、マクロファージまたは樹枝状細胞エンゲージャ）である。抗体分子がs c F Vである実施形態において、s c F vは、V H－V LまたはV L－V H立体配置で第1のポリペプチドのC末端に連結され得る。

【0487】

一実施形態において、(a) 第1の結合特異性（例えば、図10C中の結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；(b) 第2の結合特異性（例えば、図10C中の結合部位#2）は、受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択される免疫細胞エンゲージャ（例えば、NK細胞エンゲージャ）であり；(c) 第3の結合特異性（例えば、図10C中の結合部位#3）は、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択される免疫細胞エンゲージャ（例えば、マクロファージまたは樹枝状細胞エンゲージャ）であり；(d) 第4の結合特異性（例えば、図10C中の結合部位#4）は、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択される免疫細胞エンゲージャ（例えば、マクロファージまたは樹枝状細胞エンゲージャ）である。抗体分子がs c F Vである実施形態において、s c F vは、V H－V LまたはV L－V H立体配置で第1のポリペプチドのC末端に連結され得る。

【0488】

実施形態において、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、第1のC H 2－C H 3領域）は、例えば、本明細書に記載されるような突起またはノブを含む。

【0489】

実施形態において、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、第2のC H 2－C H 3領域）は、空洞またはホールを含む。実施形態において、第1および第2の免疫グロブリン定常領域は、二重特異性分子のヘテロ二量体化を促進する。

【0490】

腫瘍標的化部分

一実施形態において、腫瘍標的化部分は、メソテリンに結合する抗体分子（例えば、F a bまたはs c F v）を含む。ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、

【化38】

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTITVT
VSS (配列番号1)

10

20

30

40

50

の重鎖可変ドメイン配列からの1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば配列番号1のCDR配列からの少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRを含む。

【0491】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、GYSFTGYTMN（配列番号2）；LITPYNGASSYNQKFRG（配列番号3）；およびGGYDGRGFDY（配列番号4）から選択される1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRを含む。

10

【0492】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、3つのCDR（ここで、CDR1は、GYSFTGYTMN（配列番号2）を含み；CDR2は、LITPYNGASSYNQKFRG（配列番号3）を含み；CDR3は、GGYDGRGFDY（配列番号4）を含む）、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRからなる。

【0493】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、3つのCDR（ここで、CDR1は、GYSFTGYTMN（配列番号2）からなり；CDR2は、LITPYNGASSYNQKFRG（配列番号3）からなり；CDR3は、GGYDGRGFDY（配列番号4）からなる）、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRからなる。

20

【0494】

実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、

【化39】

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGGQTTVT
VSS（配列番号1）

30

の重鎖可変ドメイン配列またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号1のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、Fabであり、アミノ酸配列：

【化40】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHT（配列番号5）

40

またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号5のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を有する重鎖定常領域（CH1）をさらに含む。ある実施形態において、抗体分子は、シグナルペプチド、例えば、アミノ酸配列：MEFGLSWVFLVALFRGVQC（配列番号6）を含むシグナルペプチドをさらに含む。

【0495】

あるいは、または本明細書に開示されるメソテリンに対する重鎖と組み合わせて、メソテ

50

リンに対する抗体分子は、

【化 4 1】

DIELTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIK (配列番号7)

の軽鎖可変ドメイン配列からの1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば配列番号7のCDR配列からの少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRを含む。

【0496】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、SASSSVSYMH（配列番号8）；DTSKLAS（配列番号9）；およびQQWSGYPLT（配列番号10）からの1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRを含む。

【0497】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、3つのCDR（ここで、CDR1は、SASSSVSYMH（配列番号8）を含み；CDR2は、DTSKLAS（配列番号9）を含み；CDR3は、QQWSGYPLT（配列番号10）を含む）、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRからなる。

【0498】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、3つのCDR（ここで、CDR1は、SASSSVSYMH（配列番号8）からなり；CDR2は、DTSKLAS（配列番号9）からなり；CDR3は、QQWSGYPLT（配列番号10）からなる）、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRからなる。

【0499】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、

【化 4 2】

DIELTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIK (配列番号7)

の軽鎖可変ドメイン配列またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号7のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0500】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、Fabであり、アミノ酸配列：

【化 4 3】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号11)

またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号11のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、

10

20

30

40

50

10 または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域（CL1）をさらに含む。実施形態において、抗体分子は、シグナルペプチド、例えば、アミノ酸配列：MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA（配列番号12）を含むシグナルペプチドをさらに含む。

【0501】

他の実施形態において、多重特異性分子、例えば腫瘍標的化部分は、間質抗原に結合する。実施形態において、間質抗原は、線維芽細胞活性化プロテアーゼ（FAP）、TGF-β、ヒアルロン酸、コラーゲン、例えばコラーゲンIV、テネイシンC、またはテネイシンWの1つまたは複数から選択される。

【0502】

一実施形態において、腫瘍標的化部分は、FAP、例えばヒトFAPに結合する抗体分子（例えば、FabまたはscFv）を含む。ある実施形態において、FAPに対する抗体分子は、図12Cに下線で示される重鎖可変ドメイン配列（配列番号13）からの1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば配列番号13のCDR配列からの少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRを含む。ある実施形態において、FAPに対する抗体分子は、図12Cに下線で示される重鎖可変ドメイン配列（配列番号13）またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号13のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0503】

実施形態において、FAPに対する抗体分子は、Fabであり、アミノ酸配列：

【化44】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC（配列番号14）

またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号14のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を有する重鎖定常領域（CH1）をさらに含む。実施形態において、抗体分子は、シグナルペプチド、例えば、アミノ酸配列：MEFGLSWVFLVALFRGVQCEV（配列番号15）を含むシグナルペプチドをさらに含む。

【0504】

あるいは、または本明細書に開示されるFAPに対する重鎖と組み合わせて、FAPに対する抗体分子は、図12Dに下線で示される軽鎖可変ドメイン配列（配列番号16）からの1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば配列番号16のCDR配列からの少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRを含む。ある実施形態において、FAPに対する抗体分子は、図12Dに下線で示される軽鎖可変ドメイン配列（配列番号16）またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号16のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0505】

実施形態において、FAPに対する抗体分子は、Fabであり、アミノ酸配列：

10

20

30

40

50

【化 4 5】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号11)

またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号11のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域（CL1）をさらに含む。ある実施形態において、抗体分子は、シグナルペプチド、例えば、アミノ酸配列：MKYLLPTAAAGLL
LLAAQPAMA（配列番号12）を含むシグナルペプチドをさらに含む。

10

【0506】

免疫細胞エンゲージャ

一実施形態において、NK細胞エンゲージャは、B7-6であるNKp30のリガンドであり、例えば、

【化 4 6】

DLKVEMMAGGTQITPLNDNVTFICNIFYSQLNITSMGITWFWKSLTFDKEVKVFEFFGD
HQEAFRPGAIVSPWRLKSGDASRLRPGIQLEEAGEYRCEVVVTPPKAAGTVQLEVVASP
ASRLLLDQVGMKENEDKYMCESSGFYPEAINITWEKQTQKFPHPHIEISEDVITGPTIKNM
DGTENVTSCLKLNSSQEDPGTVYQCVVRHASLHTPLRSNFTLTAARHSLSETEKTDNFS
(配列番号24)

20

のアミノ酸配列、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号24のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0507】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、MICA、MIGB、またはULBP1から選択されるNKGD2のリガンドであり、例えば、

30

(i) MICAは、アミノ酸配列：

【化 4 7】

EPHSLRYNLTVLWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFLRCRQKCRAPQGGWAEDVLGNK
TWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGEL
FLSQNLETKEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLK
SGVVLRRTPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWG
DVLDPDNGNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHW (配列
番号25)

40

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号25のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含み；

(ii) MIGBは、アミノ酸配列：

50

【化 4 8】

AEPHSLRYNLMVLSQDESVQSGFLAEGHLDGQPFLRYDRQKRRAKPQGQWAEDVLGA
KTWDTETEDLTENGQDLRRTLTHIKDQKGGLHSLQEIRVCEIHEDSSTRGSRHFYYDGEL
FLSQNLETQESTVPQSSRAQTLAMNVTNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRYLK
SGVAIRRTVPPMVNVTCEVSEGNITVTCRASSFYPRNITLTWRQDGVSLSHNTQQWGD
VLPDGNNGTYQTWVATRIRQGEEQRFTCYMEHSGNHGTHPVPSGKVLVLQSQRTD (配列
番号26)

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号26のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含み；または

(iii) ULBP1は、アミノ酸配列：

【化 4 9】

GWVDTHCLCYDFIITPKSRPEPQWCEVQGLVDERPFLHYDCVNHKAKAFASLGKKVNV
TKTWEEQTETLRDVVDLKGQLLDIQVENLIPIEPLTLQARMSCEHEAHGHGRGSWQFL
FNGQKFLFLFDSNNRKWTALHPGAKKMTEKWEKNRDVTMFFQKISLGDCMKMWLEEF
MYWEQMLDPTKPPSLAPG (配列番号27)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号27のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0508】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、NECTIN2またはNECL5から選択されるDNAM1のリガンドであり、例えば、

30

(i) NECTIN2は、アミノ酸配列：

【化 5 0】

QDVRVQVLPEVRGQLGGTVELPCHLLPPVPGLYISLVTWQRPDAPANHQNVAAAFHPKM
GPSFPSPKPGSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTCEFATFPKGS
VRGMTWLRVIAKPKNQAEAQKVTFSDPTTVALCISKEGRPPARISWLSSLDWEAKETQ
VSGTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTCKVEHESFEPPALIPVTLVRYPPPEVSISGYD
DNWYLGRTDATALSCDVRSNPEPTGYDWSTTSGTFPTSAVAQGSQLVIIHAVDSLNTTFV
CTVTNAVGMGRAEQVIFVRETPNTAGAGATGG (配列番号28)

40

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号28のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含み；または

(ii) NECL5は、アミノ酸配列：

50

【化 5 1】

WPPPGTGDVVVQAPTQVPGFLGDSVTLPCYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSMVAV
 FHQTQGPSYSESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVD
 IWLRLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQITWHSDLGGMPNTSQVPG
 FLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPPEVSISGYDNN
 WYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPVDKPIINTLICN
 VTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGISRN (配列番号29)

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号29のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0509】

さらに他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、NK G2Dのアダプターである、DAP10のリガンドである（例えば、Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 May 24; 102 (21): 7641-7646; および Blood, 15 September 2011 Volume 118, Number 11 (これらのそれぞれの全内容が参照により本明細書に援用される)を参照)。

20

【0510】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、CD16a/bリガンドである、CD16のリガンドであり、例えば、CD16a/bリガンドは、抗体Fc領域をさらに含む（例えば、どのように抗体がFcを用いて、CD16を介してNK細胞を誘発するかを記載している Front Immunol. 2013; 4: 76 (この全内容が本明細書に援用される)を参照)。

【0511】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、NECL2である、CRTAMのリガンドであり、例えば、NECL2は、アミノ酸配列：

【化 5 2】

QNLFTKDVTVIEGEVATISCQVNKSDDSVIQLLNPNRQTIYFRDFRPLKDSRFQLLNFS
 ELKVSLTNVSISDEGRYFCQLYTDPPQESYTTITVLVPPRNLMIDIQKDTAVEGEEIEVNC
 TAMASKPATTIRWFKGNTELKGKSEVEEWSDMYTVTSQMLMKVHKEDDGVPVICQVE
 HPAVTGNLQTQRYLEVQYKPQVHIQMTYPLQGLTREGDALELTCEAIGKPQPMVTWV
 RVDDEMPQHAVLSGPNLFINNLNKTDNGTYRCEASNIVGKAHSDYMLYVYDPPTTIPPP
 TTTTTTTTTTTTTILTIITDSRAGEEGSIRAVDH (配列番号30)

30

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号30のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0512】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、CD70である、CD27のリガンドであり、例えば、CD70は、アミノ酸配列：

50

【化 5 3】

QRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQ
 LRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQR
 LTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP (配列番号31)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号31のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0513】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、Lーセレクチン（CD62L）である、PSGL1のリガンドであり、例えば、Lーセレクチンは、アミノ酸配列：

【化 5 4】

WTYHYSEKPMNWQRARRFCRDNYTDLVAIQNKAEIEYLEKTLPFSSRSYYWIGIRKIGGI
 WTWVGTNKSLEEAENWGDGEPNNKKNKEDCVEIYIKRNKDAGKWNDDACHKLKAA
 LCYTASCQPWSCSGHGECVEIINNYTCNCDVGYYGPQCQFVIQCEPLEAPELGTMDCTH
 PLGNFSFSSQCAFSCSEGNTLTGIEETTCGPFGNWSSPEPTCQVIQCEPLSAPDLGIMNCSE
 PLASFSTSACTFICSEGTELIGKKKTICESSGIWSNPSPICQKLDKSFMSIKEGDYN (配列
 番号32)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号32のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0514】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、NECL5である、CD96のリガンドであり、例えば、NECL5は、アミノ酸配列：

30

【化 5 5】

WPPPGTGDVVVQAPTQVPGFLGDSVTLP CYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSMAY
 FHQTQGPSYSESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVD
 IWLRVLAKPQNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQITWHSDDLGGMPNTSQVPG
 FLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPPEVSISGYDNN
 WYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPVDKPINTTLICN
 VTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGISRN (配列番号29)

40

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号29のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0515】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、CD72である、CD100（SEMA4D）のリガンドであり、例えば、CD72は、アミノ酸配列：

50

【化 5 6】

RYLQVSQQLQQTNRVLEVTNSSLRQQLRLKITQLGQSAEDLQGSRRRLAQSQEALQVEQ
 RAHQAAEGQLQACQADRQKTKETLQSEEQRRRALEQKLSNMENRLKPFFTCGSADTCC
 PSGWIMHQKSCFYISLTSKNWQESQKQCETLSSKLATFSEIYPQSHSYFLNSLLPNGGS
 GNSYWTGLSSNKDWKLTDDTQRTRTYAQSSKCNKVHKTWSWWTLESESCRSSLPYICE
 MTAFRFPD (配列番号33)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号33のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0516】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、CLEC2B(AICL)である、Nkp80のリガンドであり、例えば、CLEC2B(AICL)は、アミノ酸配列：

【化 5 7】

KLTRDSQSLCPYDWIGFQNKCYFSKEEGDWNSSKYNCSTQHADLTIIDNIEEMNFLRR
 YKCSSDHWIGLKMAKNRTGQWVDGATFTKSFGMRGSEGCAYLSDGAATARCYTER
 KWICRKRIH (配列番号34)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号34のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0517】

他の実施形態において、NK細胞エンゲージャは、CD48である、CD244のリガンドであり、例えば、CD48は、アミノ酸配列：

【化 5 8】

QGHLVHMTVVSGSNVTLNISESLPENYKQLTWFYTFDQKIVEWDSRKSKYFESKFKGR
 VRDPQSGALYISKVQKEDNSTYIMRVLKKTGNEQEWKIKLQVLDPPVKPVKIEKIEDM
 DDNCYLKLSCVIPGESVNYTWYGDKRPFKELQNSVLETTLMPHNYSRCYTCQVSNSVS
 SKNGTVCLSPCTLARS (配列番号35)

30

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号35のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0518】

他の実施形態において、樹枝状細胞エンゲージャは、CD2アゴニスト、OX40抗体、OX40L、41BBアゴニスト、Toll様受容体アゴニストまたはその断片（例えば、TLR4、例えば構成的活性型TLR4(catLR4)）、CD47アゴニスト、またはSTINGアゴニストの1つまたは複数から選択される。

【0519】

一実施形態において、OX40Lは、アミノ酸配列：

50

【化 5 9】

QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDFYLLSLKGYFSQ
 EVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNTTDDNTSLDDFHVNGGE
 LILIHQNPGEFCVL (配列番号36)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号36のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0520】

別の実施形態において、CD40Lは、アミノ酸配列：

【化 6 0】

MQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLY
 YIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFE
 LQPGASVFVNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL (配列番号37)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号37のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0521】

さらに他の実施形態において、STINGアゴニストは、任意選択的に、2'，5'または3'，5'リン酸塩結合とともに環状ジヌクレオチド、例えば環状ジ-GMP（cdGMP）、環状ジ-AMP（cdAMP）、またはその組合せを含む。

【0522】

一実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、例えば、アミノ酸配列：

【化 6 1】

ACPWAVSGARASPGSAASPRRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS
 WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALH
 LQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH
 AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE (配列番号38)

30

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号38のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む41BBリガンドを含む。

40

【0523】

サイトカイン分子

ある実施形態において、本明細書に開示される多重特異性分子は、サイトカイン分子を含む。実施形態において、サイトカイン分子は、サイトカインの完全長、断片もしくは変異体；サイトカイン受容体ドメイン、例えばサイトカイン受容体二量体化ドメイン；またはサイトカイン受容体のアゴニスト、例えばサイトカイン受容体に対する抗体分子（例えば、作動性抗体）を含む。ある実施形態において、サイトカインは、一本鎖である。ある実施形態において、サイトカインは、2つまたは2つ以上のポリペプチド鎖を含む。例示的な多連鎖サイトカイン分子は、IL12である。

【0524】

50

ある実施形態において、サイトカイン分子は、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-12 (IL-12)、インターロイキン-15 (IL-15)、インターロイキン-18 (IL-18)、インターロイキン-21 (IL-21)、インターロイキン-7 (IL-7) もしくはインターフェロン γ 、またはその断片もしくは変異体、あるいは上記のサイトカインのいずれかの組合せから選択される。サイトカイン分子は、モノマーまたは二量体であり得る。実施形態において、サイトカイン分子は、サイトカイン受容体二量体化ドメインをさらに含み得る。

【0525】

他の実施形態において、サイトカイン分子は、サイトカイン受容体のアゴニスト、例えば IL-15 α または IL-21 α から選択されるサイトカイン受容体に対する抗体分子 (例えば、作動性抗体) である。

【0526】

一実施形態において、サイトカイン分子は、IL-15、例えばヒトIL-15である (例えば、アミノ酸配列:

【化62】

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLES GDASIH
DTVENLILANNLSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (配列番号17)

、その断片またはそれと実質的に同一である (例えば、それと95%~99.9%同一であるか、または配列番号17のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有するアミノ酸配列を含む。

【0527】

ある実施形態において、サイトカイン分子は、受容体二量体化ドメイン、例えば IL15 α 二量体化ドメインを含む。一実施形態において、IL15 α 二量体化ドメインは、アミノ酸配列:

【化63】

MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICN
SGFKRKAGTSSLTECVL (配列番号40)

、その断片またはそれと実質的に同一である (例えば、それと95%~99.9%同一であるか、または配列番号40のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有するアミノ酸配列を含む。ある実施形態において、多重特異性分子のサイトカイン分子 (例えば、IL-15) および受容体二量体化ドメイン (例えば、IL15 α 二量体化ドメイン) は、例えば、リンカー (例えば、Gly-Ser リンカー、例えばアミノ酸配列 SGGSGGGSGGGSGGGSLQ (配列番号19) を含むリンカーを介して、共有結合される。他の実施形態において、多重特異性分子のサイトカイン分子 (例えば、IL-15) および受容体二量体化ドメイン (例えば、IL15 α 二量体化ドメイン) は、共有結合されず、例えば非共有結合的に結合される。

【0528】

他の実施形態において、サイトカイン分子は、IL-2、例えばヒトIL-2である (例えば、アミノ酸配列:

【化64】

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFCQSIISTLT (配列番号20)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号20のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

【0529】

他の実施形態において、サイトカイン分子は、IL-18、例えばヒトIL-18である（例えば、アミノ酸配列：

【化65】

YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGM
AVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSY
EGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED (配列番号41)

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号41のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

【0530】

他の実施形態において、サイトカイン分子は、IL-21、例えばヒトIL-21である（例えば、アミノ酸配列：

【化66】

QGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSA
NTGNNERIINVSIIKKLKRKPPSTNAGRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMI
HQLSSRTHGSEDS (配列番号22)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号22のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

【0531】

さらに他の実施形態において、サイトカイン分子は、インターフェロン γ 、例えば、ヒトインターフェロン γ である（例えば、アミノ酸配列：

【化67】

QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFK
NFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVM
AELSPAAKTGKRKRSQMLFRG (配列番号23)

30

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号23のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

【0532】

リンカー

本明細書に開示される多重特異性分子は、リンカー、例えば標的化部分およびサイトカイン分子、標的化部分および免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子および免疫細胞エンゲージャ、サイトカイン分子および免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）、標的化部分および免疫グロブリン鎖定常領域、または免疫細胞エンゲージャおよび免疫グロブリン鎖定常領域の1つまたは複数の間のリンカーをさらに含み得る。実施形態において

40

50

、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、ペプチドリinker、フレキシブルリンカー、剛性リンカー、らせん状リンカーもしくは非らせん状リンカーまたはその組合せから選択されるリンカーである。

【0533】

一実施形態において、多重特異性分子は、1つ、2つ、3つまたは4つのリンカー、例えばペプチドリinkerを含み得る。一実施形態において、ペプチドリinkerは、GlyおよびSerを含む。例示的なペプチドリinkerは、本明細書に開示される図に示され（例えば、図11B～11C、12B、13B～C、14A～B）、例えばGGGGS（配列番号42）；GGGSGGGGS（配列番号43）；GGGSGGGGS（配列番号44）；またはDVPSGGGGSGGGGS（配列番号45）から選択されるペプチドリinkerである。

【0534】

例示的な多重特異性の立体配置：

ある実施形態において、本明細書に開示される多重特異性分子のいずれかは、

(I) 以下を含む腫瘍標的化部分：

(a) メソテリン、GD2、PMSA、CEA、Ronキナーゼ、またはc-Metから選択される固形腫瘍抗原に対する抗体分子；および／または

(b) FAP、ヒアルロン酸、コラーゲンIV、テネイシンC、またはテネイシンWから選択される、間質抗原に対する抗体分子；または

(c) 固形腫瘍抗原に対する抗体分子と、間質抗原に対する抗体分子との組合せ；および

(II) 以下の一方または両方：

(a) CD40LもしくはCD70リガンド；CD40もしくはCD70に結合する抗体分子；OX40に対する抗体分子；OX40L；B7H6、41BBリガンド（41BBL）もしくはSTINGアゴニストまたはその組合せの1つ、2つ、3つまたは全てから選択される免疫細胞エンゲージャ；または

(b) IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-7もしくはIL-21、その断片もしくは変異体、またはサイトカイン受容体に対する抗体分子（例えば、IL-15Ra、またはIL-21Rに対する抗体（例えば、作動性抗体））、あるいは上記のいずれかの組合せから選択されるサイトカイン分子を含み得る。

【0535】

ある実施形態において、腫瘍標的化部分は、メソテリン、PSCAまたはFAPに結合する抗体分子である。ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、NKp30またはCD16に結合する抗体分子である。他の実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、CD40リガンド（CD40L）、B7H6または41BBリガンド（41BBL）から選択される。他の実施形態において、サイトカイン分子は、IL-15またはIL-21、またはサイトカイン受容体のアゴニスト、例えばIL-15RaまたはIL-21Rに対する抗体分子（例えば、作動性抗体）から選択される。

【0536】

ある実施形態において、二重特異性分子は、(i) メソテリンに対する抗体分子およびNKp30に対する抗体分子；(ii) メソテリンに対する抗体分子およびCD16に対する抗体分子；(iii) PSCAに対する抗体分子およびNKp30に対する抗体分子；(iv) PSCAに対する抗体分子およびCD16に対する抗体分子；(v) FAPに対する抗体分子およびNKp30に対する抗体分子；(vi) FAPに対する抗体分子およびCD16に対する抗体分子；(vii) FAPに対する抗体分子およびIL-15分子；(viii) FAPに対する抗体分子およびIL-15Raに対する抗体分子（例えば、作動性抗体）；(ix) FAPに対する抗体分子およびIL-21に対する抗体分子（例えば、作動性抗体）；または(x) FAPに対する抗体分子およびIL-21Rに対する抗体分子（例えば、作動性抗体）から選択される。

【0537】

他の実施形態において、三重特異性分子は、メソテリンに対する抗体分子、P S C Aに対する抗体分子もしくはF A Pに対する抗体分子；免疫細胞エンゲージャ、例えばN K p 3 0に対する抗体分子もしくはC D 1 6に対する抗体分子から選択されるN K細胞エンゲージャ；またはC D 4 0 L、O X 4 0 LもしくはC D 4 0に対する抗体分子もしくはO X 4 0に対する抗体分子から選択されるマクロファージ細胞エンゲージャ；およびI L - 1 5、I L - 2 1、I L - 1 5 R aに対する抗体またはI L - 2 1 Rに対する抗体から選択されるサイトカイン分子から選択される腫瘍標的化部分を含む。例示的な組合せとしては、限定はされないが、(i) メソテリンに対する抗体分子；C D 4 0 L ポリペプチド；およびI L - 1 5 分子；(i i) メソテリンに対する抗体分子；C D 4 0 L ポリペプチド；およびI L - 1 5 分子；(i i i) メソテリンに対する抗体分子；N K p 3 0 に結合する抗体分子；およびI L - 1 5 分子；(i v) メソテリンに対する抗体分子；C D 1 6 に結合する抗体分子；およびI L - 1 5 分子；(v) P S C A に対する抗体分子；N K p 3 0 に結合する抗体分子；およびI L - 1 5 分子；(v i) P S C A に対する抗体分子；C D 1 6 に結合する抗体分子；およびI L - 1 5 分子；(v i i) P S C A に対する抗体分子；C D 1 6 に結合する抗体分子；およびI L - 2 1 分子；または(v i i i) メソテリンに対する抗体分子；C D 1 6 に結合する抗体分子；およびI L - 2 1 分子が挙げられる。

【0538】

他の実施形態において、四重特異性分子は、(i) メソテリン、例えばヒトメソテリンに対する抗体分子；C D 4 0 L ポリペプチド；I L - 1 5 分子；およびB 7 H 6 ；(i i) F A P に対する抗体分子、例えばヒトメソテリン；C D 4 0 L ポリペプチド；I L - 1 5 分子；およびB 7 H 6 ；または(i i i) メソテリン、例えばヒトメソテリンに対する抗体分子；C D 4 0 L ポリペプチド；I L - 2 1 分子；および4 1 B B L を含む。

【0539】

ある実施形態において、多重特異性分子は、メソテリン、例えばヒトメソテリンに対する抗体分子；C D 4 0 L ポリペプチド；およびI L - 1 5 分子を含む。一実施形態において、抗体分子は、軽鎖および重鎖を有する、メソテリンに対するF a b を含む。実施形態において、メソテリンに対するF a b の重鎖は、I L - 1 5 分子、例えばヒトI L - 1 5 分子をさらに含み、任意選択的に、F a b およびI L - 1 5 分子は、例えば、G l y およびS e r を含むリンカーを介して結合される。ある実施形態において、多重特異性分子は、以下の立体配置：N末端からC末端に、メソテリンに対するF a b の重鎖（例えば、V H - C H 1）からI L - 1 5 を有し、任意選択的に、F a b とI L - 1 5 との間にG l y - S e r リンカーを含む。ある実施形態において、多重特異性分子は、アミノ酸配列：

【化68】

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGGQTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTGGGGSGGG
GSGGGGSNWNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLE
SGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS,
(配列番号46)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号46のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0540】

実施形態において、メソテリンに対するF a b の軽鎖は、C D 4 0 L をさらに含み、任意選択的に、F a b およびC D 4 0 L は、例えば、G l y およびS e r を含むリンカーを介

して結合される。一実施形態において、多重特異性分子は、以下の立体配置：N末端からC末端に、CD40Lに融合されたメソテリンに対するFabの軽鎖（例えば、VL-C1）を有し、任意選択的に、FabおよびCD40Lの間のGly-Serリンカーを含む。実施形態において、多重特異性分子は、アミノ酸配列：

【化69】

DIELTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECVPSGPGGGGGSGGGGSMQKGD
QNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV
TFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGAS
VFVNVTDPSPQVSHGTGFTSFGLLKL, (配列番号47)

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号47のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0541】

20

他の実施形態において、多重特異性分子は、FAP、例えばヒトFAPに対する抗体分子、およびIL-15分子を含む。ある実施形態において、抗体分子は、軽鎖および重鎖を有する、FAPに対するFabを含む。FAPに対するFabの重鎖は、第1のFc領域のFcインターフェース中の対になった空洞-突起（ノブ・イン・ホール）のメンバーを有する第1のFc領域をさらに含み得る。例えば、多重特異性分子は、以下の立体配置：N末端からC末端に、第1のFc領域（例えば、CH2からCH3）に融合されたFAPのFabの重鎖（例えば、VH-CH1）を有することができ、例えば、アミノ酸配列：

【化70】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIGGINPNNGIPN
YNQKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRRIAYGYDEGHAMDYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK, (配列番号48)

30

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号48のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0542】

40

実施形態において、FAPに対するFabの軽鎖は、アミノ酸配列：

50

【化 7 1】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKPGQPPLKLLIFWAST
 RESGVPDRFSGSGFGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYFSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC, (配列番号49)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号49のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0543】

実施形態において、IL-15分子、例えばヒトIL-15分子は、例えば、GlyおよびSerを含むリンカーを介して連結される、第2のFc領域のFcインターフェース中の対になった空洞-突起（ノブ・イン・ホール）の第2のメンバーを有する第2のFc領域をさらに含む。一実施形態において、多重特異性分子は、以下の立体配置：N末端からC末端に、IL-15分子-第2のFc領域（例えば、CH2からCH3）を有し、例えば、IL-15分子および第2のFc領域は、GlyおよびSerを含むリンカーを介して連結され、例えば、アミノ酸配列：

20

【化 7 2】

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIH
 DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGGGSDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK, (配列番号50)

30

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号50のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0544】

他の実施形態において、FAP、例えばヒトFAPに対する抗体分子、およびIL-15分子を含む多重特異性分子は、例えば、本明細書に記載されるような免疫細胞エンゲージ（例えば、CD40リガンド）をさらに含む。ある実施形態において、免疫細胞エンハンサーは、対になった空洞-突起（ノブ・イン・ホール）の第2のメンバーを有する第2のFc領域、およびIL-15分子、例えばヒトIL-15分子に結合され、例えば共有結合され、任意選択的に、IL-15分子と第2のFc領域との間および／または第2のFc領域と免疫細胞エンハンサーとの間に、GlyおよびSerを含むリンカーを含む。実施形態において、多重特異性分子は、以下の立体配置：N末端からC末端に、IL-15分子-第2のFc領域（例えば、CH2からCH3）-免疫細胞エンハンサーを有し、任意選択的に、IL-15分子と第2のFc領域との間および／または第2のFc領域と免疫細胞エンハンサーとの間に、GlyおよびSerを含むリンカーを含み、例えば、それは、アミノ酸配列：

40

50

【化 7 3】

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLESGDASIH
 DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGGGSDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSMQ
 KGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIY
 AQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQP
 GASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL, (配列番号51)

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号51のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0545】

他の実施形態において、FAP、例えばヒトFAPに対する抗体分子、IL-15分子、およびCD40リガンドを含み、第2の免疫細胞エンハンサー、例えばB7H6分子をさらに含む多重特異性分子である。ある実施形態において、第2の免疫細胞エンハンサーは、第1のFc領域のFcインターフェース中の対になった空洞-突起（ノブ・イン・ホール）の第1のメンバーおよびFabの重鎖を有する第1のFc領域に結合され、例えば共有結合され、任意選択的に、B7H6分子および第1のFc領域間に、GlyおよびSerを含むリンカーを含む。実施形態において、多重特異性分子は、以下の立体配置：N末端からC末端に、B7H6分子に融合された第1のFc領域（例えば、CH2からCH3）に融合されたFAPに対するFabの重鎖（例えば、VH-CH1）を有し、任意選択的に、第1のFc領域とB7H6分子との間に、GlyおよびSerを含むリンカーを含み、例えば、アミノ酸配列：

20

【化 7 4】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIGGINPNNGIPN
 YNQKFKGRVTITVDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRRIAYGYDEGHAMDYWGQ
 GTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
 VSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSDLKVEMMAGG
 TQITPLNDNVTIFCNIFYSQPLNITSMGITWFWKSLTFDKEVKVFEFFGD
 HQEAFRPGAIVSPWRLKSGDASRLRPGIQLEEAGEYRCEVVVTPLKAQGTQVQLEVVASP
 ASRLLLDQVGMKENEDKYMCESSGFYPEAINITWEKQTQKFPHPHIEISEDVITGPTIKNM
 DGTFNVTSCCLKLNSSQEDPGTVYQCVRHASLHTPLRSNFTLTAARHSLSETEKTDNFS,
 (配列番号52)

40

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一で

50

あるか、または配列番号 52 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 または 15 個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

【0546】

別の態様において、本発明は、
以下を含む第 1 のアミノ酸配列：

【化 75】

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIH
DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSGGGGSDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号50)

10

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、IL-15 ポリペプチド、リンカー、および免疫グロブリンFcを含む）；

以下を含む第 2 のアミノ酸配列：

【化 76】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIGGINPNNGIPN
YNQKFGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRRIAYGYDEGHAMDYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGDSFFL
VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS (配列番号53)

20

30

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、Fab の抗 FAP 重鎖および免疫グロブリンFcを含む）；および

以下を含む第 3 のアミノ酸配列：

【化 77】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKPGQPPLIFWAST
RESGVPDRFSGSGFGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSYPLTFGQGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号54)

40

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列）（ここで、アミノ酸配列は、抗 FAP Fab のヒトκ軽鎖を含む）

を含む多重特異性分子を特徴とする。

【0547】

ある実施形態において、第 1 のアミノ酸配列は、MEFGLSWVFLVALFRGVQC（配列番号 6）またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列をさらに含む。ある実施形態において、第 2 のアミノ酸配列は、MEFGLSWVFLVALFRGVQCEV（配列

50

番号15) またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列をさらに含む。ある実施形態において、第3のアミノ酸配列は、M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A (配列番号12) またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列をさらに含む。

【0548】

別の態様において、本発明は、
以下を含む第1のアミノ酸配列：

【化78】

MEFGLSWVFLVALFRGVQC

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLES GDASIH
DTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFIN TSGGGGSDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号50)

10

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、リーダーペプチド、I L - 15、リンカー、および免疫グロブリンFcを含む）；

20

以下を含む第2のアミノ酸配列：

【化79】

MEFGLSWVFLVALFRGVQCEVQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWV
RQAPGQRLEWIGGINPNNGIPNYNQKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYC
ARRRIAYGYDEGHAMDYWGQGLTVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPISR
EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号55)

30

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、リーダーペプチド、Fabの抗FAP重鎖および免疫グロブリンFcを含む）；および

以下を含む第3のアミノ酸配列：

【化80】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIFWAST
RESGVPDRFSGSGFGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYFSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号49)

40

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、リーダーペプチドおよび抗FAP Fabのヒトκ軽鎖を含む）

を含む多重特異性分子を特徴とする。

50

【 0 5 4 9 】

別の態様において、本発明は、
以下を含む第 1 のアミノ酸配列：

【化 8 1】

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTTVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTGGGSGGG
GSGGGGSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISLE
SGDASIHTVTENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS
(配列番号46)

10

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、F a b の抗メソテ
リン重鎖、リンカー、および I L - 1 5 を含む）；および
以下を含む第 2 のアミノ酸配列：

【化 8 2】

DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
DVPSGPGGGGGSGGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNL
VTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTH
SSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFVNVTDPQVSHGTGFTSFGLLKL (配列番号56)

20

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、抗メソテリン F a
b のヒト κ 軽鎖、リンカー、および C D 4 0 L を含む）
を含む多重特異性分子を特徴とする。

30

【 0 5 5 0 】

ある実施形態において、第 1 のアミノ酸配列は、M E F G L S W V F L V A L F R G V Q
C（配列番号 6）またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列をさらに含む。ある実施形態
において、第 2 のアミノ酸配列は、M K Y L L P T A A G L L L L A A Q P A M A（配
列番号 1 2）またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列をさらに含む。

【 0 5 5 1 】

別の態様において、本発明は、
以下を含む第 1 のアミノ酸配列：

【化 8 3】

MEFGLSWVFLVALFRGVQCQVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVK
QSHGKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCA
RGGYDGRGFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK
RVEPKSCDKTHTGGGSGGGGSGGGGSNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVH
PSCKVTAMKCFLLLELQVISLESGDASIHTVTENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELE
EKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (配列番号46)

40

50

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、リーダーペプチド、F a bの抗メソテリン重鎖、リンカー、およびI L - 1 5を含む）；および以下を含む第2のアミノ酸配列：

【化84】

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA

DIELTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECVPSGPGGGGGSGGGGSMQKGD
QNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYAQV
TFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGAS
VFVNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL (配列番号47)

10

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、リーダーペプチド、抗メソテリンF a bのヒトκ軽鎖、リンカー、およびC D 4 0 Lを含む）を含む多重特異性分子を特徴とする。

【0552】

別の態様において、本発明は、

以下を含む第1のアミノ酸配列：

【化85】

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLESGDASIH
DTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS
GGGGS DKTH TCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG
GGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQ
GLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGG
VFELQPGASVFVNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL (配列番号51)

30

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、I L - 1 5、リンカー、および免疫グロブリンF c、リンカー、およびC D 4 0 Lを含む）；以下を含む第2のアミノ酸配列：

40

50

【化 8 6】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIGGINPNNGIPN
 YNQKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRRIAYGYDEGHAMDYWGQ
 GTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
 VSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS
 DLKVEMMAGGTQITPLNDNVTIFCNIFYSQPLNITSMGITWFWKSLTFDKEVKVFEFFGD
 HQEAFRPGAIVSPWRLKSGDASRLRPGIQLEEAGEYRCEVVVTPLKAQGTQVQLEVVASP
 ASRLLLDQVGMKENEDKYMCESSGFYPEAINITWEKQTQKFPHPHIEISEDVITGPTIKNM
 DGTFNVTSCCLKLNSSQEDPGTVYQCVRHASLHTPLRSNFTLTAARHSLSETEKTDNFS
 (配列番号52)

10

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、F a b の抗 B 7 H
 6 重鎖および免疫グロブリン F c、リンカー、および B 7 H 6 を含む）；および
 以下を含む第 3 のアミノ酸配列：

20

【化 8 7】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIFWAST
 RESGVPDRFSGSGFGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYFSYPLTFGQGQTKVEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号57)

30

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、抗 F A P F a b
 のヒト κ 軽鎖を含む）
 を含む多重特異性分子を特徴とする。

【0 5 5 3】

ある実施形態において、第 1 のアミノ酸配列は、M E F G L S W V F L V A L F R G V Q
 C（配列番号 6）またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列をさらに含む。ある実施形態
 において、第 2 のアミノ酸配列は、M E F G L S W V F L V A L F R G V Q C E V（配列
 番号 1 5）またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列をさらに含む。ある実施形態におい
 て、第 3 のアミノ酸配列は、M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A（配列番号
 1 2）またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列をさらに含む。

40

【0 5 5 4】

別の態様において、本発明は、
 以下を含む第 1 のアミノ酸配列：

50

【化 8 8】

MEFGLSWVFLVALFRGVQCNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAM
KCFLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQS
FVHIVQMFIN TSGGGGSDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYT
QKSLSLSPGKGGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYYTMSNNLVTL
ENGKQLTVKRQGLYYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSA
KPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVTDP SQVSHGTGFTSFGLLKL (配列番号58)

10

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、リーダーペプチド、**I L - 1 5**、リンカー、および免疫グロブリン **F c**、リンカー、および **C D 4 0 L**を含む）；

以下を含む（またはそれと実質的に相同の）第 2 のアミノ酸配列：

【化 8 9】

MEFGLSWVFLVALFRGVQCEVQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWV
RQAPGQRLEWIGGINPNNGIPNYNQKFKGRVTITVDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYC
ARRRIAYGYDEGHAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKRV EPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSL
SLSPGKGGGGSDLKVEMMAGGTQITPLNDNVTIFCNIFYSQPLNITSMGITWFWKSLTFD
KEVKVFEFFGDHQA FRPGAIVSPWRLKSGDASLR L PGIQLEEAGEYRCEVVVTPLKAQ
GTVQLEVVASPARLLLLDQVGMKENEDKYMCESSGFYPEAINITWEKQTQKFPHPIEISE
DVITGPTIKNMDGTFNVT SCLKLNSSQEDPGTVYQC VVRHASLHTPLRSNFTLTAARHSL
SETEKTDNFS

20

30

(配列番号59)

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、リーダーペプチド、**F a b**の抗 **F A P** 重鎖および免疫グロブリン **F c**、リンカー、および **B 7 H 6**を含む）；および

40

以下を含む第 3 のアミノ酸配列：

50

【化 9 0】

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKN
 YLAWYQQKPGQPPKLLIFWASTRESGVPDRFSGSGFGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQ
 YFSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
 DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
 NRGEC (配列番号60)

またはそれと実質的に相同のアミノ酸配列（ここで、アミノ酸配列は、リーダーペプチドおよび抗 F A P F a b のヒト κ 軽鎖を含む）を含む多重特異性分子を特徴とする。

【0 5 5 5】

例示的な三重特異性分子は、メソテリン腫瘍抗原に指向された F a b 分子を含み、第 1 のポリペプチドは、リンカーを介して I L - 1 5 サイトカインに連結される F a b の重鎖 V H - C H 1 を含み、F a b の第 2 のポリペプチドは、リンカーを介して C D 4 0 リガンド（C D 4 0 L）に連結される軽鎖 V L - C L を含む（図 1 1 A ~ C）。図 1 1 B は、N - から C - の配向で、G l y - S e r リンカー（斜体で示される）を介してヒト I L - 1 5 サイトカイン（標準フォントで示される）に連結される任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列（斜体で示される）、続いて F a b の重鎖 V H - C H 1（V H および C H 1 についてそれぞれ下線および太字で示される）を示す。図 1 1 C は、N - から C - の配向で、G l y - S e r リンカー（斜体で示される）を介してヒト C D 4 0 L（オレンジ色で示される）に連結される任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列（斜体で示される）、続いて F a b の κ 軽鎖 V L - C L（V L および C L についてそれぞれ下線および太字で示される）を示す。

【0 5 5 6】

例示的な二重特異性分子は、間質抗原に指向された F a b 分子を含み、第 1 のポリペプチドは、空洞を有する第 1 の F c 分子に連結される間質抗原に対する F a b の重鎖 V H - C H 1 を含み；第 2 のポリペプチドは、突起を有する第 2 の F c 分子に連結される I L - 1 5 サイトカインを含み；第 3 のポリペプチドは、間質抗原に対する F a b の軽鎖 V L - C L を含む（図 1 2 A）。図 1 2 B は、N - から C - の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列（斜体で示される）、続いてヒト I L - 1 5 サイトカイン（標準フォントで示される）を示し、これは、突起を有する第 2 の F c 分子（斜体で示される）に連結される任意選択の G l y - S e r リンカー（斜体で示される）をさらに含む。図 1 2 C は、N - から C - の配向で、空洞を有する第 1 の F c 分子（標準フォントで示される）に連結される任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列（斜体で示される）、続いて間質抗原 F A P に対する F a b の重鎖 V H - C H 1（V H および C H 1 についてそれぞれ下線および太字で示される）を示す。図 1 2 D は、N - から C - の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列（斜体で示される）、続いて間質抗原 F A P に対する F a b の κ 軽鎖 V L - C L（V L および C L についてそれぞれ下線および太字で示される）を示す。

【0 5 5 7】

例示的な四重特異性分子は、メソテリン抗原に指向された F a b 分子を含み、第 1 のポリペプチドは、C H 3 領域中の突起（ノブ）を有する第 1 の F c 分子に連結されるメソテリン抗原に対する F a b の重鎖 V H - C H 1 を含み、第 1 の免疫細胞エンゲージャ、例えば 4 1 B B - リガンドをさらに含み；第 2 のポリペプチドは、任意選択的に G l y - S e r リンカーを介して、空洞（ホール）を有する第 2 の F c 分子に連結される I L - 2 1 サイトカインを含み、例えば、G l y - S e r リンカーを介して、第 2 の免疫細胞エンゲージャ、例えば C D 4 0 L をさらに含み；第 3 のポリペプチドは、メソテリン抗原（分子 A）に対する F a b の軽鎖 V L - C L を含む（図 1 4 A ~ 1 4 B）。以下のアミノ酸配列が含まれる：（i）メソテリン F a b（h M e s o _ S S 1 _ F a b）の重鎖および軽鎖のそ

10

20

30

40

50

れそれぞれに対応する分子A；(i i) ヒトIL-21に対応する分子B；(i i i) 分子Bおよび第2のFc領域間のリンカー（分子BからKiH_Fcリンカー）；(i v) 第1のFc領域および分子Cの間のリンカー（KiH_Fcから分子Cリンカー）；(v) ヒト41BBリガンドに対応する分子C；(v i) 第2のFc領域および分子Dの間のリンカー（KiH_Fcから分子Dリンカー）；(v i i) ヒトCD40Lに対応する分子C；(v i i i) NからCの配向で、メソテリンFabのVH、位置366にWの代わりにTの置換を含むCH2-CH3アミノ酸配列、続いてGly-Serリンカーおよびヒト41BBリガンドを含む第1のメンバーFc領域（Fcノブ）；および(i x) NからCの配向で、ヒトIL-21、Gly-Serリンカー、位置366にSの代わりにT、位置368にAの代わりにL、位置407にVの代わりにYの置換を含むCH2-CH3アミノ酸配列、続いてGly-SerリンカーおよびヒトCD40Lを含む第2のメンバーFc領域（Fcホール）。

10

【0558】

例示的な四重特異性分子は、間質抗原に指向されたFab分子を含み、第1のポリペプチドは、空洞を有する第1のFc分子に連結される間質抗原に対するFabの重鎖VH-CH1を含み、第1の免疫細胞エンゲージャ、B7H6をさらに含み；第2のポリペプチドは、任意選択的にGly-Serリンカーを介して、突起を有する第2のFc分子に連結されるIL-15サイトカインを含み、例えば、Gly-Serリンカーを介して、第2の免疫細胞エンゲージャ、CD40Lをさらに含み；第3のポリペプチドは、間質抗原に対するFabの軽鎖VL-CLを含む（図13A）。図13Bは、N-からC-の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列（斜体で示される）、続いてヒトIL-15サイトカイン（標準フォントで示される）を示し、これは、突起を有する第2のFc分子（標準フォントで示される）に連結される任意選択のGly-Serリンカー（斜体で示される）をさらに含み、これは、ヒトCD40Lアミノ酸配列（斜体で示される）に連結される、例えば任意選択のGly-Serリンカー（斜体で示される）をさらに含む。図13Cは、N-からC-の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列（斜体で示される）、続いて空洞を有する第1のFc分子（標準フォントで示される）に連結される、間質抗原FAPに対するFabの重鎖VH-CH1（VHおよびCH1についてそれぞれ下線および太字で示される）を示し、これは、ヒトB7H6アミノ酸配列（青色で示される）に連結される、例えば任意選択のGly-Serリンカー（斜体で示される）をさらに含む。図13Dは、N-からC-の配向で、任意選択のシグナルペプチドのアミノ酸配列（斜体で示される）、続いて間質抗原FAPに対するFabのκ軽鎖VL-CL（VLおよびCLについてそれぞれ下線および太字で示される）を示す。

20

30

【0559】

間質調節部分を含む例示的な多重特異性分子

本開示は、特に(i) 間質調節部分および(i i) 腫瘍抗原または間質抗原に結合する腫瘍標的化部分（例えば、抗体分子、リガンド分子、または受容体分子）を含む、新規な多機能性、例えば多重特異性分子に関する。理論に制約されるものではないが、本明細書に開示される多機能性分子は、特に癌部位を標的化（例えば、それに局在化）し、腫瘍間質を変化させ、例えば癌部位の近くの腫瘍微小環境を変化させるものと考えられる。多機能性分子は、免疫細胞エンゲージャ（例えば、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャの1つ、2つ、3つまたは全てから選択される）；および／またはサイトカイン分子の一方または両方をさらに含み得る。したがって、特に上記の部分を含む多機能性、例えば多重特異性分子、それをコードする核酸、上記の分子を生成する方法、および上記の分子を用いて癌を治療する方法が本明細書において提供される。

40

【0560】

したがって、一態様において、本開示は、間質調節部分および例えば癌抗原（例えば、固形腫瘍抗原、間質抗原、または血液抗原）に結合する腫瘍標的化部分（例えば、抗体分子、リガンド分子、または受容体分子）を含む多機能性（例えば、二機能性）分子を特徴と

50

する。

【0561】

ある実施形態において、多機能性分子は、以下の1つまたは2つ：

(i) 例えば、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャの1つ、2つ、3つまたは全てから選択される免疫細胞エンゲージャ；または

(ii) サイトカイン分子

をさらに含む。

【0562】

他の実施形態において、多機能性分子は、3つまたは4つの結合特異性または機能を含み、例えば、それは、三重特異性または四重特異性分子である。例示的な三重特異性および四重特異性分子は、

(i) 1つの腫瘍標的化部分、1つの間質調節部分および1つの免疫細胞エンゲージャ；

(ii) 1つの腫瘍標的化部分、1つの間質調節部分および1つのサイトカイン分子；

(iii) 1つの腫瘍標的化部分、1つの間質調節部分および2つの免疫細胞エンゲージャ（例えば、同じかまたは異なる免疫細胞エンゲージャ）；

(iv) 1つの腫瘍標的化部分、1つの間質調節部分および2つのサイトカイン（例えば、同じかまたは異なるサイトカイン）；

(v) 1つの腫瘍標的化部分、1つの間質調節部分、1つの免疫細胞エンゲージャ、および1つのサイトカイン分子；

(vi) 2つの腫瘍標的化部分（例えば、同じかまたは異なる標的化部分）および1つの間質調節部分；

(vii) 1つの腫瘍標的化部分および2つの間質調節部分（例えば、同じかまたは異なる間質調節部分）；

(viii) 2つの腫瘍標的化部分（例えば、同じかまたは異なる標的化部分）、1つの間質調節部分および1つの免疫細胞エンゲージャ；

(ix) 2つの腫瘍標的化部分（例えば、同じかまたは異なる標的化部分）、1つの間質調節部分および1つのサイトカイン分子；

(x) 1つの腫瘍標的化部分、2つの間質調節部分（例えば、同じかまたは異なる間質調節部分）および1つの免疫細胞エンゲージャ；および

(xi) 1つの腫瘍標的化部分、2つの間質調節部分（例えば、同じかまたは異なる間質調節部分）および1つのサイトカイン分子

を含む。

【0563】

間質調節部分

ある実施形態において、間質調節部分は、間質または細胞外基質（ECM）成分のレベルもしくは産生の減少；腫瘍線維化の減少；間質腫瘍輸送の増加；腫瘍灌流の改善；腫瘍微小血管系の拡張；腫瘍における間質液圧（IFP）の低下または腫瘍もしくは腫瘍血管系への薬剤、例えば癌治療薬もしくは細胞療法薬の浸透もしくは拡散の減少または促進の1つまたは複数を引き起こす。

【0564】

ある実施形態において、減少される間質またはECM成分は、グリコサミノグリカンまたは細胞外タンパク質、またはその組合せから選択される。ある実施形態において、グリコサミノグリカンは、ヒアルロナン（ヒアルロン酸またはHAとしても知られている）、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン、デルマトン硫酸、ヘパリン、ヘパリン硫酸、エンタクチン、テネイシン、アグリカンおよびケラチン硫酸から選択される。ある実施形態において、細胞外タンパク質は、コラーゲン、ラミニン、エラスチン、フィブリノゲン、フィブロネクチン、またはピトロネクチンから選択される。ある実施形態において、間質調節部分は、腫瘍間質または細胞外基質（ECM）を分解する酵素分子を含む。ある実施形態において、酵素分子は、ヒアルロニダーゼ分子、コラゲナーゼ分子、コンドロイチナーゼ

10

20

30

40

50

分子、マトリックスメタロプロテイナーゼ分子（例えば、マクロファージメタロエラスターゼ）、または上記のいずれかの変異体（例えば、断片）から選択される。「酵素分子」という用語は、完全長、酵素の断片もしくは変異体、例えば、天然酵素の少なくとも1つの機能的特性を保持する酵素変異体を含む。

【0565】

ある実施形態において、間質調節部分は、ヒアルロン酸のレベルまたは産生を減少させる。他の実施形態において、間質調節部分は、ヒアルロナン分解酵素、ヒアルロナン合成を阻害する薬剤、またはヒアルロン酸に対する抗体分子を含む。

【0566】

ある実施形態において、ヒアルロナン分解酵素は、ヒアルロニダーゼ分子、例えば完全長またはその変異体（例えば、その断片）である。ある実施形態において、ヒアルロナン分解酵素は、中性または酸性pH、例えば約4～5のpHで活性である。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、哺乳動物ヒアルロニダーゼ分子、例えば組み換えヒトヒアルロニダーゼ分子、例えば完全長またはその変異体（例えば、その断片、例えば、切断型）である。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、HYAL1、HYAL2、またはPH-20/SPAM1、またはその変異体（例えば、その切断型）から選択される。ある実施形態において、切断型は、C末端グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）付着部位またはGPI付着部位の一部を欠いている。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、グリコシル化され、例えば少なくとも1つのN-結合グリカンを含む。

【0567】

ある実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、アミノ酸配列：

【化91】

```
LNFRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGV TIFYVDR
LGYYPYIDSITGVT VNGGIPQKISLQDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWEEWRPTW
ARNWKPKDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEF EKAGKDFLVETIKLGKLLRP
NHLWGY YLFPDCYNHHYKKPGYNGSCFNVEIKRND DLSWLWNESTALYPSIYLNTQQS
PVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSQDEL VYTFGETVA
LGASGIVIWG TLSIMRSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVT LAAKMCSQVLCQE QGVCIRK
NWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGKPTLEDLEQFSEKFY CSCYSTLSCKEKADV
KDTDAVDVCIADGVCIDAFLKPPMETE EPQIFYNASPSTLS (配列番号61)
```

、またはその断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号61のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0568】

ある実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、

(i) 配列番号61の36-464のアミノ酸配列；

(ii) 配列番号61に記載されるアミノ酸の配列を有するPH20の36-481、36-482、または36-483のアミノ酸配列；または

(iii) 配列番号61に記載されるアミノ酸の配列のポリペプチドまたは切断型に対する少なくとも95%～100%の配列同一性を有するアミノ酸配列；または

(iv) 配列番号61に記載されるアミノ酸配列に対する30、20、10、5またはそれよりも少ないアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、配列番号61のアミノ酸配列に対して少なくとも95%（例えば、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、100%）同一のアミノ酸配列を

含む。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、配列番号 61 のヌクレオチド配列に対して少なくとも 95%（例えば、少なくとも 96%、97%、98%、99%、100%）同一のヌクレオチド配列によってコードされる。

【0569】

ある実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、PH20、例えば rHuPH20 である。ある実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子は、HYAL1 であり、アミノ酸配列：

【化92】

```
FRGPLLPNRPFTTVWNANTQWCLERHGVVDVSVFDDVVANPGQTFRGPDMTIFYSSQG  
TYPYYTPTGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDILAAIPAPDFSGLAVIDWEAWRPRWAFN  
WDTKDIYRQSRALVQAQHPDWPAPQVEAVAQDQFQGAARAWMAGTLQLGRALRPR  
GLWGFYGFPCDCYNDFLSPNYTGQCPSGIRAQNDQLGWLWGQSRALYPSIYMPAVLEG  
TGKSQMYVQHRVAEAFRVAVAAGDPNLPVLPYVQIFYDTTNHFLPLDELEHSLGESAA  
QGAAGVVLWVSWENTRTKESCQAIKEYMDTTLGPFILNVTSGALLCSQALCSGHGRCV  
RRTSHPKALLLLNPASFISQLTPGGGPLSLRGALSLEDQAQMAVEFKCRCYPGWQAPWC  
ERKSMW (配列番号62)
```

10

、またはその断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと 95%～99.9% 同一であるか、または配列番号 62 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 または 15 個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0570】

ある実施形態において、ヒアルロナン分解酵素、例えばヒアルロニダーゼ分子は、ポリマーをさらに含み、例えば、ポリマー、例えば PEG にコンジュゲートされる。ある実施形態において、ヒアルロナン分解酵素は、PEG 化 PH20 酵素（PEGPH20）である。ある実施形態において、ヒアルロナン分解酵素、例えばヒアルロニダーゼ分子は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、および IgG4 の重鎖定常領域、より特定のヒト IgG1、IgG2、IgG3、または IgG4 の重鎖定常領域から選択される免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc 領域）をさらに含む。ある実施形態において、免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc 領域）は、ヒアルロナン分解酵素、例えばヒアルロニダーゼ分子に結合され、例えば共有結合される。ある実施形態において、免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc 領域）は、Fc 受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基の数、エフェクター細胞機能、または補体機能の 1 つまたは複数を増加または減少させるように改変され、例えば変異される。ある実施形態において、ヒアルロナン分解酵素、例えばヒアルロニダーゼ分子は、二量体を形成する。

30

【0571】

ある実施形態において、間質調節部分は、ヒアルロナン、例えば HA シンターゼの合成の阻害剤を含む。ある実施形態において、阻害剤は、HA シンターゼに対するセンスもしくはアンチセンス核酸分子を含むか、または小分子薬剤である。ある実施形態において、阻害剤は、4-メチルウンベリフェロン（MU）もしくはその誘導体（例えば、6,7-ジヒドロキシ-4-メチルクマリンまたは 5,7-ジヒドロキシ-4-メチルクマリン）またはレフルノミドもしくはその誘導体である。

40

【0572】

ある実施形態において、間質調節部分は、ヒアルロン酸に対する抗体分子を含む。

【0573】

ある実施形態において、間質調節部分は、コラゲナーゼ分子、例えば哺乳動物コラゲナーゼ分子またはその変異体（例えば、断片）を含む。ある実施形態において、コラゲナーゼ分子は、例えば、

50

【化 9 3】

YNFFPRKPKWDKNQITYRIIGYTPDLDPETVDDAFARAFQVWSDVTPLRFSRIHDGEADI
MINFGRWEHGDGYFPDGDGLLAHAFAPGTGVGGDSHFDDDELWTLGEGQVVRVKY
GNADGEYCKFPFLFNGKEYNSCTDTGRSDGFLWCSTTYNFEKDGKYGFCPHEALFTMG
GNAEGQPCKFPFRFQGTSYDSCTTEGRTDGYRWCGTTEDYDRDKKYGFCPETAMSTVG
GNSEGAPCVFPFTFLGNKYESCTSAGRSDGKMWCATTANYDDDRKWGFCPDQGYSLF
LVAAHEFGHAMGLEHSQDPGALMAPIYTYTKNFRLSQDDIKGIQELYGASPDIDLGTGP
TPTLGPVTPEICKQDIVFDGIAQIRGEIFFFKDRFIWRTVTPRDKPMGPLLVATFWPELPEK
IDAVYEAPQEEKAVFFAGNEYWIYSASTLERGYPKPLTSLGLPPDVQRVDAAFNWSKNK
KTYIFAGDKFWRYNEVKKKMDPGFPKLIADAWNAIPDNLDAVVDLQGGGHSYFFKGA
YYLKLENQSLKSVKFGSIKSDWLGC (配列番号63)

10

のアミノ酸配列、またはその断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号63のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含むコラゲナーゼ分子IVである。

【0574】

20

腫瘍標的化部分

ある実施形態において、腫瘍標的化部分は、メソテリンに結合する抗体分子（例えば、FabまたはscFv）を含む。ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、

【化 9 4】

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGGQTTVT
VSS (配列番号1)

の重鎖可変ドメイン配列からの1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば配列番号1のCDR配列からの少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRを含む。

30

【0575】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、GYSFTGYTMN（配列番号2）；LITPYNGASSYNQKFRG（配列番号3）；およびGGYDGRGFDY（配列番号4）からの1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRを含む。

【0576】

40

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、3つのCDR（ここで、CDR1は、GYSFTGYTMN（配列番号2）を含み；CDR2は、LITPYNGASSYNQKFRG（配列番号3）を含み；CDR3は、GGYDGRGFDY（配列番号4）を含む）、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRからなる。

【0577】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、3つのCDR（ここで、CDR1は、GYSFTGYTMN（配列番号2）からなり；CDR2は、LITPYNGASSYNQKFRG（配列番号3）からなり；CDR3は、GGYDGRGFDY（配列番

50

号４）からなる）、または密接に関連したＣＤＲ、例えば少なくとも１つのアミノ酸改変であるが、２つ、３つまたは４つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するＣＤＲからなる。

【０５７８】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、

【化９５】

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTTVT
VSS (配列番号1)

10

の重鎖可変ドメイン配列またはそれと実質的に同一である（例えば、それと９５％～９９．９％同一であるか、または配列番号１のアミノ酸配列に対する少なくとも１つのアミノ酸改変であるが、５、１０または１５個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【０５７９】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、Ｆａｂであり、アミノ酸配列：

【化９６】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT (配列番号5)

20

またはそれと実質的に同一である（例えば、それと９５％～９９．９％同一であるか、または配列番号５のアミノ酸配列に対する少なくとも１つのアミノ酸改変であるが、５、１０または１５個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を有する重鎖定常領域（ＣＨ１）をさらに含む。

【０５８０】

ある実施形態において、抗体分子は、シグナルペプチド、例えば、アミノ酸配列：ＭＥＦ
ＧＬＳＷＶＦＬＶＡＬＦＲＧＶＱＣ（配列番号６）を含むシグナルペプチドをさらに含む。

【０５８１】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、

【化９７】

DIELTQSPAISASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIK (配列番号7)

30

の軽鎖可変ドメイン配列からの１つ、２つ、３つのＣＤＲ、または密接に関連したＣＤＲ、例えば配列番号７のＣＤＲ配列からの少なくとも１つのアミノ酸改変であるが、２つ、３つまたは４つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するＣＤＲを含む。

【０５８２】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨ（配列番号８）；ＤＴＳＫＬＡＳ（配列番号９）；およびＱＱＷＳＧＹＰＬＴ（配列番号１０）からの１つ、２つ、３つのＣＤＲ、または密接に関連したＣＤＲ、例えば少なくとも１つのアミノ酸改変であるが、２つ、３つまたは４つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するＣＤＲを含む。

【０５８３】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、３つのＣＤＲ（ここで、ＣＤＲ１は、ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨ（配列番号８）を含み；ＣＤＲ２は、ＤＴＳＫＬＡＳ（配列番号９）を含み；ＣＤＲ３は、ＱＱＷＳＧＹＰＬＴ（配列番号１０）を含む）、または密

40

50

接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRからなる。

【0584】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、3つのCDR（ここで、CDR1は、SASSSVSYMH（配列番号8）からなり；CDR2は、DTSKLAS（配列番号9）からなり；CDR3は、QQWSGYPLT（配列番号10）からなる）、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRからなる。

10

【0585】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、

【化98】

DIELTQSPAIMASPGKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIK（配列番号7）

の軽鎖可変ドメイン配列またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号7のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0586】

ある実施形態において、メソテリンに対する抗体分子は、Fabであり、アミノ酸配列：

【化99】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC（配列番号11）

またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号11のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域（CL1）をさらに含む。

30

【0587】

ある実施形態において、抗体分子は、シグナルペプチド、例えば、アミノ酸配列：MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA（配列番号12）を含むシグナルペプチドをさらに含む。ある実施形態において、シグナルペプチドは、配列番号12のアミノ酸配列を含む。ある実施形態において、シグナルペプチドは、アミノ酸配列：METDTLLLVLLLVPGSTG（配列番号64）を含む。ある実施形態において、シグナルペプチドは、アミノ酸配列：MEFGLSWVFLVALFRGVQC（配列番号6）を含む。

【0588】

ある実施形態において、腫瘍標的化部分は、FAPに結合する抗体分子（例えば、FabまたはscFv）を含む。

40

【0589】

ある実施形態において、FAPに対する抗体分子は、

【化100】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIGGINPNNGIPN
YNQKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRRIAYGYDEGHAMDYWGQ
GTLVTVSS（配列番号65）

50

の重鎖可変ドメイン配列からの1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば配列番号65のCDR配列からの少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRを含む。

【0590】

ある実施形態において、FAPに対する抗体分子は、SRYTFTEYTIH（配列番号66）；GINPNNGIPNYNQKFKG（配列番号67）；およびRRIAYGYDEGHAMDY（配列番号68）から選択される1つ、2つ、3つのCDR、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRを含む。

10

【0591】

ある実施形態において、FAPに対する抗体分子は、3つのCDR（ここで、CDR1は、SRYTFTEYTIH（配列番号66）を含み；CDR2は、GINPNNGIPNYNQKFKG（配列番号67）を含み；CDR3は、RRIAYGYDEGHAMDY（配列番号68）を含む）、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRからなる。

【0592】

ある実施形態において、FAPに対する抗体分子は、3つのCDR（ここで、CDR1は、SRYTFTEYTIH（配列番号66）からなり；CDR2は、GINPNNGIPNYNQKFKG（配列番号67）からなり；CDR3は、RRIAYGYDEGHAMDY（配列番号68）からなる）、または密接に関連したCDR、例えば少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、2つ、3つまたは4つ以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するCDRからなる。

20

【0593】

ある実施形態において、FAPに対する抗体分子は、

【化101】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIGGINPNNGIPN
YNQKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRRIAYGYDEGHAMDYWGQ
GTLVTVSS (配列番号65)

30

の重鎖可変ドメイン配列またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号65のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0594】

ある実施形態において、FAPに対する抗体分子は、Fabであり、アミノ酸配列：

【化102】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC (配列番号14)

40

またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号14のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を有する重鎖定常領域（CH1）をさらに含む。

【0595】

ある実施形態において、抗体分子は、シグナルペプチド、例えば、アミノ酸配列：MKY

50

L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A (配列番号 12) を含むシグナルペプチドをさらに含む。ある実施形態において、シグナルペプチドは、配列番号 12 のアミノ酸配列を含む。ある実施形態において、シグナルペプチドは、アミノ酸配列：M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G (配列番号 16) を含む。ある実施形態において、シグナルペプチドは、アミノ酸配列：M E F G L S W V F L V A L F R G V Q C (配列番号 6) を含む。ある実施形態において、F A P に対する抗体分子は、

【化 103】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIFWAST
RESGVPDRFSGSGFGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYFSYPLTFGQGTKVEIK (配列
番号69)

10

の軽鎖可変ドメイン配列からの 1 つ、2 つ、3 つの C D R、または密接に関連した C D R、例えば配列番号 69 の C D R 配列からの少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、2 つ、3 つまたは 4 つ以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有する C D R を含む。

【0596】

ある実施形態において、F A P に対する抗体分子は、K S S Q S L L Y S R N Q K N Y L A (配列番号 70) ; W A S T R E S (配列番号 71) ; および Q Q Y F S Y P L T (配列番号 72) から選択される 1 つ、2 つ、3 つの C D R、または密接に関連した C D R、例えば少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、2 つ、3 つまたは 4 つ以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有する C D R を含む。

20

【0597】

ある実施形態において、F A P に対する抗体分子は、3 つの C D R (ここで、C D R 1 は、K S S Q S L L Y S R N Q K N Y L A (配列番号 70) を含み ; C D R 2 は、W A S T R E S (配列番号 71) を含み ; C D R 3 は、Q Q Y F S Y P L T (配列番号 72) を含む)、または密接に関連した C D R、例えば少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、2 つ、3 つまたは 4 つ以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有する C D R からなる。

【0598】

ある実施形態において、F A P に対する抗体分子は、3 つの C D R (ここで、C D R 1 は、K S S Q S L L Y S R N Q K N Y L A (配列番号 70) からなり ; C D R 2 は、W A S T R E S (配列番号 71) からなり ; C D R 3 は、Q Q Y F S Y P L T (配列番号 72) からなる)、または密接に関連した C D R、例えば少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、2 つ、3 つまたは 4 つ以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有する C D R からなる。

30

【0599】

ある実施形態において、F A P に対する抗体分子は、

【化 104】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIFWAST
RESGVPDRFSGSGFGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYFSYPLTFGQGTKVEIK

40

(配列番号 69 の軽鎖可変ドメイン配列またはそれと実質的に同一である (例えば、それと 95 % ~ 99.9 % 同一であるか、または配列番号 69 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 または 15 個以下の改変 (例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換) を有するアミノ酸配列を含む。

【0600】

ある実施形態において、F A P に対する抗体分子は、F a b であり、アミノ酸配列：

50

【化 1 0 5】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号11)

またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号11のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域（CL1）をさらに含む。

【0601】

ある実施形態において、抗体分子は、シグナルペプチド、例えば、アミノ酸配列：MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA（配列番号12）を含むシグナルペプチドをさらに含む。ある実施形態において、シグナルペプチドは、配列番号12のアミノ酸配列を含む。ある実施形態において、シグナルペプチドは、アミノ酸配列：METDTLLLVLLLVWVPGSTG（配列番号16）を含む。ある実施形態において、シグナルペプチドは、アミノ酸配列：MEFGLSWVFLVALFRGVQC（配列番号6）を含む。

【0602】

免疫細胞エンゲージャ

ある実施形態において、NKp30のリガンドは、B7-6であり、例えば、

【化 1 0 6】

DLKVEMMAGGTQITPLNDNVITFCNIFYSQLNITSMGITWFWKSLTFDKEVKVFEFFGD
HQEAFRPGAIVSPWRLKSGDASRLRPGIQLEEAGEYRCEVVVTPKKAQGTVQLEVVASP
ASRLLLDQVGMKENEDKYMCESSGFYPEAINTWEKQTQKFPHPHIEISEDVITGPTIKNM
DGTENVTSCLKLNSSQEDPGTVYQCVRHASLHTPLRSNFTLTAARHSLSETEKTDNFS
(配列番号24)

のアミノ酸配列、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号24のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0603】

ある実施形態において、NKp44またはNKp46のリガンドは、ウイルスHAである。

【0604】

ある実施形態において、DAP10のリガンドは、NKG2Dの補助受容体である。

【0605】

ある実施形態において、CD16のリガンドは、CD16a/bリガンド、例えば抗体Fc領域をさらに含むCD16a/bリガンドである。

【0606】

ある実施形態において、NKG2Dのリガンドは、MICA、MICB、またはULBP1から選択され、例えば、(i) MICAは、アミノ酸配列：

10

20

30

40

50

【化 1 0 7】

EPHSLRYNLTVLSWDGVSQSGFLTEVHLDGQPFLRCRQKCRAPQGQWAEDVLGNK
 TWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFYYDGEL
 FLSQNLETKEWTMPQSSRAQTLAMNVNRFKEDAMKTKTHYHAMHADCLQELRRYLK
 SGVVLRRTVPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSLSHDTQQWG
 DVLDPDNGTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGKVLVLQSHW (配列
 番号25)

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号25のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含み；

(i i) M I C B は、アミノ酸配列：

【化 1 0 8】

AEPHSLRYNLMVLSQDESQSGFLAEGHLDGQPFLRYDRQKRRAPQGQWAEDVLGA
 KTWDTETEDLTENGQDLRRTLTHIKDQKGGLHSLQEIRVCEIHEDSSTRGSRHFYYDGEL
 FLSQNLETQESTVPQSSRAQTLAMNVNFWKEDAMKTKTHYRAMQADCLQKLQRYLK
 SGVAIRRTVPPMVNVTCSEVSEGNITVTCRASSFYPRNITLTWRQDGVSLSHNTQQWGD
 VLPDNGTYQTWVATRIRQGEEQRFTCYMEHSGNHGTHPVPSGKVLVLQSQRTD (配列
 番号26)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号26のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含み；または

(i i i) U L B P 1 は、アミノ酸配列：

【化 1 0 9】

GWVDTHCLCYDFIITPKSRPEPQWCEVQGLVDERPFLHYDCVNHKAKAFASLGKKVNV
 TKTWEEQTETLRDVVDLKGQLLDIQVENLIPIEPLTLQARMSCEHEAHGHGRGSWQFL
 FNGQKFLLFDSNNRKWTALHPGAKKMTEKWEKNRDVTMFFQKISLGDCMKMWLEEF
 MYWEQMLDPTKPPSLAPG (配列番号27)

30

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号27のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0 6 0 7】

ある実施形態において、DNAM1のリガンドは、NECTIN2またはNECL5から選択され、例えば、

(i) N E C T I N 2 は、アミノ酸配列：

50

【化 1 1 0】

QDVRVQVLPEVRGQLGGTVELPCHLLPPVPGLYISLVTWQRPDAPANHQNVAAAFHPKM
GPSFSPKPGSERLSFVSAKQSTGQDTEAELQDATLALHGLTVEDEGNYTCEFATFPKGS
VRGMTWLRVIAKPKNQAEAQKVTFSDPTTVALCISKEGRPPARISWLSSLDWEAKETQ
VSGTLAGTVTVTSRFTLVPSGRADGVTVTCKVEHESFEEDPALIPVTLVRYPPPEVSISGYD
DNWYLGRTDADTLSCDVRNPEPTGYDWSTTSGTFPTSAVAQGSQQLVIHAVDSLNTTFV
CTVTNAVGMGRAEQVIFVRETPNTAGAGATGG (配列番号28)

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号28のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保守的置換）を有するアミノ酸配列を含み；または

(ii) NECL5は、アミノ酸配列：

【化 1 1 1】

WPPPGTGDVVVQAPTQVPGFLGDSVTLP CYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSMAY
FHQTQGPSYSESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFGLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVD
IWLRLVLAQPNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQITWHSIDLGGMPNTSQVPG
FLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVEHESFEKPQLLTVNLTVYYPPEVSISGYDNN
WYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPVDKPIINTTLICN
VTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGISRN (配列番号29)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号29のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保守的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0608】

ある実施形態において、CRTAMのリガンドは、NECL2であり、例えば、NECL2は、アミノ酸配列：

【化 1 1 2】

QNLFTKDVTVIEGEVATISCQVNKSDDSVIQLLNPNRQTIYFRDFRPLKDSRFQLLNFS
ELKVSLTNVSISDEGRYFCQLYTDPPQESYTTITVLVPPRNLMIDIQKDTAVEGEEIEVNC
TAMASKPATTIRWFKGNTELKGKSEVEEWSDMYTVTSQMLMLKVHKEDDGVPVICQVE
HPAVTGNLQTQRYLEVQYKPQVHIQMTYPLQGLTREGDALELTCEAIGKPQPVMTWV
RVDDEMPQHAVLSGPNLFINNLNKTDNGTYRCEASNIVGKAHSDYMLYVYDPPTTIPPP
TTTTTTTTTTTTTILTIHTDSRAGEEGSIRAVDH (配列番号30)

40

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号30のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保守的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0609】

ある実施形態において、CD27のリガンドは、CD70であり、例えば、CD70は、アミノ酸配列：

50

【化 1 1 3】

QRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQ
LRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQR
LTPLARGDTLCTNLTGTLPSRNTDETFFGVQWVRP (配列番号31)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号31のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0610】

ある実施形態において、PSGL1のリガンドは、L-セレクチン（CD62L）であり、例えば、L-セレクチンは、アミノ酸配列：

【化 1 1 4】

WTYHYSEKPMNWQRARRFCRDNYTDLVAIQNKAEIEYLEKTLPFSSYYWIGIRKIGGI
WTWVGTKSLTEEAENWGDGEPNNKKNKEDCVEIYIKRNKDAGKWND DACHKLKAA
LCYTASCQPWSCSGHGECVEIINNYTCNCDVGYYPQCQFVIQCEPLEAPELGTMDCTH
PLGNFSFSSQCAFSCSEGNTLTGIEETTCGPFGNWSSPEPTCQVIQCEPLSAPDLGIMNC SH
PLASFSTSACTFICSEGTELIGKKKTICESSGIWSNPSPICQKLDKSFMSMIKEGDYN (配列
番号32)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号32のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0611】

ある実施形態において、CD96のリガンドは、NECL5であり、例えば、NECL5は、アミノ酸配列：

30

【化 1 1 5】

WPPPGTGDVVVQAPTQVPGFLGDSVTLP CYLQVPNMEVTHVSQLTWARHGESGSM AV
FHQTQGPSYSESKRLEFVAARLGAELRNASLRMFLRVEDEGNYTCLFVTFPQGSRSVD
IWLRLVLA KPQNTAEVQKVQLTGEPVPMARCVSTGGRPPAQITWHS DLGGMPNTS QVPG
FLSGTVTVTSLWILVPSSQVDGKNVTCKVEHESFEKPQLLTVNLT VYYPPEVSISGYDNN
WYLGQNEATLTCDARSNPEPTGYNWSTTMGPLPPFAVAQGAQLLIRPVDK PINTTLICN
VTNALGARQAELTVQVKEGPPSEHSGISR N (配列番号29)

40

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号29のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0612】

ある実施形態において、CD100（SEMA4D）のリガンドは、CD72であり、例えば、CD72は、アミノ酸配列：

50

【化 1 1 6】

RYLQVSQQLQQTNRVLEVTNSSLRQQRLKITQLGQSAEDLQGSRRRLAQSQEALQVEQ
 RAHQAAEGQLQACQADRQKTKETLQSEEQRRRALEQKLSNMENRLKPFFTCGSADTCC
 PSGWIMHQKSCFYISLTSKNWQESQKQCETLSSKLATFSEIYPQSHSYFLNSLLPNGGS
 GNSYWTGLSSNKDWKLTDDTQRTRTYAQSSKCNKVHKTWSWWTLESESCRSSLPYICE
 MTAFRFPD (配列番号33)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号33のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0 6 1 3】

ある実施形態において、NKp80のリガンドは、CLEC2B(AICL)であり、例えば、CLEC2B(AICL)は、アミノ酸配列：

【化 1 1 7】

KLTRDSQSLCPYDWIGFQNKCYFYSKEEGDWNSSKYNCSTQHADLTIIDNIEEMNFLRR
 YKCSSDHWIGLKMAKNRTGQWVDGATFTKSFGMRGSEGCAYLSDGAATARCYTER
 KWICKRKRIH (配列番号34)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号34のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0 6 1 4】

ある実施形態において、CD244のリガンドは、CD48であり、例えば、CD48は、アミノ酸配列：

【化 1 1 8】

QGHLVHMTVVSGSNVTNLNISESLPENYKQLTWFYTFDQKIVEWDSRKSKEYFESKFGR
 VRLDPQSGALYISKVQKEDNSTYIMRVLKKKTGNEQEWKIKLQVLDPVPKPVKIEKIEDM
 DDNCYLKLSCVIPGESVNYTWYGDKRPFKELQNSVLETTLMPHNYSRCYTCQVSNSVS
 SKNGTVCLSPCTLARS (配列番号35)

30

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号35のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0 6 1 5】

ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、B細胞、マクロファージ、および／または樹枝状細胞の1つまたは複数への結合、またはその活性化を媒介する。ある実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、CD40リガンド(CD40L)もしくはCD70リガンド；CD40もしくはCD70に結合する抗体分子；OX40に対する抗体分子；OX40リガンド(OX40L)；Toll様受容体アゴニスト（例えば、TLR4、例えば構成活性型TLR4(c aTLR4)もしくはTLR9アゴニスト)；41BBアゴニスト；CD2アゴニスト；CD47アゴニスト；またはSTINGアゴニストあるいはその組合せの1つまたは複数から選択されるB細胞、マクロファージ、および／または

50

樹枝状細胞エンゲージャを含む。ある実施形態において、B細胞エンゲージャは、CD40L、OX40LもしくはCD70リガンドまたはOX40、CD40もしくはCD70に結合する抗体分子である。ある実施形態において、マクロファージ細胞エンゲージャは、CD2アゴニスト；CD40L；OX40L；OX40、CD40もしくはCD70に結合する抗体分子；Toll様受容体アゴニストもしくはその断片（例えば、TLR4、例えば構成的活性型TLR4（c a TLR4）もしくはTLR9）；CD47またはSTINGアゴニストである。ある実施形態において、樹枝状細胞エンゲージャは、CD2アゴニスト、OX40抗体、OX40L、41BBアゴニスト、Toll様受容体アゴニスト（例えば、TLR4、例えば構成的活性型TLR4（c a TLR4）もしくはTLR9アゴニスト）；CD47アゴニストまたはSTINGアゴニストである。

10

【0616】

ある実施形態において、OX40Lは、アミノ酸配列：

【化119】

QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFI L T S Q K E D E I M K V Q N N S V I I N C D G F Y L I S L K G Y F S Q
E V N I S L H Y Q K D E E P L F Q L K K V R S V N S L M V A S L T Y K D K V Y L N V T T D N T S L D D F H V N G G E
L I L H Q N P G E F C V L (配列番号36)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号36のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保守的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0617】

ある実施形態において、CD40Lは、アミノ酸配列：

【化120】

M Q K 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 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 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37)

30

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号37のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保守的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0618】

ある実施形態において、STINGアゴニストは、任意選択的に、2'，5'または3'，5'リン酸塩結合とともに環状ジヌクレオチド、例えば環状ジ-GMP（c d GMP）、環状ジ-AMP（c d AMP）、またはその組合せを含む。

【0619】

一実施形態において、免疫細胞エンゲージャは、例えば、アミノ酸配列：

40

【化121】

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 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 V F F Q L E L R R V V A G E G S G S V S L A L H
L Q P L R S A A G A A L A L T V D L P P A S S E A R N S A F G F Q G R L L H L S A G Q R L G V H L H T E A R A R H
A W Q L T Q G A T V L G L F R V T P E I P A G L P S P R S E (配列番号38)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号38のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であ

50

るが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む、41BBリガンドを含む。

【0620】

サイトカイン分子

一実施形態において、サイトカイン分子は、IL-15、例えばヒトIL-15である（例えば、アミノ酸配列：

【化122】

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLELQVISLES GDASIH
DTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (配列番号17)

10

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号17のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0621】

ある実施形態において、サイトカイン分子は、受容体二量体化ドメイン、例えばIL15R α 二量体化ドメインを含む。一実施形態において、IL15R α 二量体化ドメインは、アミノ酸配列：

【化123】

MAPRRARGCRTLGLPALLLLLLLLRPPATRGITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICN
SGFKRKAGTSSLTECVL (配列番号73)

20

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号73のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。ある実施形態において、多重特異性分子のサイトカイン分子（例えば、IL-15）および受容体二量体化ドメイン（例えば、IL15R α 二量体化ドメイン）は、例えば、リンカー（例えば、Gly-Serリンカー、例えばアミノ酸配列SGGSGGGSGGGSGGGSLQ（配列番号19）を含むリンカーを介して、共有結合される。他の実施形態において、多重特異性分子のサイトカイン分子（例えば、IL-15）および受容体二量体化ドメイン（例えば、IL15R α 二量体化ドメイン）は、共有結合されず、例えば非共有結合的に結合される。

30

【0622】

他の実施形態において、サイトカイン分子は、IL-2、例えばヒトIL-2である（例えば、アミノ酸配列：

【化124】

APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
EEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR
WITFCQSIISTLT (配列番号20)

40

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号20のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

【0623】

他の実施形態において、サイトカイン分子は、IL-18、例えばヒトIL-18である（例えば、アミノ酸配列：

50

【化 1 2 5】

YFGKLESKLSVIRNLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGM
AVTISVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFQRSVPGHDNKMQFESSY
EGYFLACEKERDLFKLILKKEDDELGDRSIMFTVQNED (配列番号74)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号74のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

10

【0624】

他の実施形態において、サイトカイン分子は、IL-21、例えばヒトIL-21である（例えば、アミノ酸配列：

【化 1 2 6】

QGQDRHMRMRQLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSA
NTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMI
HQHLSSRTHGSEDS (配列番号22)

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号22のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

20

【0625】

さらに他の実施形態において、サイトカイン分子は、インターフェロン γ 、例えば、ヒトインターフェロン γ である（例えば、アミノ酸配列：

【化 1 2 7】

QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLKF
NFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVM
AELSPAAKTGKRKRSQMLFRG (配列番号23)

30

、その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号23のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む）。

【0626】

リンカー

ある実施形態において、多機能性分子は、リンカー、例えば腫瘍標的化部分および間質調節部分、サイトカイン分子および免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、Fc領域）、標的化部分および免疫グロブリン鎖定常領域、または免疫細胞エンゲージャおよび免疫グロブリン鎖定常領域間のリンカーをさらに含む。

40

【0627】

ある実施形態において、リンカーは、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、ペプチドリンカー、フレキシブルリンカー、剛性リンカー、らせん状リンカー、または非らせん状リンカーから選択される。ある実施形態において、リンカーは、ペプチドリンカーである。ある実施形態において、ペプチドリンカーは、GlyおよびSerを含む。ある実施形態において、ペプチドリンカーは、GGGGS（配列番号42）；GGGGSGGGSGGGSGGGSG（配列番号44）；およびDVPSGPGGGGGSGGGGGSG（配列番号45）から選択される。ある実施形態において、ペプチドリンカーは、リンカーのA（

50

E A A A K) n A ファミリーである (例えば、Protein Eng. (2001) 14 (8) : 529-532 に記載されるように)。これらは、2~5 の範囲の n を有する剛性のらせん状リンカーである。ある実施形態において、ペプチドリナーは、A E A A A K E A A A K A A A (配列番号 75) ; A E A A A K E A A A K E A A A K A A A (配列番号 76) ; A E A A A K E A A A K E A A A K E A A A K A A A (配列番号 77) ; および A E A A A K E A A A K E A A A K E A A A K E A A A K A A A (配列番号 78) から選択される。

【0628】

多機能性分子の立体配置

ある実施形態において、多機能性分子は、一本鎖抗体分子、例えば単ドメイン抗体、s c F v、ラクダ科、またはサメ抗体、および第 2 の部分を含む。ある実施形態において、多機能性分子は、N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第 2 の部分に連結される s c F v の V H から V L を含み (例えば、図 1 A および 1 B に示されるように) ; s c F v は、第 1 の結合特異性を形成し得る (図 1 A ~ 1 B に結合部分「1」として示される)。ある実施形態において、第 2 の部分 (図 1 A ~ 1 B にパートナー A として示される) は、N- から C- の配向で、s c F v の V H 領域の前に (例えば、図 1 A に示されるように)、または N- から C- の配向で、s c F v の V L 領域の後に配置され (例えば、図 1 B に示されるように) ; 第 2 の部分は、第 2 の結合特異性を形成し得る (図 1 A ~ 1 B に結合部分「2」として示される)。他の実施形態において、多機能性分子は、N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第 2 の部分に連結される s c F v の V L から V H を含み (例えば、図 2 A および 2 B に示されるように) ; s c F v は、第 1 の結合特異性を形成し得る (図 2 A ~ 2 B に結合部分「1」として示される)。ある実施形態において、第 2 の部分 (図 2 A ~ 2 B にパートナー A として示される) は、N- から C- の配向で、s c F v の V L 領域の前に (例えば、図 2 A に示されるように)、または N- から C- の配向で、s c F v の V H 領域の後に配置され (例えば、図 2 B に示されるように)、第 2 の部分は、第 2 の結合特異性を形成し得る (図 2 A ~ 2 B に結合部分「2」として示される)。実施形態において、s c F v は、腫瘍標的化部分であり得 (例えば、癌抗原、例えば固形腫瘍、間質、または血液抗原に結合する)、または免疫細胞エンゲージであり得る (例えば、免疫細胞抗原に結合する)。他の実施形態において、第 2 の部分 (例えば、図 1 A ~ 1 B または 2 A ~ 2 B にパートナー A として示される) は、例えば、本明細書に記載されるような間質調節である。

【0629】

他の実施形態において、多機能性分子は、一本鎖ポリペプチド、例えば、隣接単一ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなる三重特異性または三機能性である。例えば、多機能性分子は、腫瘍標的化部分 (例えば、癌抗原、例えば本明細書に記載されるような固形腫瘍、間質、または血液抗原に対する第 1 の結合特異性)、例えば本明細書に記載されるような間質調節、および本明細書に記載されるサイトカイン分子、および免疫細胞エンゲージ (例えば、本明細書に記載される免疫細胞抗原に対する第 2 の結合特異性) の 1 つまたは上記のいずれかの任意の組合せを含み得る。

【0630】

ある実施形態において、多機能性分子は、一本鎖抗体分子、例えば単ドメイン抗体、s c F v、ラクダ科、またはサメ抗体、および第 2 の部分を含む。ある実施形態において、多機能性分子は、N から C の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第 2 の部分および/または第 3 の部分に連結される s c F v の V H から V L を含み (例えば、図 1 C に示されるように) ; s c F v は、第 1 の結合特異性を形成し得る (図 1 C に結合部分「1」として示される)。ある実施形態において、第 2 または第 3 の部分 (図 1 C にパートナー A および B として示される) は、N- から C- の配向で、s c F v の V H 領域の前に配置され (例えば、図 1 C に示されるように)、第 3 の部分 (パートナー B) は、N- から C- の配向で、s c F v の V L 領域の後に配置され (例えば、図 1 C に示されるように) ; 第 2 および第 3 の部分は、第 2 および第 3 の結合特異性を形成し得る (図 1 C にそれぞれ結

合部分「2」および結合部分「3」として示される)。他の実施形態において、多機能性分子は、NからCの配向で、任意選択的にリンカーを介して、第2の部分および／または第3の部分に連結されるs c F vのV LからV Hを含む(例えば、図2 Cに示されるように)。ある実施形態において、第2の部分(図2 CにパートナーAとして示される)は、N-からC-の配向で、s c F vのV L領域の前に(例えば、図2 Cに示されるように)、第3の部分(パートナーB)は、N-からC-の配向で、s c F vのV H領域の後に配置され(例えば、図2 Cに示されるように)；第2および第3の部分は、第2および第3の結合特異性を形成し得る(図2 Cにそれぞれ結合部分「2」および結合部分「3」として示される)。実施形態において、上記の多機能性分子のいずれかのs c F vは、腫瘍標的化部分(例えば、癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する)または免疫細胞エンゲージャ(例えば、免疫細胞抗原に結合する)であり得る。実施形態において、第2の部分または第3の部分(例えば、図1 Cまたは2 CにパートナーAおよびパートナーBとして示される)は、例えば、本明細書に記載されるような間質調節を含み、残りの部分は、第2の腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、またはサイトカイン分子(例えば、本明細書に記載されるような)から選択される。実施形態において、パートナーAおよび／またはパートナーBは、例えば、本明細書に記載されるような抗体分子(例えば、一本鎖抗体分子(例えば、s c F vまたはF a b)、間質調節部分、受容体分子、またはリガンド分子(例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子))であり得る。一実施形態において、腫瘍標的化部分は、癌細胞抗原に対するs c F vであり、第2の部分は、例えば、本明細書に記載されるような間質調節であり、第3の部分は、独立して、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャから選択される。ある実施形態において、第2および第3の部分は、独立して、間質調節部分、第2の抗体分子(例えば、第2のs c F vまたはF a b)、受容体分子、またはリガンド分子(例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子)から選択される。

【0631】

実施形態において、多機能性分子は、二重特異性または二機能性分子であり、第1および第2のポリペプチド(i)および(ii)は不連続であり、例えば、2つの別個のポリペプチド鎖である。実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、図3 A～3 Bまたは図4 A～4 Bに示される立体配置を有する。実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、第1の結合特異性、例えば、抗原結合ドメイン(例えば、図3 A～3 Bおよび図4 A～4 Bに結合部分「1」として示される)を形成する。実施形態において、第2の部分(パートナーAとして示される)は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのいずれかに連結される。実施形態において、第2の部分は、第2の結合特異性(例えば、図3 A～3 Bおよび図4 A～4 Bに結合部分「2」として示される)を形成する。

【0632】

図3 A～3 Bに示される一実施形態において、第2の部分(例えば、パートナーA)は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのC末端(例えば、第2のポリペプチドのC L領域のC末端)に連結される(例えば、図3 Aに示されるように)。他の実施形態において、第2の部分(例えば、パートナーA)は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのC末端(例えば、第1のポリペプチドのC H 1領域のC末端)に連結される(例えば、図3 Bに示されるように)。

【0633】

図4 A～4 Bに示される別の実施形態において、第2の部分(例えば、パートナーA)は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのN末端(例えば、第2のポリペプチドのV L領域のN末端)に連結される(例えば、図4 Aに示されるように)。他の実施形態において、第2の部分(例えば、パートナーA)は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのN末端(例えば、第1のポリペプチドのV H領域のN末端)に連結される(例えば、図4 Bに示されるように)。

【0634】

10

20

30

40

50

実施形態において、第1および第2のポリペプチド（例えば、VHおよびVL領域）は、結合部分（例えば、図3A～3Bおよび4A～4B中の結合部分1）を形成することができ；例えば、第1および第2のポリペプチドは、腫瘍標的化部分（例えば、癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する）または免疫細胞エンゲージャ（例えば、免疫細胞抗原に結合する）であり得る。実施形態において、第2の部分（例えば、図3A～3Bおよび4A～4BにパートナーAとして示される）は、間質調節部分、例えば本明細書に記載される間質調節部分を含む。

【0635】

実施形態において、多重特異性分子は、二重特異性または二機能性分子であり、第1および第2のポリペプチド（i）および（ii）は不連続であり、例えば、2つの別個のポリペプチド鎖である。実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、図3A～3Bまたは図4A～4Bに示される立体配置を有する。実施形態において、第2の部分（パートナーAとして示される）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのいずれか（例えば、第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドのN末端またはC末端のいずれか）に連結される。

10

【0636】

図3A～3Bに示される二重特異性または二機能性分子の一実施形態において、第2の部分（例えば、パートナーA）は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのCL領域（例えば、CL領域のC末端）に連結される（例えば、図3Aに示されるように）。他の実施形態において、第2の部分（例えば、パートナーA）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのCH1領域（例えば、CH1領域のC末端）に連結される（例えば、図3Bに示されるように）。

20

【0637】

図4A～4Bに示される二重特異性または二機能性分子の別の実施形態において、第2の部分（例えば、パートナーA）は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのVL領域（例えば、VL領域のN末端）に連結される（例えば、図4Aに示されるように）。他の実施形態において、第2の部分（例えば、パートナーA）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのVH領域（例えば、VH領域のN末端）に連結される（例えば、図4Bに示されるように）。

【0638】

二重特異性または二機能性分子の実施形態において、第1および第2のポリペプチド（例えば、VHおよびVL領域）は、結合部分（例えば、図3A～3Bおよび4A～4B中の結合部分1）を形成することができ；例えば、第1および第2のポリペプチドは、腫瘍標的化部分（例えば、癌抗原、例えば腫瘍、間質または血液抗原に結合する）または免疫細胞エンゲージャ（例えば、免疫細胞抗原に結合する）であり得る。実施形態において、第2の部分（例えば、図3A～3Bおよび4A～4BにパートナーAとして示される）は、例えば、本明細書に記載されるような間質調節部分を含む。

30

【0639】

一実施形態において、多重特異性分子は、Fab分子を含み、第2の部分は、間質調節部分、または第2の抗体分子（例えば、scFvまたは第2のFab）、受容体分子、またはリガンド分子（例えば、サイトカイン分子）から選択される。一実施形態において、腫瘍標的化部分は、癌細胞抗原に対するFabであり、第2の部分は、間質調節部分を含み、任意選択的に、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャをさらに含む。ある実施形態において、第2の部分は、第2の抗体分子（例えば、第2のscFvまたはFab）、間質調節部分、受容体分子、受容体リガンド分子、またはサイトカイン分子である。

40

【0640】

他の実施形態において、多重特異性分子は、三重特異性または三機能性分子であり、第1および第2のポリペプチド（i）および（ii）は不連続であり、例えば、2つの別個のポリペプチド鎖である。実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、図3Cおよび4Cに示される立体配置を有する。実施形態において、第2の部分および第3の部分

50

(それぞれパートナー A および B として示される) は、例えば、リンカーを介して第 1 のポリペプチドおよび第 2 のポリペプチドのそれぞれの C 末端、N 末端、または両方に連結される。一実施形態において、第 2 の部分および第 3 の部分は、第 2 および第 1 のポリペプチド (または第 1 および第 2 のポリペプチド) のそれぞれの C 末端に連結される。別の実施形態において、第 2 の部分および第 3 の部分は、第 2 および第 1 のポリペプチド (または第 1 および第 2 のポリペプチド) のそれぞれの N 末端に連結される。一実施形態において、第 2 の部分および第 3 の部分は、第 2 および第 1 のポリペプチド (または第 1 および第 2 のポリペプチド) のそれぞれの N および C 末端に連結される。図 3 C および 4 C に例示されるものを含む任意の立体配置が本開示によって意図される。

【0641】

図 3 C ~ 4 C に示される三重特異性または三機能性分子の一実施形態において、第 2 の部分 (例えば、第 2 の結合特異性「2」に対応するパートナー A) は、例えば、リンカーを介して第 2 のポリペプチドの C 末端 (例えば、第 2 のポリペプチドの C L 領域の C 末端) に連結され (例えば、図 3 C に示されるように)、第 3 の部分 (例えば、第 3 の結合特異性「3」に対応するパートナー B) は、例えば、リンカーを介して第 1 のポリペプチドの C 末端 (例えば、第 1 のポリペプチドの C H 1 領域の C 末端) に連結される (例えば、図 3 C に示されるように)。

【0642】

図 3 C ~ 4 C に示される三重特異性または三機能性分子の別の実施形態において、第 2 の部分 (例えば、第 2 の結合特異性「2」に対応するパートナー A) は、例えば、リンカーを介して第 2 のポリペプチドの N 末端 (例えば、第 2 のポリペプチドの V L 領域の N 末端) に連結され (例えば、図 4 C に示されるように)、第 3 の部分 (例えば、第 3 の結合特異性「3」に対応するパートナー B) は、例えば、リンカーを介して第 1 のポリペプチドの N 末端 (例えば、第 1 のポリペプチドの V H 領域の N 末端) に連結される (例えば、図 4 C に示されるように)。

【0643】

三重特異性または三機能性分子の別の実施形態において、第 2 の部分 (例えば、第 2 の結合特異性「2」に対応するパートナー A) は、例えば、リンカーを介して第 2 のポリペプチドの N 末端 (例えば、第 2 のポリペプチドの V L 領域の N 末端) に連結され、第 3 の部分 (例えば、第 3 の結合特異性「3」に対応するパートナー B) は、例えば、リンカーを介して第 1 のポリペプチドの C 末端 (例えば、第 1 のポリペプチドの C H 1 領域の C 末端) に連結される。

【0644】

三重特異性または三機能性分子の別の実施形態において、第 2 の部分 (例えば、第 2 の結合特異性「2」に対応するパートナー A) は、例えば、リンカーを介して第 2 のポリペプチドの C 末端 (例えば、第 2 のポリペプチドの C L 領域の N 末端) に連結され、第 3 の部分 (例えば、第 3 の結合特異性「3」に対応するパートナー B) は、例えば、リンカーを介して第 1 のポリペプチドの N 末端 (例えば、第 1 のポリペプチドの V H 領域の N 末端) に連結される。

【0645】

三重特異性または三機能性分子の実施形態において、第 1 および第 2 のポリペプチド (例えば、V H および V L 領域) は、第 1 の結合特異性 (例えば、図 3 C および 4 C 中の結合部分「1」) を形成することができ; 例えば、第 1 および第 2 のポリペプチドは、腫瘍標的化部分 (例えば、癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する) または免疫細胞エンゲージャ (例えば、免疫細胞抗原に結合する) であり得る。実施形態において、第 2 の部分または第 3 の部分 (例えば、図 3 C および 4 C にパートナー A および B として示される) は、間質調節部分、例えば本明細書に記載される間質調節部分を含み、残りの部分は、腫瘍標的化部分、免疫細胞エンゲージャ、またはサイトカイン分子 (例えば、本明細書に記載されるような) から選択される。実施形態において、第 2 および第 3 の結合特異性、例えば、パートナー A および B は、独立して、例えば本明細書に記載されるよ

10

20

30

40

50

うな間質調節部分、酵素分子、抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、 $s c F v$ ）または $F a b$ ）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。一実施形態において、多機能性分子は、 $F a b$ 分子を含み、第2の部分または第3の部分は、間質調節部分を含み、残りの部分は、第2の抗体分子（例えば、 $s c F v$ または第2の $F a b$ ）、受容体分子、またはリガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から選択される。ある実施形態において、第1の結合特異性、第2の結合特異性および第3の結合特異性は、それぞれ独立して、腫瘍標的化部分、間質調節部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択され得る。一実施形態において、腫瘍標的化部分は、癌細胞抗原に対する $F a b$ であり、第2または第3の部分は、間質調節部分であり、残りの部分は、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャから選択される。

【0646】

一実施形態において、多機能性分子は、少なくとも2つ、少なくとも3つまたは少なくとも4つの非隣接ポリペプチドを含み、

(i) 第1のポリペプチドは、N-からC-の配向で、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、 $C H 3$ 領域に連結された $C H 2$ ）（例えば、第1の $F c$ 領域）を含み；および

(ii) 第2のポリペプチドは、N-からC-の配向で、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、 $C H 3$ 領域に連結された $C H 2$ ）（例えば、第2の $F c$ 領域）を含む。

【0647】

実施形態において、多機能性分子は、二重特異性または二機能性分子であり、第1および第2のポリペプチド (i) および (ii) は不連続であり、例えば、2つの別個のポリペプチド鎖である。ある実施形態において、第1および第2のポリペプチド (i) および (ii) は、例えば、ヒト $I g G 1$ の $F c$ 領域の 347、349、350、351、366、368、370、392、394、395、397、398、399、405、407、または409の1つまたは複数から選択される位置に対になったアミノ酸置換を含む。例えば、第1の免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、第1の $F c$ 領域）は、 $T 366 S$ 、 $L 368 A$ 、または $Y 407 V$ （例えば、空洞またはホールに対応する）から選択されるアミノ酸置換を含むことができ、第2の免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、第2の $F c$ 領域）は、 $T 366 W$ （例えば、突起またはノブに対応する）を含む。ある実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、ヘテロ二量体の第1および第2の $F c$ 領域の第1および第2のメンバーである。

【0648】

実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、二機能性、例えば二重特異性分子を形成する。ある実施形態において、第1のポリペプチドは、第1の結合および／または機能的特異性（例えば、図5A中のパートナーAまたは結合特異性1）を含み、第2のポリペプチドは、第2の結合および／または機能的特異性（例えば、図5A中のパートナーBまたは結合特異性2）を含む。実施形態において、第1および第2の結合および／または機能的特異性（それぞれパートナーAおよびパートナーB）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような間質調節部分、酵素分子、抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、 $s c F v$ ）または $F a b$ ）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から選択される。実施形態において、第1および第2の結合特異性は、第1または第2のポリペプチドのいずれかまたはポリペプチドのそれぞれ（例えば、ヘテロ二量体 $F c$ 分子の一方または両方のメンバー）に連結される。一実施形態において、第1の結合特異性（例えば、パートナーA）は、第1のポリペプチドのN末端（例えば、第1の $F c$ 分子の $-C H 2 - C H 3 -$ 領域）に連結され、第2の結合特異性（例えば、パートナーB）は、第2のポリペプチドのN末端（例えば、第2の $F c$ 分子の $-C H 2 - C H 3 -$ 領域）に連結される。あるいは、第1の結合および／または機能的特異性（例えば、パートナーA）は、第1のポリペプチドのC末端（例えば、第1の $F c$ 分子の $-C H 2 - C H 3 -$ 領域）に連結され、第2の結合および／または機能的特異性

10

20

30

40

50

(例えば、パートナー B) は、第 2 のポリペプチドの C 末端 (例えば、第 2 の F c 分子の $-CH_2-CH_3$ 領域) に連結される。あるいは、第 1 の結合特異性 (例えば、パートナー A) は、第 1 のポリペプチドの N 末端 (例えば、第 1 の F c 分子の $-CH_2-CH_3$ 領域) に連結され、第 2 の結合特異性 (例えば、パートナー B) は、第 2 のポリペプチドの C 末端 (例えば、第 2 の F c 分子の $-CH_2-CH_3$ 領域) に連結される。他の実施形態において、第 2 の結合および／または機能的特異性 (例えば、パートナー B) は、第 1 のポリペプチドの N 末端 (例えば、第 1 の F c 分子の $-CH_2-CH_3$ 領域) に連結され、第 1 の結合および／または機能的特異性 (例えば、パートナー A) は、第 2 のポリペプチドの C 末端 (例えば、第 2 の F c 分子の $-CH_2-CH_3$ 領域) に連結される。一実施形態において、第 1 の $-CH_2-CH_3$ 領域は、突起またはノブを含み、第 2 の $-CH_2-CH_3$ 領域は、例えば、図 5 A に示されるように) 空洞またはホールを含む。

10

【0649】

ある実施形態において、二機能性分子の第 1 および第 2 の結合および／または機能的特異性 (結合部分 1 および結合部分 2) は、それぞれ独立して、間質調節部分、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、NK 細胞エンゲージャ、T 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択され得る。ある実施形態において、第 1 の結合および／または機能的特異性は、腫瘍標的化部分であり、第 2 の結合および／または機能的特異性は、間質調節部分である。他の実施形態において、第 1 の結合および／または機能的特異性は、免疫細胞エンゲージャであり、第 2 の結合および／または機能的特異性は、間質調節部分であり、例えば、免疫細胞エンゲージャは、サイトカイン分子、NK 細胞エンゲージャ、T 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。

20

【0650】

図 5 A に示されるある実施形態において、二重特異性分子は、パートナー A および B を有することができ、これらは、それぞれ第 1 および第 2 の結合および／または機能的特異性 (結合部分 1 および 2) として示される (図 5 A)。第 1 および第 2 の結合および／または機能的特異性は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような間質調節部分、酵素分子、抗体分子 (例えば、一本鎖抗体分子 (例えば、scFv) または Fab)、受容体分子、リガンド分子 (例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子) であり得る。ある実施形態において、第 1 の結合および／または機能的特異性は、腫瘍標的化部分であり、第 2 の結合および／または機能的特異性は、間質調節部分である。他の実施形態において、第 1 の結合および／または機能的特異性は、免疫細胞エンゲージャであり、第 2 の結合および／または機能的特異性は、間質調節部分であり、例えば、免疫細胞エンゲージャは、サイトカイン分子、NK 細胞エンゲージャ、T 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。

30

【0651】

実施形態において、第 1 および第 2 のポリペプチドは、三機能性、例えば三重特異性、または四機能性、例えば四重特異性分子を形成する (例えば、それぞれ図 5 B ~ 5 C に示されるように)。

40

【0652】

三機能性、例えば三重特異性分子のある実施形態において、第 1 のポリペプチドは、第 1 の結合および／または機能的特異性 (例えば、図 5 B 中のパートナー A または結合部分 1) を含み、第 2 のポリペプチドは、第 2 の結合および／または機能的特異性 (例えば、図 5 B 中のパートナー B または結合特異性 2) を含み、第 1 または第 2 のポリペプチドのいずれかは、第 3 の結合および／または機能的特異性 (例えば、図 5 B 中のパートナー C または結合部分 3) をさらに含む。実施形態において、第 1 および第 2 の結合および／または機能的特異性は、第 1 または第 2 のポリペプチドのいずれかまたはポリペプチドのそれぞれ (例えば、ヘテロ二量体 F c 分子の一方または両方のメンバー) に連結される。一実施形態において、第 1 および第 2 の結合および／または機能的特異性は、例えば、リンカ

50

ーを介して第1および第2のポリペプチドのそれぞれのN末端に連結され、第3の結合および／または機能的特異性は、例えば、リンカーを介して第1または第2のポリペプチドのいずれかのC末端に連結される。一実施形態において、第3の結合および／または機能的特異性は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのC末端（例えば、図5Bに示される第1の $-CH_2-CH_3$ 領域のC末端）に連結される。一実施形態において、第3の結合および／または機能的特異性は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのC末端（例えば、第2の $-CH_2-CH_3$ 領域のC末端）に連結される。一実施形態において、第1の $-CH_2-CH_3$ 領域は、突起またはノブを含み、第2の $-CH_2-CH_3$ 領域は、例えば、図5Bに示されるように）ホールまたは空洞を含む。

【0653】

実施形態において、第1、第2および第3の結合および／または機能的特異性（それぞれパートナーA、パートナーB、およびパートナーC）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような間質調節部分、酵素分子、抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から選択される。一実施形態において、第1の結合および／または機能的特異性（例えば、パートナーA）は、第1のポリペプチドのN末端（例えば、第1のFc分子の $-CH_2-CH_3$ 領域）に連結され；第2の結合および／または機能的特異性（例えば、パートナーB）は、第2のポリペプチドのN末端（例えば、第2のFc分子の $-CH_2-CH_3$ 領域）に連結され；第3の結合および／または機能的特異性（例えば、パートナーC）は、第1のポリペプチドのC末端（例えば、第2のFc分子の $-CH_2-CH_3$ 領域）に連結される。他の実施形態において、第1の結合および／または機能的特異性（例えば、パートナーA）は、第1のポリペプチドのN末端（例えば、第1のFc分子の $-CH_2-CH_3$ 領域）に連結され；第2の結合および／または機能的特異性（例えば、パートナーB）は、第2のポリペプチドのN末端（例えば、第1のFc分子の $-CH_2-CH_3$ 領域）に連結され；第3の結合および／または機能的特異性（例えば、パートナーC）は、第2のポリペプチドのC末端（例えば、第2のFc分子の $-CH_2-CH_3$ 領域）に連結される。第1、第2および第3の結合および／または機能的特異性は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような間質調節部分、酵素分子、抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、第1、第2および第3の結合および／または機能的特異性（それぞれ結合部分1～3に対応するパートナーA～C）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、間質調節部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージ、T細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。実施形態において、第1の結合および／または機能的特異性は、腫瘍標的化部分であり、第2の結合および／または機能的特異性は、間質調節部分であり、第3の結合および／または機能的特異性は、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージ、T細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。

【0654】

四機能性、例えば四重特異性分子のある実施形態において、第1のポリペプチドは、第1の結合および／または機能的特異性（例えば、図5C中のパートナーAまたは結合部分1）および第3の結合および／または機能的特異性（例えば、図5C中のパートナーCまたは結合部分3）を含み、第2のポリペプチドは、第2の結合および／または機能的特異性（例えば、図5C中のパートナーBまたは結合特異性2）および第4の結合および／または機能的特異性（例えば、図5C中の）パートナーDまたは結合部分4を含む。一実施形態において、第1および第2の結合特異性は、例えば、リンカーを介して第1および第2のポリペプチドのそれぞれのN末端に連結され、第3および第4の結合特異性は、例えば、リンカーを介して第1および第2のポリペプチドのそれぞれのC末端に連結される。第1または第2のポリペプチドのN-またはC末端への結合および／または機能的特異性の

10

20

30

40

50

いずれの置き換えも本開示によって包含される。一実施形態において、第1の結合および／または機能的特異性（例えば、パートナーA）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのN末端（例えば、図5Cに示される第1の-CH₂-CH₃領域のN末端）に連結され；第2の結合および／または機能的特異性（例えば、パートナーB）は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのN末端（例えば、図5Cに示される第2の-CH₂-CH₃領域のN末端）に連結され；第3の結合および／または機能的特異性（例えば、パートナーC）は、例えば、リンカーを介して第1のポリペプチドのC末端（例えば、図5Cに示される第1の-CH₂-CH₃領域のC末端）に連結され；第4の結合および／または機能的特異性（例えば、パートナーD）は、例えば、リンカーを介して第2のポリペプチドのC末端（例えば、第2の-CH₂-CH₃領域のC末端）に連結される。一実施形態において、第1の-CH₂-CH₃領域は、突起またはノブを含み、第2の-CH₂-CH₃領域は、例えば、図5Cに示されるように）空洞またはホールを含む。実施形態において、第1、第2、第3および第4の結合および／または機能的特異性（それぞれパートナーA、パートナーB、パートナーCおよびパートナーD）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような間質調節部分、酵素分子、抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から選択される。第1、第2、第3および第4の結合および／または機能的特異性は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような間質調節部分、酵素分子、抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）であり得る。ある実施形態において、第1、第2、第3および第4の結合および／または機能的特異性（それぞれ結合部分1〜4を対応するパートナーA〜D）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、間質調節部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージ、T細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。実施形態において、第1の結合および／または機能的特異性は、腫瘍標的化部分であり、第2の結合および／または機能的特異性は、間質調節部分であり、第3および第4の結合および／または機能的特異性は、それぞれ独立して、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージ、T細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。

【0655】

一実施形態において、多機能性分子は、2つの非隣接第1および第2のポリペプチドを含む二重特異性分子である。実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるような間質調節部分、酵素分子、抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から独立して選択される第1および第2の結合部位をそれぞれ含む。ある実施形態において、第1および第2の結合および／または機能的特異性（それぞれ結合部位1〜2）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような間質調節部分、腫瘍標的化部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージ、T細胞エンゲージ、B細胞エンゲージ、樹枝状細胞エンゲージまたはマクロファージ細胞エンゲージから選択される。ある実施形態において、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：任意選択的にリンカーを介して、第2の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#2、例えば、本明細書に記載されるような例えば間質調節部分）に連結される、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えば癌抗原に結合する、例えばFab分子の第1のVH-CH1（例えば、結合部位#1）を有し；第2のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：第1の抗原ドメインの第2の部分、例えば癌抗原（例えば、第1のVH-CH1、例えば、結合部位#1によって結合される同じ癌抗原）に結合する、例えばFabの第1のVL-CLを有する（例えば、この立体配置の例が図16に示される）。一実施形態において、任意選択的にリンカーを介して、第2の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#2、例えば、本明細書に記載されるような

10

20

30

40

50

例えば間質調節部分)に連結される、第1の結合および／または機能的特異性(結合部位#1)に対応するFabを含む二重特異性分子である。ある実施形態において、第1の結合および／または機能的特異性(例えば、図16中の結合部位#1)は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；第2の結合および／または機能的特異性(例えば、図16中の結合部位#2)は、例えば、本明細書に記載される間質調節部分である。

【0656】

別の実施形態において、多機能性分子は、2つまたは少なくとも3つの非隣接第1および第2のポリペプチドを含む二機能性、例えば二重特異性分子であり、

(i)第1のポリペプチドは、N-からC-の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域(例えば、CH3領域に連結されたCH2)(例えば、第1のFc領域)に連結される、第1の結合および／または機能的特異性、例えば第1の抗体分子を含み；

(ii)第2のポリペプチドは、N-からC-の配向で、第2の免疫グロブリン定常領域(例えば、CH3領域に連結されたCH2)(例えば、第2のFc領域)を含み；および(任意選択的に)(iii)第3のポリペプチドは、第1の抗体分子または第2の抗体分子の一部を含む。

【0657】

実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるような間質調節部分、酵素分子、抗体分子(例えば、一本鎖抗体分子(例えば、scFv)またはFab)、受容体分子、リガンド分子(例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子)から独立して選択される第1および第2の結合および／または機能的特異性(例えば、部位)をそれぞれ含む。ある実施形態において、第1および第2の結合および／または機能的特異性(それぞれ結合部位1~2)は、例えば、本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分および間質調節部分である。

【0658】

ある実施形態において、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：

(a)任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域(例えば、CH3領域に連結されたCH2)(例えば、第1のFc領域)に連結される、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えば癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原に結合する、例えばFab分子の第1のVH-CH1(例えば、結合部位#1)；

(b)任意選択的にリンカーを介して、第2の免疫グロブリン定常領域(例えば、CH3領域に連結されたCH2)(例えば、第2のFc領域)に連結される間質調節部分である第2の結合および／または機能的特異性(例えば、第2の結合部位)

を有し；および

(c)第3のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：第1の抗原ドメインの第2の部分、例えば癌抗原、例えば固形腫瘍、間質または血液抗原(例えば、第1のVH-CH1、例えば、結合部位#1によって結合される同じ癌抗原)に結合する、例えばFabの第1のVL-CLを有する(例えば、この立体配置の例が図7に示される)。

【0659】

一実施形態において、任意選択的にリンカーを介して、第1のFc領域に連結される第1の結合および／または機能的特異性(結合部位#1)、および任意選択的にリンカーを介して、第2のFc領域に連結される第2の結合および／または機能的特異性(例えば、結合部位#2、例えば、本明細書に記載されるような例えば間質調節部分)に対応するFabを含む二機能性、例えば二重特異性分子である。

【0660】

ある実施形態において、第1の結合および／または機能的特異性(例えば、図17中の結合部位#1)は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；および第2の結合および／または機能的特異性(例えば、図17中の結合部位#2)は、例えば、本明細書に記載される間質調節部分である。

【0661】

実施形態において、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、第1のCH2-CH3領域）は、例えば、本明細書に記載されるような突起またはノブを含む。

【0662】

実施形態において、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、第2のCH2-CH3領域）は、空洞またはホールを含む。実施形態において、第1および第2の免疫グロブリン定常領域は、二重特異性分子のヘテロ二量体化を促進する。

【0663】

一実施形態において、多機能性分子は、2つの非隣接第1および第2のポリペプチドを含む三機能性、例えば三重特異性分子である。実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるような間質調節部分、酵素分子、抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から独立して選択される第1、第2および第3の結合および／または機能的特異性をそれぞれ含む。ある実施形態において、第1、第2および第3の結合および／または機能的特異性（それぞれ結合部位1〜3）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、間質調節部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。ある実施形態において、第1の結合および／または機能的特異性（結合部位1）は、腫瘍標的化部分であり、第2の結合および／または機能的特異性（結合部位2）は、間質調節部分であり、第3の結合および／または機能的特異性（結合部位3）は、例えば、本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、間質調節部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。

【0664】

ある実施形態において、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：

(i) 任意選択的にリンカーを介して、第2の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#3、例えば、サイトカイン、リガンドまたは第2の抗体分子、例えばscFv）に連結される、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えば癌抗原に結合する、例えばFab分子の第1のVH-CH1（例えば、結合部位#1）を有し；および

(ii) 第2のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：任意選択的にリンカーを介して、第3の結合および／または機能的特異性に連結される、第1の抗原ドメインの第2の部分、例えば腫瘍または間質抗原（例えば、第1のVH-CH1、例えば、結合部位#1によって結合される同じ腫瘍または間質抗原）に結合する、例えばFabの第1のVL-CL（例えば、結合部位#2、例えば、間質調節部分）を有する（例えば、この立体配置の例が図18に示される。

【0665】

一実施形態において、二機能性、例えば二重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、第2および第3の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#2および#3）に連結される第1の結合および／または機能的特異性（結合部位#1）に対応するFabを含む。ある実施形態において、第1の結合および／または機能的特異性（例えば、図18中の結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍、間質または血液抗原に結合し；第2の結合および／または機能的特異性（例えば、図18中の結合部位#2）は、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択され、例えば受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、scFv）から選択され；第3の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#3）は、間質調節部分である。抗体分子がscFvである実施形態において、scFvは、VH-VLまたはVL-VH立体配置で第1のポリペプチドのC末端に連結され得る。

【0666】

別の実施形態において、多機能性分子は、2つまたは少なくとも3つの非隣接第1および

第2のポリペプチドを含む三機能性、例えば三重特異性分子であり、

(i) 第1のポリペプチドは、N-からC-の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第1のFc領域）に連結される、第1の結合特異性、例えば第1の抗体分子を含み；

(ii) 第2のポリペプチドは、N-からC-の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第2のFc領域）に連結される第2の結合特異性を含み；および

(任意選択的に) (iii) 第3のポリペプチドは、第1の抗体分子または第2の抗体分子の一部を含み、

第1または第2のポリペプチドのいずれかは、第3の結合および／または機能的特異性をさらに含む。

10

【0667】

実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるような間質調節部分、酵素分子、抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から独立して選択される第1、第2、および第3の結合および／または機能的特異性（例えば、部位）をそれぞれ含む。ある実施形態において、第1、第2および第3の結合および／または機能的特異性（それぞれ結合部位1〜3）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、間質調節部分、サイトカイン分子、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。一実施形態において、第1の結合および／または機能的特異性（結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、第2の結合および／または機能的特異性（結合部位#2）は、免疫細胞エンゲージャまたはサイトカイン分子であり、第3の結合および／または機能的特異性（結合部位#3）は、例えば、図19Aまたは19Bに示されるように、間質調節部分である。

20

【0668】

ある実施形態において、第1のポリペプチドは、N-からC-に以下の立体配置：

(a) 任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第1のFc領域）に連結される、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えば腫瘍または間質抗原に結合する、例えばFab分子の第1のVH-CH1（例えば、結合部位#1）；

30

(b) 任意選択的にリンカーを介して、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第2のFc領域）に連結される、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択される第2の結合および／または機能的特異性（例えば、第2の結合部位）

を有し；および

(c) 第3のポリペプチドは、N-からC-に以下の立体配置：第1の抗原ドメインの第2の部分、例えば腫瘍または間質抗原（例えば、第1のVH-CH1、例えば、結合部位#1によって結合される同じ腫瘍または間質抗原）に結合する、例えばFabの第1のVL-CLを有し、

40

第1または第2のポリペプチドのいずれかは、任意選択的にリンカーを介して、第1または第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第1または第2のFc領域）に連結される第3の結合および／または機能的特異性をさらに含む。一実施形態において、第3の結合特異性は、任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第1のFc領域）に連結される。別の実施形態において、第3の結合特異性は、任意選択的にリンカーを介して、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第2のFc領域）に連結される。これらの立体配置の例が図19A〜19Bに示される。

【0669】

50

一実施形態において、三機能性、例えば三重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、第1のFc領域に連結される第1の結合および／または機能的特異性（結合部位#1）；および任意選択的にリンカーを介して、第2のFc領域に連結される第2の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#2）に対応するFabを含み、第3の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#3）をさらに含む（例えば、図19Aに示されるように）。他の実施形態において、三機能性、例えば三重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、第1のFc領域に連結される第1の結合および／または機能的特異性（結合部位#1）に対応するFabを含み、第3の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#3）；および任意選択的にリンカーを介して、第2のFc領域に連結される第2の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#2）をさらに含む（例えば、図19Bに示されるように）。

10

【0670】

ある実施形態において、（a）第1の結合および／または機能的特異性（例えば、図19A～19B中の結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；（b）第2の結合および／または機能的特異性（例えば、図19A～19B中の結合部位#2）は、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択され、例えば受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、scFv）から選択され；（c）第3の結合および／または機能的特異性（例えば、図19A～19B中の結合部位#3）は、間質調節部分である。抗体分子がscFvである実施形態において、scFvは、VH-VLまたはVL-VH立体配置で第1のポリペプチドのC末端に連結され得る。

20

【0671】

実施形態において、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、第1のCH2-CH3領域）は、例えば、本明細書に記載されるような突起またはノブを含む。

【0672】

実施形態において、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、第2のCH2-CH3領域）は、空洞またはホールを含む。実施形態において、第1および第2の免疫グロブリン定常領域は、二重特異性分子のヘテロ二量体化を促進する。

【0673】

別の実施形態において、多機能性分子は、2つまたは少なくとも3つの非隣接第1および第2のポリペプチドを含む四機能性、例えば四重特異性分子であり、

30

（i）第1のポリペプチドは、N-からC-の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第1のFc領域）に連結される、第1の結合および／または機能的特異性、例えば第1の抗体分子を含み；

（ii）第2のポリペプチドは、N-からC-の配向で、任意選択的にリンカーを介して、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第2のFc領域）に連結される第2の結合および／または機能的特異性を含み；および（任意選択的に）（iii）第3のポリペプチドは、第1の抗体分子または第2の抗体分子の一部を含み、

40

第1または第2のポリペプチドは、第3および第4の結合および／または機能的特異性をさらに含む。

【0674】

実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、例えば、本明細書に記載されるような間質調節部分、酵素分子、抗体分子（例えば、一本鎖抗体分子（例えば、scFv）またはFab）、受容体分子、リガンド分子（例えば、受容体リガンドまたはサイトカイン分子）から独立して選択される第1、第2、第3および第4の結合および／または機能的特異性（例えば、部位）をそれぞれ含む。ある実施形態において、第1、第2、第3および第4の結合および／または機能的特異性（それぞれ結合部位1～4）は、それぞれ独立して、例えば本明細書に記載されるような腫瘍標的化部分、間質調節部分、サイトカイ

50

ン分子、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャから選択される。

【0675】

ある実施形態において、第1のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：

(a) 任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第1のFc領域）に連結される、第1の抗原ドメインの第1の部分、例えば腫瘍または間質抗原に結合する、例えばFab分子の第1のVH-CH1（例えば、結合部位#1）；

(b) 任意選択的にリンカーを介して、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第2のFc領域）に連結される、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択される第2の結合および／または機能的特異性（例えば、第2の結合部位）

を有し；および

(c) 第3のポリペプチドは、N-から-Cに以下の立体配置：第1の抗原ドメインの第2の部分、例えば腫瘍または間質抗原（例えば、第1のVH-CH1、例えば、結合部位#1によって結合される同じ腫瘍または間質抗原）に結合する、例えばFabの第1のVL-CLを有し、

第1および第2のポリペプチドは、それぞれ第3および第4の結合および／または機能的特異性をさらに含み、これらのそれぞれは、任意選択的にリンカーを介して、第1および第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第1および第2のFc領域）に連結される。一実施形態において、第3の結合および／または機能的特異性は、任意選択的にリンカーを介して、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第2のFc領域）に連結され；第4の結合および／または機能的特異性は、任意選択的にリンカーを介して、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、CH3領域に連結されたCH2）（例えば、第1のFc領域）に連結される。これらの立体配置の例が図20に示される。

【0676】

一実施形態において、四機能性、例えば四重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、第1のFc領域に連結される第1の結合および／または機能的特異性（結合部位#1）に対応するFabを含み、第4の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#4）；および任意選択的にリンカーを介して、第2のFc領域に連結される第2の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#2）をさらに含み、第3の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#3）をさらに含む（例えば、図20に示されるように）。他の実施形態において、四機能性、例えば四重特異性分子は、任意選択的にリンカーを介して、第1のFc領域に連結される第1の結合および／または機能的特異性（結合部位#1）に対応するFabを含み、第3の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#3）；および任意選択的にリンカーを介して、第2のFc領域に連結される第2の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#2）をさらに含み、第4の結合および／または機能的特異性（例えば、結合部位#4）をさらに含む。

【0677】

ある実施形態において、(a) 第1の結合および／または機能的特異性（例えば、図20中の結合部位#1）は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍、間質または血液抗原に結合し；第2および第4の結合および／または機能的特異性（例えば、図20中の結合部位#2および4）は、それぞれ独立して、サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージャから選択され、例えば受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、scFv）から選択され；第3の結合および／または機能的特異性（例えば、図20中の結合部位#3）は、間質調節部分である。抗体分子がscFVである実施形態において、scFvは、VH-VLまたはVL-VH立体配置で第1のポリペプチドのC末端に連結され得る。

【0678】

別の実施形態において、(a) 第1の結合および／または機能的特異性は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍、間質または血液抗原に結合し；(b) 第2の結合および／または機能的特異性は、受容体、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択される免疫細胞エンゲージャ（例えば、NK細胞エンゲージャ）であり；(c) 第3の結合および／または機能的特異性は、サイトカイン分子または免疫細胞エンゲージャであり；(d) 第4の結合および／または機能的特異性は、間質調節部分である。抗体分子がs c F Vである実施形態において、s c F vは、V H－V LまたはV L－V H立体配置で第1のポリペプチドのC末端に連結され得る。

【0679】

一実施形態において、(a) 第1の結合および／または機能的特異性は、腫瘍標的化部分であり、例えば癌抗原、例えば腫瘍または間質抗原に結合し；(b) 第2の結合および／または機能的特異性は、間質調節部分であり；(c) 第3の結合および／または機能的特異性は、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択される免疫細胞エンゲージャ（例えば、マクロファージまたは樹枝状細胞エンゲージャ）であり；(d) 第4の結合および／または機能的特異性は、リガンド分子または免疫細胞抗原に結合する抗体分子（例えば、s c F v）から選択される免疫細胞エンゲージャ（例えば、マクロファージまたは樹枝状細胞エンゲージャ）である。抗体分子がs c F Vである実施形態において、s c F vは、V H－V LまたはV L－V H立体配置で第1のポリペプチドのC末端に連結され得る。

【0680】

実施形態において、第1の免疫グロブリン定常領域（例えば、第1のC H 2－C H 3領域）は、例えば、本明細書に記載されるような突起またはノブを含む。

【0681】

実施形態において、第2の免疫グロブリン定常領域（例えば、第2のC H 2－C H 3領域）は、空洞またはホールを含む。実施形態において、第1および第2の免疫グロブリン定常領域は、二重特異性分子のヘテロ二量体化を促進する。

【0682】

ある実施形態において、多機能性分子は、N末端からC末端の配向で、下式を含む：

R 1－（任意選択的にL 1）－R 2；

R 2－（任意選択的にL 1）－R 1；

(i) R 1は、1つ、2つまたはそれを超える間質調節部分、例えば本明細書に記載される同じかまたは異なる間質調節部分を含み；

(i i) R 2は、1つ、2つまたはそれを超える腫瘍標的化部分、例えば本明細書に記載される同じかまたは異なる腫瘍標的化部分を含み；および

(i i i) 任意選択的に、L 1は、リンカー（例えば、本明細書に記載されるリンカー）である。

【0683】

ある実施形態において、多機能性分子は、R 3をさらに含み、R 3は、1つ、2つまたはそれを超えるサイトカイン分子、例えば本明細書に記載されるサイトカイン分子を含む。

【0684】

ある実施形態において、多機能性分子は、R 4をさらに含み、R 4は、1つ、2つまたはそれを超える免疫細胞エンゲージャ（例えば、本明細書に記載されるNK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャ）を含む。

【0685】

ある実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるR 1、R 2、R 3、およびR 4を含む多機能性分子を記載している。

【0686】

ある実施形態において、多機能性分子は、N末端からC末端の配向で、下式を含む：

R 1－（任意選択的にL 1）－R 2－（任意選択的にL 2）－R 3／R 4；

R 1 - (任意選択的に L 1) - R 3 / R 4 - (任意選択的に L 2) - R 2 ;
 R 2 - (任意選択的に L 1) - R 1 - (任意選択的に L 2) - R 3 / R 4 ;
 R 2 - (任意選択的に L 1) - R 3 / R 4 - (任意選択的に L 2) - R 1 ;
 R 3 / R 4 - (任意選択的に L 1) - R 1 - (任意選択的に L 2) - R 2 ; または
 R 3 / R 4 - (任意選択的に L 1) - R 2 - (任意選択的に L 2) - R 1 ;

(i) R 1 は、1 つ、2 つまたはそれを超える間質調節部分（例えば、本明細書に記載される部分）（例えば、同じかまたは異なる間質調節部分）を含み；

(i i) R 2 は、1 つ、2 つまたはそれを超える腫瘍標的化部分（例えば、本明細書に記載される部分）（例えば、同じかまたは異なる腫瘍標的化部分）を含み；

(i i i) R 3 は、1 つ、2 つまたはそれを超えるサイトカイン分子、例えばサイトカイン分子（例えば、本明細書に記載されるサイトカイン分子）（例えば、同じかまたは異なるサイトカイン分子）を含み；

(i v) R 4 は、1 つ、2 つまたはそれを超える免疫細胞エンゲージャ（例えば、N K 細胞エンゲージャ、T 細胞エンゲージャ、B 細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャ（例えば、本明細書に記載される免疫細胞エンゲージャ））を含み；

R 3 および R 4 は、両方とも存在し；

R 3 は存在し、R 4 は存在せず；

R 4 は存在し、R 3 は存在せず；および

任意選択的に、L 1 および / または L 2 は、リンカー（例えば、本明細書に記載されるリンカー）である。

【 0 6 8 7 】

ある実施形態において、多機能性分子は、以下の立体配置：

(i) 任意選択的に、F a b と間質調節部分との間に、G l y - S e r リンカーを含む、N 末端から C 末端に、腫瘍または間質抗原に結合する F a b の重鎖（例えば、V H - C H 1）に連結される間質調節部分；および / または

(i i) N 末端から C 末端に、F a b の軽鎖（例えば、V L - C L 1）を有する。

【 0 6 8 8 】

他の実施形態において、メソテリンに対する F a b（例えば、V H - C H 1）は、ヒアルロニダーゼ分子またはコラゲナーゼ分子 I V に結合され、これは、例えば、F a b アミノ酸配列：

【 化 1 2 8 】

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
 YNQQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGGQTTVT
 VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHT (配列番号79)

その断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと 95 % ~ 99 . 9 % 同一であるか、または配列番号 79 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 または 15 個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列；および

例えば、以下を含むヒアルロニダーゼ分子またはコラゲナーゼ分子 I V の一方または両方：

(i) 以下のヒアルロニダーゼ分子アミノ酸配列

10

20

30

40

50

【化 1 2 9】

FRGPLLPNRPFTTVWNANTQWCLERHGVVDVSVFDDVAVANPGQTFRGPDMTIFYSSQG
 TYPYYTPTGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDILAAIPAPDFSGLAVIDWEAWRPRWAFN
 WDTKDIYRQRSRALVQAQHPDWPAPQVEAVAQDQFQGAARAWMAGTLQLGRALRPR
 GLWGFYGFPCYNYDFLSPNYTGQCPSGIRAQNDQLGWLWGQSRALYPSIYMPAVLEG
 TGKSQMYVQHRVAEAFRVAVAAGDPNLPVLPYVQIFYDTTNHFLPLDELEHSLGESAA
 QGAAGVVLWVSWENTRTKESCQAIKEYMDTTLGPFILNVTSGALLCSQALCSGHGRCV
 RRTSHPKALLLLNPASFISQLTPGGGPLSLRGALSLEDQAQMAVEFKCRCYPGWQAPWC
 ERKSMW (配列番号62)

10

、またはその断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号62のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列；または

(i i) 以下のコラゲナーゼ分子アミノ酸配列

配列番号63、またはその断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号63のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含み、任意選択的に、Fabと、ヒアルロニダーゼ分子またはコラゲナーゼ分子IVとの間にGly-Serリンカーを含む。

20

【0689】

ある実施形態において、第2のポリペプチドは、腫瘍または間質抗原に対するFabの軽鎖（例えば、VL-CL1）を含む。ある実施形態において、Fabの軽鎖は、メソテリンに結合し、例えば、アミノ酸配列：

【化 1 3 0】

DIELTQSPAISASPGKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
 RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号80)

30

、またはその断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%同一であるか、または配列番号80のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0690】

他の実施形態において、ヒアルロニダーゼ分子またはコラゲナーゼ分子IVに結合されるFAPに対するFab（例えば、VH-CH1）は、例えば、Fabアミノ酸配列：

40

【化 1 3 1】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWIGGINPNNGIPN
 YNQKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRRIA YGYDEGHAMDYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC (配列番号81)

、またはその断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと95%～99.9%

50

同一であるか、または配列番号 81 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 または 15 個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列；および
例えば、以下を含む、ヒアルロニダーゼ分子またはコラゲナーゼ分子 I V の一方または両方：

(i) 以下のヒアルロニダーゼ分子アミノ酸配列：

【化 132】

FRGPLLPNRPFTTVWNANTQWCLERHGVVDVSVFDVVANPGQTFRGPDMTIFYSSQG
TYPYYTPTGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDILAAIPAPDFSGLAVIDWEAWRPRWAFN
WDTKDIYRQRSRALVQAQHPDWPAQVEAVAQDQFQGAARAWMAGTLQLGRALRPR
GLWGFYGFPCYNYDFLSPNYTGQCPSGIRAQNDQLGWLWGQSRALYPSIYMPAVLEG
TGKSQMYVQHRVAEAFRVAVAAGDPNLPVLPYVQIFYDTTNHFLPLDELEHSLGESAA
QGAAGVVLWVSWENTRTKESCQAIKEYMDTTLGPFILNVTSGALLCSQALCSGHGRCV
RRTSHPKALLLLNPASFISQLTPGGGPLSLRGALSLEDQAQMAVEFKCRCYPGWQAPWC
ERKSMW (配列番号62)

10

、またはその断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと 95%～99.9% 同一であるか、または配列番号 62 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 または 15 個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列；または

20

(ii) 以下のコラゲナーゼ分子アミノ酸配列

配列番号 63、またはその断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと 95%～99.9% 同一であるか、または配列番号 63 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 または 15 個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含み、任意選択的に、Fab と、ヒアルロニダーゼ分子またはコラゲナーゼ I V 分子との間に Gly-Ser リンカーを含む。VH のアミノ酸配列には下線が引かれ、CH1 のアミノ酸配列は、下線なしで示される。

30

【0691】

ある実施形態において、第 2 のポリペプチドは、FAP に対する Fab の軽鎖（例えば、VL-CL1）を含む。ある実施形態において、Fab の軽鎖は、FAP に結合し、例えば、アミノ酸配列：

【化 133】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKPGQPPLKLLIFWAST
RESGVPDRFSGSGFGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYFSYPLTFGQGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号49)

40

、またはその断片またはそれと実質的に同一である（例えば、それと 95%～99.9% 同一であるか、または配列番号 49 のアミノ酸配列に対する少なくとも 1 つのアミノ酸改変であるが、5、10 または 15 個以下の改変（例えば、置換、欠失または挿入、例えば保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。VL のアミノ酸配列には下線が引かれ、CL1 のアミノ酸配列は、下線なしで示される。

【0692】

ある実施形態において、多機能性分子は、第 1 および第 2 のポリペプチドの結合を促進する第 1 および第 2 のドメイン、例えば第 1 および第 2 の免疫グロブリン鎖定常領域（例え

50

ば、第1および第2のFc領域)をさらに含む。

【0693】

ある実施形態において、(i)第1のポリペプチドは、以下の立体配置：N末端からC末端に、Fabの重鎖(例えば、VH-CH1)から第1のFc領域(例えば、CH2からCH3)を有し；(ii)第2のポリペプチドは、以下の立体配置：N末端からC末端に、Fabの軽鎖(例えば、VH-CH1)から第2のFc領域(例えば、CH2からCH3)を有する。

【0694】

ある実施形態において、第1の免疫グロブリン鎖定常領域(例えば、第1のFc領域)は、アミノ酸配列：

【化134】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列
番号82)

、その断片またはそれと実質的に同一である(例えば、それと95%~99.9%同一であるか、または配列番号82のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変(例えば、置換、欠失または挿入、例えば保守的置換)を有するアミノ酸配列を含む。

【0695】

ある実施形態において、第2の免疫グロブリン鎖定常領域(例えば、第2のFc領域)は、アミノ酸配列：

【化135】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK, (配列
番号83)

、その断片またはそれと実質的に同一である(例えば、それと95%~99.9%同一であるか、または配列番号83のアミノ酸配列に対する少なくとも1つのアミノ酸改変であるが、5、10または15個以下の改変(例えば、置換、欠失または挿入、例えば保守的置換)を有するアミノ酸配列を含む。

【0696】

ある実施形態において、多機能性分子は、少なくとも1つのサイトカイン分子(例えば、R3)および／または少なくとも1つの免疫細胞エンゲージャ(例えば、R4)(例えば、NK細胞エンゲージャ、T細胞エンゲージャ、B細胞エンゲージャ、樹枝状細胞エンゲージャまたはマクロファージ細胞エンゲージャ)をさらに含む。ある実施形態において、間質調節部分(例えば、R1)、腫瘍標的化部分(例えば、R2)、およびサイトカイン分子(例えば、R3)および／または免疫細胞エンゲージャ(例えば、R4)の一方または両方が、同じポリペプチド中にあり、例えば、例えば、N-からC-方向に、間質調節部分は、第1のポリペプチドであり、腫瘍標的化部分は、第2のポリペプチドであり、サイトカイン分子および／または免疫細胞エンゲージャの一方または両方は、任意選択的にリンカーを介して連結される。

【0697】

ある実施形態において、間質調節部分（例えば、R1）、腫瘍標的化部分（例えば、R2）、およびサイトカイン分子（例えば、R3）および／または免疫細胞エンゲージャ（例えば、R4）の一方または両方は、同じポリペプチド中にあり、例えば、例えば、N-からC-方向に、腫瘍標的化部分は、第1のポリペプチドであり、間質調節部分は、第2のポリペプチドであり、サイトカイン分子および／または免疫細胞エンゲージャの一方または両方は、任意選択的にリンカーを介して連結される。ある実施形態において、間質調節部分、腫瘍標的化部分、およびサイトカイン分子（例えば、R3）および／または免疫細胞エンゲージャ（例えば、R4）の一方または両方は、異なるポリペプチド中にあり、例えば第1および第2のポリペプチドは、共有結合されない。

10

【0698】

ある実施形態において、1) 第1のポリペプチドは、例えば、N-からC-方向に、第1の腫瘍標的化部分（例えば、R2）、間質調節部分（例えば、R1）、および任意選択的に、第1および第2のポリペプチド、例えば第1の免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、第1のFc領域）の結合を促進する第1のドメインを含み；2) 第2のポリペプチドは、例えば、N-からC-方向に、第2の腫瘍標的化部分（例えば、R2）、および任意選択的に、第1および第2のポリペプチド、例えば第2の免疫グロブリン鎖定常領域（例えば、第2のFc領域）の結合を促進する第2のドメインを含み；3) 第1のおよび／または第2のポリペプチドのいずれかまたは両方は、例えば、N-からC-方向に、サイトカイン分子（例えば、R3）および／または免疫細胞エンゲージャ（例えば、R4）をさらに含む。

20

【0699】

ある実施形態において、第1の腫瘍標的化部分は、腫瘍標的化抗体分子（例えば、Fab）の重鎖可変ドメインを含み；第2の腫瘍標的化部分は、腫瘍標的化抗体分子（例えば、Fab）の軽鎖可変ドメインを含む。ある実施形態において、第1の腫瘍標的化部分は、腫瘍標的化抗体の軽鎖可変ドメインを含み；第2のポリペプチドの腫瘍標的化部分は、腫瘍標的化抗体の重鎖可変ドメインを含む。

【0700】

ある実施形態において、多機能性分子は、a) 以下を含む第1のポリペプチド：第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子；および2つのポリペプチド（一方は腫瘍標的化部分を含み、他方は間質調節部分を含む）；b) 以下を含む第2のポリペプチド：第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子；および腫瘍標的化部分；免疫細胞エンゲージャ；およびサイトカイン分子から選択される2つのポリペプチドを含み、多機能性分子は、腫瘍標的化部分および間質調節部分；および免疫細胞エンゲージャまたはサイトカイン分子の一方または両方を含む。

30

【0701】

ある実施形態において、多機能性分子は、腫瘍標的化部分；間質調節部分；および免疫細胞エンゲージャ；腫瘍標的化部分；間質調節部分；およびサイトカイン分子；腫瘍標的化部分；間質調節部分；免疫細胞エンゲージャ；およびサイトカイン分子；腫瘍標的化部分；間質調節部分；および2つの免疫細胞エンゲージャ；腫瘍標的化部分；間質調節部分；および2つのサイトカイン分子；2つの腫瘍標的化部分；間質調節部分；および免疫細胞エンゲージャ；または腫瘍標的化部分；間質調節部分；および2つの免疫細胞エンゲージャを含む。

40

【0702】

ある実施形態において、多機能性分子は、以下を含み、i) 第1のポリペプチドは、例えば、N-CまたはC-N方向に、腫瘍標的化部分；第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子；および間質調節部分を含み；ii) 第1のポリペプチドは、例えば、N-CまたはC-N方向に、腫瘍標的化部分；第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子；およびサイトカイン分子および／または免疫細胞エンゲージャを含み；またはiii) 第1のポリペプチドは、例えば、N

50

ーCまたはCーN方向に、サイトカイン；第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子；および免疫細胞エンゲージャを含み；i v) 第2のポリペプチドは、例えば、NーCまたはCーN方向に、腫瘍標的化部分；第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子；および間質調節部分を含み；i i) 第2のポリペプチドは、例えば、NーCまたはCーN方向に、腫瘍標的化部分；第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子；およびサイトカイン分子および／または免疫細胞エンゲージャを含み；またはi i i) 第2のポリペプチドは、例えば、NーCまたはCーN方向に、サイトカイン；第1および第2のポリペプチドの結合を促進するドメイン、例えばFc分子；および間質調節部分を含む。

【0703】

ある実施形態において、腫瘍標的化部分は、メソテリンまたはFAPに対して特異的であり；間質調節部分は、ヒアルロニダーゼ分子またはコラゲナーゼIV分子、またはその断片もしくは変異体を含み；サイトカイン分子は、IL-15分子を含み；免疫細胞エンゲージャは、CD40L分子を含み；免疫細胞エンゲージャは、B7H6分子を含む。

【0704】

例示的な多重特異性および多機能性分子および対応する核酸およびアミノ酸配列

【0705】

【表2】

表1. 核酸配列

配列ID	説明	核酸配列
配列番号85	α メソテリン Ab237 VH	CAGGTCCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGACTGGTCAAGCCT AGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGGCAGCA TCAACAACAACAATTACTACTGGACATGGATCCGGCAGCACCC CGGCAAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACAGCGG CTCCACCTTCTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATC AGCGTGGACACCAGCAAGACCCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGC AGCGTGACAGCCGCCGACACAGCCGTGTACTACTGCGCCAGA GAAGATACCATGACCGGCCTGGATGTGTGGGGCCAGGGCACC ACAGTGACAGTGTCTAGC
配列番号86	α メソテリン Ab237 VL	GATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGC GTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGAGC ATCAACAACCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAAGCCCGCAAG GCCCCCTACCCTGCTGATCTATGCCGCTTCTAGCCTGCAGAGCG GCGTGCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCAGATCCGGCACCGACTT CACCTTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGCC TACTTCTGCCAGCAGACCTACAGCAATCCCACCTTCGGCCAGG GCACCAAGGTGGAAGTGAAG

【0706】

【表 3】

配列番号87	ヒトIL2	GCCCCTACCAGCAGCAGCACCAAGAAAACCCAGCTCCAGCTC GAGCACCTCCTGCTGGACCTGCAGATGATCCTGAACGGCATCA ACAACTACAAGAACCCCAAGCTGACCCGGATGCTGACCTTCA AGTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCACCTCC AGTGCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCCTGGAAGAAGTGCTGA ACCTGGCCCAGAGCAAGAAGCTTCCACCTGAGGCCAGGGACC TGATCAGCAACATCAACGTGATCGTGCTGGAAGTGAAGGCCA GCGAGACAACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACAGCCA CCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACCTTCTGCCAGAG CATCATCAGCACCCTGACA
配列番号88	2x4GSリンカー	GGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGCAGC
配列番号89	ヒトCH2、 CH3ノブ	GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCCCCTGAGCTGC TGGGCGGACCTAGCGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGA CACCTTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGCTG GTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA GAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGC TGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAGAA AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAACCTCAGGT GTACACACTGCCTCCCTGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGAT ATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCT TCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGC AGGGCAATGTGTTTCAGCTGTAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCA CAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCCCGGCAA GTAATGA
配列番号90	ヒトCH2、 CH3ホール	GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCCCCTGAGCTGC TGGGCGGACCTAGCGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGA CACCTTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGCTG GTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCA GAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGC TGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAGAA AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCTCAGGT CTGCACCCCTGCCTCCCAGCCGGAAGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGTCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGAT ATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCT TCCTGGTGTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGC AGGGCAATGTGTTTCAGCTGTAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCA CAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCCCGGCAA GTAATGA
配列番号91	CH1	GCCAGCACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTAGCT CTAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGATTACTTTCTGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAAGTCT GGTGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGC AGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCTAGCGTGGTCACAGTGCC

10

20

30

40

【 0 7 0 7 】

50

【表 4】

		TAGCAGCAGCCTGGGCACACAGACCTACATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAACC CAAGAGCTGC
配列番号92	CL(κ)	AGAACAGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAGCG ACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCAGCGTCGTGTGCCTGCT GAACAACCTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGT GGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCAC CGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGTCCAGCAC CCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTA CGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGAC CAAGAGCTTCAATAGAGGCGAGTGCTAATGA
配列番号93	CL(λ)	GGCCAGCCCAAGGCCAACCCACCGTGACCCTGTTCCCTCCAT CCTCCGAGGAACTGCAGGCTAACAAGGCCACCCTCGTGTGCCT GATCTCCGACTTCTACCCTGGCGCCGTGACCGTGCGTTGGAAG GCTGATGGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAACCACCAAG CCCTCCAAGCAGTCCAACAACAAATACGCCGCCTCCAGTACC TGTCCCTGACCCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACCGTCTCTACAG CTGCCAGGTCACACATGAGGGCTCCACCGTGGAAAAGACCGT GGCCCTACCGAGTGCTCCTAATGA
配列番号94	α PD1L1 アベルマブVH	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCT GGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTCACCTT CTCCAGCTATATCATGATGTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAG GGCCTGGAATGGGTGTCTCTATCTACCCCTCCGGCGGCATCA CCTTTTACGCCGACACCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCG GGACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTG CGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAATCAAG CTGGGCACCGTGACCACCGTGGACTATTGGGGCCAGGGCACC CTGGTCACCGTGTCTCT
配列番号95	α PD1L1 アベルマブVL	CAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCTGTGTCTGGCTCCCCTGG CCAGTCCATCACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTCCGACGTG GGCGGCTACAACCTACGTGTCTTGGTATCAGCAGCATCCCGGCA AGGCCCTAAGCTGATGATCTACGACGTGTCCAACCGGCCCTC CGGCGTGTCCAATCGGTCTCTTGGCTCCAAGTCCGGCAACACC GCCTCCCTGACAATCAGCGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCC GACTACTACTGCTCCTCCTACACCTCCAGCTCTACCCGGGTGTT CGGCACCGGCACCAAAGTGACAGTGCTG
配列番号96	3x4GSリンカー	GGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGAGGCGGTGG ATCT
配列番号97	α NKp46 VH	CAGGTTCAAGTTGCAGCAGTCCGGACCTGAGCTGGTTAAGCCTG GCGCTTCCGTGAAGATGTCTTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTT CACCGACTACGTGATCAACTGGGGCAAGCAGAGATCTGGCCA GGGACTCGAGTGGATCGGCGAGATCTATCCTGGCTCCGGCACC AATTACTACAACGAGAAGTTCAAGGCTAAGGCTACCCTGACC GCCGACAAGTCTCCAATATCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCC TGACCTCTGAGGACTCCGCTGTGTACTTCTGCGCTCGGAGAGG CAGATACGGCCTGTATGCCATGGATTACTGGGGACAGGGAAC CAGTGTGACAGTGTCAGT
配列番号98	α NKp46 VL	GATATTCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGTCCGCTTCTC

10

20

30

40

【 0 7 0 8 】

50

【表 5】

		TGGGCGACAGAGTGACAATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACA TCAGCAACTACCTGAACCTGGTATCAACAGAAACCCGACGGCA CCGTGAAGCTGCTGATCTACTACACCTCTCGGCTGCACCTCTGG CGTGCCCTCTAGATTTTCTGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTAT TCCCTGACCATCAACAACCTGGAACAAGAGGATATCGCTACCT ACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCGGCCTTGGACATTTGGCGG CGGAACAAAGCTGGAAATCAAGTGATGA
配列番号99	4x 4GSリンカー	GGTGGCGGAGGAAGCGGCGGAGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGT TCTGGTGGCGGTGGCTCC
配列番号100	α メソテリン M912 VH	CAGGTCCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCCT CCGAGACACTGTCTCTGACCTGCACCGTGTCCGGCGGCTCTGT GTCCTCCGGCTCCTACTACTGGTCCTGGATCCGGCAGCCTCCA GGCAAGGGACTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGC AGCACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCT CCGTGGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCCTC CGTGACCGCCGCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGAG GGCAAGAACGGCGCCTTCGATATCTGGGGCCAGGGCACCATG GTCACCGTGTCTAGC
配列番号101	α メソテリン M912 VL	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCCTCTG TGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCTCCAGTCCAT CTCCTCCTACCTGAACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGAAGGCC CCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCCAGTCTGCAGTCTGGCG TGCCATCTGGCTTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTCACC CTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACT ACTGCCAGCAGTCCTACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCGGAGG CACCAAGGTGGAAATCAAG
配列番号102	1x4GS	GGCGGCGGAGGCTCC
配列番号103	α NKp30	BioLegend カタログ #325207に対応するDNA配列
配列番号104	ヒトIL7	GACTGTGACATCGAAGGCAAGGACGGCAAGCAGTACGAGAGC GTGCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCATGAAGG AAATCGGCTCCAACCTGCCTGAACAACGAGTTCAACTTCTCAA GCGGCACATCTGCGACGCCAACAAAGAAGGCATGTTCCCTGTTT AGAGCCGCCAGAAAGCTGCGGCAGTTCTTGAAGATGAACTCC ACCGGCGACTTCGACCTGCATCTGCTGAAAGTGTCTGAGGGCA CCACCATCCTGCTGAACTGTACCGGCCAAGTGAAGGGCAGAA AGCCTGCTGCTCTGGGCGAAGCCCAGCCTACCAAGTCTCTGGA AGAGAACAAGAGCCTGAAAGAGCAGAAGAAGCTGAACGACC TCTGCTTCTTGAAGCGGCTGCTGCAAGAGATCAAGACCTGCTG GAACAAGATTCTGATGGGGACCAAGAGCAC
配列番号105	α IGF1R重鎖	GAAGTGCAGCTGTTGCAGTCTGGCGGAGGATTGGTTTCAGCCTG GCGGATCCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCTGGCTTCATGTTT AGCAGATACCCCATGCACTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGAAAA GGACTGGAATGGGTCCGATCCATCTCCGGAAGTGGCGGCGCT ACCCCTTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCC GGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCT

10

20

30

40

【 0 7 0 9 】

【表 6】

		GAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGACTT CTACCAGATCCTGACCGGCAACGCCCTTCGACTATTGGGGCCAG GGCACAACCGTGACCGTGTCTCT
配列番号106	αIGF1R軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCTGCCAGCC TGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCTCTCAGGGCAT CTCCTCCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCT CCCAAGCTGCTGATCTACGCCAAGAGCACACTGCAGTCTGGCG TGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACC CTGACAATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTCCGCCACCTACT ACTGTCAGCAGTACTGGACCTTTCCACTGACCTTCGGCGGAGG CACCAAGGTGGAAATCAAG
配列番号107	αHER3重鎖	CAGGTGCAGCTGGTTTCAGTCTGGCGGAGGATTGGTTCAGCCAG GCGGATCCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTTACCTTC GACGACTACGCTATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAA GGATTGGAATGGGTGGCCGGCATCTCTTGGGACTCTGGCTCTA CCGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCTCTCG GGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCT GAGAGCCGAGGACACCGCTCTGTACTACTGCGCTAGAGATCTG GGCGCTACCAGTGGGTGGAAGGCTTTGATTATTGGGGCCAGG GCACCCTGGTCAACCGTGTCTAGT
配列番号108	αHER3軽鎖	TCTTACGAGCTGACCCAGGATCCAGCCGTGTCTGTTGCTCTGG GCCAGACAGTGCGGATTACCTGCCAGGGCGACTCCCTGAGATC CTACTACGCCTCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCT GTGCTGGTTCATCTACGGCAAGAACAACCGGCCTAGCGGCATCC CTGACAGATTCTCCGGCTCTACCTCCGGCAACTCTGCCAGCCT GACAATTACTGGCGCCCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTA CTGCAACTCCAGAGACAGCCCTGGCAATCAGTGGGTTTTCGGC GGAGGCACCAAAGTGACAGTTCTTGGT
配列番号109	αCD3重鎖	CAAGTTCAGTTGGTTCAAAGCGGTGGCGGCGTGGTGCAGCCTG GAAGATCTCTCAGACTGTCTTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTT CACCAGATACACCATGCATTGGGTTTCGACAAGCACCAGGCAA GGGCCTCGAGTGGATCGGCTACATCAACCCCTTCCAGAGGCTAC ACCAACTACAACCAGAAAGTGAAGGACCGGTTACCATCAGC AGAGACAACAGCAAGAATACCGCCTTTCTGCAGATGGACTCC CTGCGGCCTGAAGATACCGGCGTGTACTTTTGCGCCCGGTA CTACGACGACCACTACTCCCTGGATTACTGGGGACAGGGAACAC CCGTGACAGTGTCTAGC
配列番号110	αCD3軽鎖	GATATTCAGATGACCCAGTCTCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCTGT GGGCGACAGAGTGACTATTACCTGCTCCGCCTCTTCTCCGTG TCCTACATGAACTGGTATCAACAAACACCCGGCAAGGCCCTA AGAGATGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCTCTGGCGTGC CCTCTAGATTTTCTGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTATACCTTT ACAATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGATATCGCCACCTACTACT GTCAGCAGTGGTCTAGCAACCCCTTACCTTTGGACAGGGCAC CAAGCTGCAGATCACCTGATGA
配列番号111	ヒトIL2 F42A Y45A	GCTCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAACCCAGCTGCAGTTGG AGCATCTGCTGCTGGACCTCCAGATGATCCTGAATGGCATCAA CAATTACAAGAACCCCAAGCTCACCCGGATGCTGACCGCCAA GTTTGCCATGCCTAAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAG TGCTTGGAAGAGGAACTGAAGCCCCTGGAAGAAGTGTGAAT CTGGCCCAGTCCAAGAACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTGA TCTCCAACATCAACGTGATCGTGTGCTCGAGCTGAAGGGCTCCGA GACAACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACAGCTACCATC

10

20

30

40

【0710】

50

【表 7】

		GTGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACCTTCTGTCAGTCCATCA TCAGCACCTGACC	
配列番号112	α NKp46 2 重鎖	GAAGTGCAGCTCCAAGAATCTGGACCCGGGCTCGTGAAGCCC AGCCAGTCTCTGAGTCTGACCTGTACAGTGACCGGCTACTCCA TCACCTCCGACTACGCTTGGAACCTGGATCCGGCAGTTCCTCCG CAACAAGTTGGAGTGGATGGGCTATATCACCTACAGCGGCAG CACCTCTTACAACCCTTCTCTGGAATCCCGGATCAGCATCACC CGGGACACCTCTACCAATCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGCG TGACCACCGAGGACACCGCCACCTACTATTGTGCTAGAGGCGG CTACTACGGCTCCTCCTGGGGAGTGTGTTGCTTACTGGGGACAG GGAACCCCTCGTGACTGTTTCTGCT	10
配列番号113	α NKp46 2 軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCAGCCTGTCTGCTTCTG TGGGCGAGACAGTGACCATTACCTGCCGGGTGTCCGAGAACA TCTACTCCTACCTGGCCTGGTATCAACAGAAACAGGGCAAGTC CCCTCAGCTGCTGGTGTACAATGCTAAGACCCTGGCTGAGGGC GTGCCCTCTAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCCAGTTTA GCCTGAAGATCAACTCCCTGCAGCCTGAGGACTTCGGCAGCTA CTACTGCCAGCACCCTATGGCACCCCTTGACATTTGGCGGA GGCACCAAGCTGGAAATCAAG	
配列番号114	α NKp46 4 重鎖	CAGGTTCAAGTTCAGCAGTCTGCCGTGGAACCTGGCTAGACCTG GCGCTTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTT CACCAGCTTCACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACA AGGCTTGGAGTGGATTGGATATATCAACCCTAGCTCTGGCTAC ACCGAGTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGACCACTCTGACC GCCGACAAGTCCTCCAGCACCGCTTACATGCAGCTCGACTCCC TGACCTCTGACGACTCTGCTGTGTACTATTGCGTGCGGGGCTC CTCCAGAGGCTTCGATTATTGGGGACAAGGCACACTCGTGACA GTGTCAGCT	20
配列番号115	α NKp46 4 軽鎖	GATATCCAGATGATCCAGTCTCCTGCCAGCCTGTCCGTGTCTG TGGGAGAGACTGTGACCATCACCTGTCCGGCCTCCGAGAACAT CTACTCCAACCTGGCCTGGTTCCAGCAGAAGCAGGGAAAGTCT CCTCAGCTGCTGGTGTACGCCGCCACCAATTTGGCTGATGGCG TGCCCTCTCGGTTCTCCGGATCTGGATCTGGCACACAGTATTCC CTGAAGATCAACTCCCTGCAGTCCGAGGACTTCGGCATCTACT ATTGCCAGCACTTCTGGGGCACCCCTAGAACCTTTGGCGGCGG AACAAAGCTGGAAATCAAG	30

【0 7 1 1】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 2. ORFS を構築するのに使用される配列

構築物 配列番号	N 末端	リンカー	可変	定常	Fc	リンカー	C 末端
配列番号 116			配列番号 85	配列番号 91	配列番号 89		
配列番号 117			配列番号 85	配列番号 91	配列番号 89	配列番号 96	配列番号 103
配列番号 118			配列番号 86	配列番号 92			
配列番号 119	配列番号 87	配列番号 88			配列番号 90		
配列番号 120			配列番号 94	配列番号 91	配列番号 90	配列番号 96	配列番号 87
配列番号 121			配列番号 95	配列番号 93			
配列番号 122			配列番号 100	配列番号 91	配列番号 89		
配列番号 123			配列番号 101	配列番号 92			
配列番号 124					配列番号 89		
配列番号 125					配列番号 90		
配列番号 126			配列番号 105	配列番号 91	配列番号 90		
配列番号 127			配列番号 106	配列番号 92			
配列番号 128			配列番号 105	配列番号 91	配列番号 90	配列番号 96	配列番号 81
配列番号 129			配列番号 105	配列番号 91	配列番号 90	配列番号 96	配列番号 104
配列番号 130	配列番号 107	配列番号 99	配列番号 108	配列番号 88	配列番号 89		
配列番号 131	配列番号 107	配列番号 99	配列番号 108	配列番号 88	配列番号 89	配列番号 96	配列番号 97、98、 994
配列番号 132	配列番号 107	配列番号 99	配列番号 108	配列番号 88	配列番号 89	配列番号 96	配列番号 108、99、 110
配列番号 133			配列番号 85	配列番号 91	配列番号 89	配列番号 96	配列番号 97、98、99
配列番号 134			配列番号 91	配列番号 93		配列番号 96	配列番号 111
配列番号 135			配列番号 94	配列番号 91	配列番号 90		
配列番号 136			配列番号 100	配列番号 91	配列番号 89	配列番号 96	配列番号 97、98、99
配列番号 137			配列番号 100	配列番号 91	配列番号 89	配列番号 96	配列番号 28、15、29
配列番号 138			配列番号 100	配列番号 91	配列番号 89	配列番号 96	配列番号 114、99、 115

【0712】

10

20

30

40

50

【表 9】

表3. ORFの核酸配列

配列ID	核酸配列
配列番号116	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCC AGGATCTACAGGCGCCCTACCAGCAGCAGCACCAAGAAAACCCAG CTCCAGCTCGAGCACCTCCTGCTGGACCTGCAGATGATCCTGAACGG CATCAACAACCTACAAGAACCCCAAGCTGACCCGGATGCTGACCTTC AAGTTCTACATGCCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCACCTCCAGT GCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCTGGAAGAAGTGCTGAACCTGGC CCAGAGCAAGAACCTCCACCTGAGGCCCAGGGACCTGATCAGCAAC ATCAACGTGATCGTGCTGGAAGTGAAGGCAGCGAGACAACCTTCA TGTGCGAGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCGTGGAATTTCTGAA CCGGTGGATCACCTTCTGCCAGAGCATCATCAGCACCTGACAGGCG GCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGCAGCGATAAGACCCACACCTGTCC TCCATGTCCCGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGT TCCCTCCAAAGCCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCTGA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTG AAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGA CCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTG CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAAGAGTAC AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCTCAGGTCTGCAC CCTGCCTCCAGCCGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG AGCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATTACAAGACCACCCCTCCC GTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGGTGTCCAACTGACCGT GGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTCAGCTGTAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCT GAGCCCCGCAAGTAATGA
配列番号119	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCC AGGATCTACAGGCGCCCTACCAGCAGCAGCACCAAGAAAACCCAG CTCCAGCTCGAGCACCTCCTGCTGGACCTGCAGATGATCCTGAACGG CATCAACAACCTACAAGAACCCCAAGCTGACCCGGATGCTGACCTTC AAGTTCTACATGCCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAGCACCTCCAGT GCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCTGGAAGAAGTGCTGAACCTGGC CCAGAGCAAGAACCTCCACCTGAGGCCCAGGGACCTGATCAGCAAC ATCAACGTGATCGTGCTGGAAGTGAAGGCAGCGAGACAACCTTCA TGTGCGAGTACGCCGACGAGACAGCCACCATCGTGGAATTTCTGAA CCGGTGGATCACCTTCTGCCAGAGCATCATCAGCACCTGACAGGCG GCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGCAGCGATAAGACCCACACCTGTCC TCCATGTCCCGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGT TCCCTCCAAAGCCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCTGA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTG AAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGA CCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTG CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAAGAGTAC AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCTATCGAGAAAA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAGCCTCAGGTCTGCAC CCTGCCTCCAGCCGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG AGCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATG GGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATTACAAGACCACCCCTCCC GTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGGTGTCCAACTGACCGT GGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTCAGCTGTAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCT GAGCCCCGCAAGTAATGA
配列番号117	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCC AGGATCTACAGGCCAGGTCCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGACTG

10

20

30

40

【 0 7 1 3 】

【表 10】

	GTCAAGCCTAGCCAGACCCTGAGCCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGG CAGCATCAACAACAACAATTACTACTGGACATGGATCCGGCAGCAC CCCGGCAAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACAGCGGCT CCACCTTCTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCAGCGTG GACACCAGCAAGACCCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACAG CCGCCGACACAGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGATACCATGAC CGCCTGGATGTGTGGGGCCAGGGCACACAGTGACAGTGTCTAGC GCCAGCACCAGGGGCCCTAGCGTGTTCCTCTGGCCCCTAGCTCTAA GAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAT TACTTTCTGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACCTCTGGTGTCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGT ACAGCCTGTCTAGCGTGGTGCAGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCAC ACAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGCGGGTGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCT GTCTCCCTGTCTGCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTCC TGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCT GAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAG TGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAA GACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTG TCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCTATCGAGAA AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGAACCTCAGGTGTAC ACACTGCCTCCCTGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGTGGTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGA TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTC CCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAACTGACC GTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTAGCTGTAGCG TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCC CTGAGCCCTGGAAAGGTGGCGGAGGAAGCGGAGGCGGAGGTTCTG GCGGCGGAGGATCT + BioLegend カタログ #325207 のDNA配列	10
配列番号125	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCC AGGCAGCACCGGCGATAAGACCCACACCTGTCTCCATGTCTGCCC CTGAGCTGCTGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCTCCAAAGCCC AAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGG TGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG GAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCA AGGGCCAGCCTAGAGAGCCTCAGGTCTGCACCCTGCCTCCCAGCCG GGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCTGCGCCGTGAAG GGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCC AGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCCGTGTGGACAGCGA CGGCAGCTTCTTCTGGTGTCCAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGT GGCAGCAGGGCAATGTGTTAGCTGTAGCGTGATGCACGAGGCCCT GCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG TAATGA	20
配列番号124	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCC AGGCAGCACCGGCGATAAGACCCACACCTGTCTCCATGTCTGCCC CTGAGCTGCTGGGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCTCCAAAGCCC AAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGG TGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTAC GTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAG GAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCT	30
		40

【0714】

【表 1 1】

	GCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCA AGGGCCAGCCCCGCGAACCTCAGGTGTACACACTGCCTCCCTGCCG GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGG GCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCA GCCCCGAGAACAACATAAGACCACCCCTCCCGTGTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTG GCAGCAGGGCAATGTGTTTACGCTGTAGCGTGATGCACGAGGCCCTG CACAACCCTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAGT AATGA
配列番号126	ATGGA AACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGCGAAGTGCAGCTGTTGCAGTCTGGCGGAGGATTG GTTTACGCTGGCGGATCCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCTGGCTT CATGTTTACGAGATAACCCATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGAA AAGGACTGGAATGGGTCCGATCCATCTCCGGAAGTGGCGGCGCTAC CCCTTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACA ACTCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGACTTCTACCAGATCCGGA CCGGCAACGCCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGT GTCCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTCCCTCTGGCTCCTTC CAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGGAACTCTGGCGCT CTGACATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCAGCGG CCTGTACTCTCTGTCTCCGTGCTGACAGTGCCTTCCAGCTCTCTGGG AACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCA AGGTGGACAAGAGAGTGAACCCAAGTCTGCGACAAGACCCACAC CTGTCTCCATGTCTGTCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTT CCTGTTTCTCTCAAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCTCTCGGACCC CTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCGAA GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGT GTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAA GACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAACCTCAAGTCTGT ACCCTGCCTCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGTCTGTGCCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACATAAAGACAACCCCTC CTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTTCTGGTGTCCAAGCTGACA GTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCTCCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTC TGAGCCCCGGCAAGTGATGA
配列番号127	ATGGA AACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACCGGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGT CTGCCAGCCTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAGAGCCTCTCAG GGCATCTCCTCCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGC TCCCAAGCTGCTGATCTACGCCAAGAGCACACTGCAGTCTGGCGTGC CCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACA ATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTCCGCCACCTACTACTGTTCAGCA GTACTGGACCTTTCCACTGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAA ATCAAGAGAACCGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTATCTTCCACCTTCC GACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCTGTGCTGCTGAA CAACTTCTACCCCTCGGGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAAGGTGGACAAC GCTCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACTC CAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCTCCACACTGACCTGTCCAAGG

10

20

30

40

【0 7 1 5】

【表 1 2】

	CCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCATCA GGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGCT GATGA
配列番号128	ATGGA AACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGCGAAGTGCAGCTGTTGCAGTCTGGCGGAGGATTG GTTACAGCCTGGCGGATCCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCCTCTGGCTT CATGTTACAGCAGATAACCCATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGAA AAGGACTGGAATGGGTTCGGATCCATCTCCGGAAGTGGCGGCGCTAC CCCTTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACA ACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGACTTCTACCAGATCCTGA CCGGCAACGCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGT GTCCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTCCCTCTGGCTCCTTC CAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTTCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCT CTGACATCCGGCGTGCACACCTTTCAGCTGTGCTGCAATCCAGCGG CCTGTACTCTCTGCTCCTCCGTCGTGACAGTGCTTCCAGCTCTCTGGG AACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCA AGGTGGACAAGAGAGTGGAAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACAC CTGTCTCCATGTCTCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTT CCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCC CTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCGAA GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCA AGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGT GTCCGTGCTGACCGTGTGCACACAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCTGCTCTATCGAAAA GACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAACCTCAAGTCTGT ACCCTGCCTCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGTCCTGTGCCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTC CTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTTCTGGTGTCCAAGCTGACA GTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTCTCTCTGCTCCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTC TGAGCCCTGGCAAAGGCGGAGGCGGATCTGGTGGTGGCGGTCTGG CGGCGGTGGATCTGCTCCTACATCCTCCAGCACCAAGAAAACCCAGC TGCAGTTGGAGCATCTGCTGCTGGACCTCCAGATGATCTGAATTGGC ATCAACAATTACAAGAACCCCAAGCTCACCCGGATGTGACCTTCAA GTTCTACATGCCCAAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGC CTGGAAGAGGAACTGAAGCCTCTGGAAGAAGTGTGAATCTGGCCC AGTCCAAGAACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTGATCTCCAACATC AACGTGATCGTGCTCGAGCTGAAGGGCTCCGAGACTACCTTCATGTG CGAGTACGCCGACGAGACAGCTACCATCGTGGAATTTCTGAACCGG TGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCATCAGCACCCCTGACCTGATGA
配列番号129	ATGGA AACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGCGAAGTGCAGCTGTTGCAGTCTGGCGGAGGATTG GTTACAGCCTGGCGGATCCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCCTCTGGCTT CATGTTACAGCAGATAACCCATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGAA AAGGACTGGAATGGGTTCGGATCCATCTCCGGAAGTGGCGGCGCTAC CCCTTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACA ACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGACTTCTACCAGATCCTGA CCGGCAACGCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACAACCGTGACCGT GTCCTCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTCCCTCTGGCTCCTTC CAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCA

10

20

30

40

【0 7 1 6】

50

【表 1 3】

	AGGACTACTTTCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCT CTGACATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCAGCGG CCTGTACTCTCTGTCTCCGTCTGTGACAGTGCCTTCCAGCTCTCTGGG AACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCA AGGTGGACAAGAGAGTGGAAACCAAGTCTGCGACAAGACCCACAC CTGTCTCCATGTCTGTCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTT CCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCTCTCGGACCC CTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCCAA GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCA AGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGT GTCCGTGCTGACCGTGTGACACAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAG TACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAA GACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAACCTCAAGTCTGT ACCTTGCCTCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGTCTGTGCCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTC CTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGCTGTCCAAGCTGACA GTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTC TGAGCCCTGGCAAAGGCGGAGGCGGATCTGGTGGTGGCGGTTCTGG CGGCGGTGGATCTGACTGTGATATCGAAGGCAAGGACGGCAAGCAG TACGAGTCCGTCTGATGGTGTCCATCGACCAGCTGCTGGACAGCAT GAAGGAAATCGGCTCCAACCTGCCTGAACAACGAGTTCAACTTCTTCA AGCGGCACATCTGCGACGCCAACAAAGAAGGCATGTTTCTGTTCCG GGCTGCCAGAAAGCTGCGGCAGTTCTGAAGATGAACAGCACCAGGC GACTTCGACCTGCACCTGTTGAAAGTGTCTGAGGGCACCACCATCCT GCTGAACTGTACCGGCCAAGTGAAGGGAAGAAAGCCTGCCGCTCTG GGCGAAGCCCAGCCTACAAAGTCTCTGGAAGAGAACAAGTCCCTGA AAGAGCAGAAGAAGCTGAACGACCTCTGTTCTTCTGAAGCGGCTGCT GCAAGAGATCAAGACCTGCTGGAACAAGATCCTGATGGGCACCAAA GAGCACTGATAG	10
配列番号130	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGACAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGGAGGATTG GTTACAGCCAGGCGGATCCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTT CACCTTCGACGACTACGCTATGCACTGGGTCCGACAGCCCTGGCA AAGGATTGGAATGGGTGGCCGGCATCTCTTGGGACTCTGGCTCTACC GGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCTCTCGGGACAA CGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCTCTGTACTACTGCGCTAGAGATCTGGGCGCCTACCAAGT GGTGGAAAGGCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTGT CTAGTGCTTCTACTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGG AGGCGGAGGTAGTGGTGGCGGTGGATCTTCTTACGAGCTGACCCAG GATCCAGCCGTGTCTGTTGCTCTGGGCCAGACAGTGGGATTACCTG CCAGGGCGACTCCCTGAGATCCTACTACGCCTCCTGGTATCAGCAGA AGCCAGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTCACTACGGCAAGAACAACCG GCCTAGCGGCATCCCTGACAGATTCTCCGGCTCTACCTCCGGCAACT CTGCCAGCCTGACAATTACTGGCGCCCAGGCTGAGGACGAGGCCGA CTACTACTGCAACTCCAGAGACAGCCCTGGCAATCAGTGGGTTTTTCG GCGGAGGCACCAAAGTGACAGTTCTTGGTGGCGGAGGTGGAAGTGG CGGAGGCGGTCTGATAAGACCCACACCTGTCCACCTTGTCTGCTC CAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTCTTCTCAAAGCCT AAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACG TGGACGGCGTGGAAGTGACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGA ACAGTACAACCTCCACCTATAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGC	30
		40

【0 7 1 7】

【表 1 4】

	ACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAA CAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAG GGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCCTGCCCTCCATGCCGGGA AGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGC TTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCC AGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGACTCCGACGGC TCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCA GCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA ATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCAAGTGATGA
配列番号131	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGACAGGTGCAGCTGGTTCACTGCTGGCGGAGGATTG GTTTCAGCCAGGCGGATCCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTT CACCTTCGACGACTACGCTATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCA AAGGATTGGAATGGGTGGCCGGCATCTCTTGGGACTCTGGCTCTACC GGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCTCTCGGGACAA CGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCTCTGTACTACTGCGCTAGAGATCTGGGCGCCTACCAAGT GGTGGAAGGCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACCGTGT CTAGTGCTTCTACTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGG AGGCGGAGGTAGTGGTGGCGGTGGATCTTCTTACGAGCTGACCCAG GATCCAGCCGTGTCTGTTGCTCTGGGCCAGACAGTGCAGATTACCTG CCAGGGCGACTCCCTGAGATCCTACTACGCCTCCTGGTATCAGCAGA AGCCAGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTCATCTACGGCAAGAACAACCG GCCTAGCGGCATCCCTGACAGATTCTCCGGCTCTACCTCCGGCAACT CTGCCAGCCTGACAATTACTGGCGCCAGGCTGAGGACGAGGCCGA CTACTACTGCAACTCCAGAGACAGCCCTGGCAATCAGTGGGTTTTTCG GCGGAGGCACCAAAGTGACAGTTCTTGGTGGCGGAGGTGGAAGTGG CGGAGGCGGTTCTGATAAGACCCACACCTGTCCACCTTGTCTGCTC CAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCCCTCCAAAGCCT AAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTTCTACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACG TGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGA ACAGTACAACCTACCTATAGAGTGGTGTCCGTGCTACCGTGGACGGC ACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAA CAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAG GGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCCTGCCTCCATGCCGGGA AGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGC TTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCC AGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGACTCCGACGGC TCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCA GCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA ATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCTCCCGAAAAGGCGGT GGTGGATCAGGTGGCGGAGGCTCAGGCGGAGGCGGATCTCAAGTTC AGTTGCAGCAGAGCGGACCCGAGCTGGTCAAACCTGGCGCTTCCGT GAAGATGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCGATTACGTGA TCAACTGGGGCAAGCAGCGCTCTGGCCAAGGCCTGGAATGGATCGG CGAGATCTATCTGGCTCCGGCACCAACTACTACAACGAGAAGTTCA AGGCTAAGGCTACCCTGACCGCCGACAAGTCTCCAATATCGCCTAC ATGCAGCTGTCTAGCCTGACCTCCGAGGACTCTGCCGTGTACTTCTG CGCCAGAAGAGGCAGATACGGCCTGTACGCCATGGACTACTGGGGA CAGGGAACCTCCGTGACAGTTAGTAGCGGTGGCGGCGGATAGCGGCG GTGGTGGTTCTGGCGGTGGTGGTAGTGGCGGCGGAGGATCTGATATC CAGATGACCCAGACCACCAGCAGCCTGTCTGCTTCCCTGGGCGATAG AGTGACCATCTCTTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTG AACTGGTATCAACAAAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCT

10

20

30

40

【0 7 1 8】

【表 15】

	ACTACACCTCTCGGCTGCACTCTGGCGTGCCCTCTAGATTTTCTGGCA GCGGCTCTGGAACCGACTACTCCCTGACCATCAACAACCTGGAACA AGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACACCCGGCCTT GGACATTTGGAGGCGGCACCAAGCTGGAATCAAGTGATGA
配列番号132	ATGGAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGACAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGGAGGATTG GTTTCAGCCAGGCGGATCCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTT CACCTTCGACGACTACGCTATGCACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCA AAGGATTGGAATGGGTGGCCGGCATCTCTTGGGACTCTGGCTCTACC GGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCTCTCGGGACAA CGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACCGCTCTGTACTACTGCGCTAGAGATCTGGGCGCCTACCAAGTG GGTGGAAGGCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGT CTAGTGCTTCTACTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGG AGGCGGAGGTAGTGGTGGCGGTGGATCTTCTTACGAGCTGACCCAG GATCCAGCCGTGTCTGTGCTCTGGGCCAGACAGTGCAGGATTACCTG CCAGGGCGACTCCCTGAGATCCTACTACGCCTCCTGGTATCAGCAGA AGCCAGGCCAGGCTCCTGTGCTGGTCACTACGGCAAGAACAACCG GCCTAGCGGCATCCCTGACAGATTCTCCGGCTCTACCTCCGGCAACT CTGCCAGCCTGACAATTACTGGCGCCCAGGCTGAGGACGAGGCCGA CTACTACTGCAACTCCAGAGACAGCCCTGGCAATCAGTGGGTTTTCTG GCGGAGGCACCAAAGTGACAGTTCTTGGTGGCGGAGGTGGAAGTGG CGGAGGCGGTTCTGATAAGACCCACACCTGTCCACCTGTCTCTGCTC CAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCT AAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGT GGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACG TGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGA ACAGTACAACCTCCACCTATAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGC ACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAA CAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAG GGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCCTGCCTCCATGCCGGGA AGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGC TTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCC AGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGACTCCGACGGC TCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCA GCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA ATCACTACACCCAGAAAGTCCCTGTCTGTCTCCCGGAAAAGGCGGT GGTGGATCAGGTGGCGGAGGCTCAGGCGGAGGCGGATCTCAAGTTC AGTTGGTTCAAAGCGGTGGCGGCGTGGTGCAGCCTGGAAGATCTCTC AGACTGTCTTGAAGGCCCTCCGGCTACACCTTACCAGATACCCAT GCATTGGGTTTCGACAAGCACCAGGCAAGGGCCTCGAGTGGATCGGC TACATCAACCCCTTCCAGAGGCTACACCAACTACAACCAGAAAAGTGA AGGACCGGTTACCATCAGCAGAGACAACAGCAAGAATACCGCCTT TCTGCAGATGGACTCCCTGCGGCCTGAAGATACCGGCGTGTACTTTT GCGCCCGTACTACGACGACCACTACTCCCTGGATTACTGGGGACAG GGAACACCCGTGACAGTGTCTAGCGGTGGCGGTGGTTCAGGCGGCG GTGGTAGTGGCGGCGGAGGTAGCGGCGGTGGCGGATCTGATATTCA GATGACCCAGTCTCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGAG TGACTATTACCTGCTCCGCCTCTTCTCCGTGTCTCATGAACTGGT ATCAACAAACACCCGGCAAGGCCCTAAGAGATGGATCTACGACAC CAGCAAGCTGGCCTCTGGCGTGCCTCTAGATTTTCTGGCTCTGGCT CCGGCACCGACTATACCTTTACAATCTCCAGCCTGCAGCCTGAGGAT ATCGCCACCTACTACTGTGACAGTGGTCTAGCAACCCCTTACCTT TGGACAGGGCACCAAGCTGCAGATCACCTGATGA

10

20

30

40

【0719】

【表 1 6】

配列番号133	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGACAGGTCCAGCTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACTG GTCAAGCCCTCTCAGACCCTGTCTCTGACCTGTACCGTGTCCGGCGG CTCCATCAACAACAACAATTACTACTGGACCTGGATCCGGCAGCACC CTGGCAAAGGACTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGCTCC ACCTTCTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCTCCGTGGA CACCAGCAAGACCCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCTGTGACCGCCG CTGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAGAAGATACCATGACCGG CCTGGATGTGTGGGGCCAGGGAACAACAGTGACCGTGTCCCTCCGCTT CCACCAAGGGACCTTCCGTGTTTCTCTGGCTCCCTCCAGCAAGTCT ACCTCTGGTGGAACAGCTGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTT TCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAACCTCTGGCGCTCTGACATCCG GCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTC TGTCTCCGTCTGTGACCGTGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGTTGGACAA GAGAGTGGAACCCAAGTCTCGGACAAGACCCACACCTGTCTCCA TGTCTGTCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCCTCTGTGTTCTGTCTTCCA CCTAAGCCTAAGGACACCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGAC CTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGACCAAGCC TAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGGTGTCTG ACCGTGTCTGACACAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCA AGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCTATCGAAAAGACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCCTGCCTC CATGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCT CGTGAAGGGCTTCTACCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGA CTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAAGT CCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTCTGCTCCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGTCTGTCTCTGTCTCCCGG CAAAGGCGGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTAGCGGTGGTGGCGG ATCTCAGGTTTCAAGTTCAGAGTCCGACCTGAGCTGGTTAAGCCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCAAC GACTACGTGATCAACTGGGGCAAGCAGAGATCTGGCCAGGGACTCG AGTGGATCGGAGAGATCTATCTTGGCTCCGGCACCAACTACTACAAT GAGAAGTTCAAGGCTAAGGCTACCCTGACCGCCGACAAGTCTCTCCA ATATCGCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCTCTGAGGACTCCGCT GTGTACTTCTGTGCTCGGAGAGGCAGATACGGCCTGTATGCCATGGA TTACTGGGGACAGGGCACCTCCGTGACTGTCTTAGCGGTGGCGGAG GTAGCGGAGGGCGGTGGTTCAGGCGGAGGCGGCTCTGGTGGCGGTGG ATCTGATATTGAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGTCCGCTTCTC TGGGCGACAGAGTGACAATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAG CAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCACCGTGAAG CTGCTGATCTACTACACCTCTCGGCTGCACTCTGGCGTGCCCTCTAG ATTTTCTGGCAGCGGAAGCGGCACCGATTACTCCCTGACAATCAACA ACCTCGAGCAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCAA CACCCGGCCTTGACATTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCAAG TGATGA
配列番号121	ATGGAAACCGATACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCC AGGCTCTACCGGCCAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCTGTGTCTG GCTCCCTTGGCCAGTCCATCACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTCC GACGTGGGCGGCTACAACCTACGTGTCTGGTATCAGCAGCATCCCGG CAAGGCCCTAAGCTGATGATCTACGACGTGTCCAACCGGCCCTCCG GCGTGTCCAATCGGTTCTCTGGCTCCAAGTCCGGCAACACCGCCTCC CTGACAATCAGCGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACT

10

20

30

40

【0 7 2 0】

【表 17】

	GCTCCTCCTACACCTCCAGCTCTACCCGGGTGTTCCGGCACCGGCACC AAAGTGACAGTGCTGGGCCAGCCCAAGGCCAACCCACCGTGACCC TGTTCCCTCCATCCTCCGAGGAAGTGCAGGCTAACAAAGGCCACCCTC GTGTGCCGTGATCTCCGACTTCTACCCCTGGCGCCGTGACCGTGGCTTG GAAGGCTGATGGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAACCAACCAAG CCCTCCAAGCAGTCCAACAACAAATACGCCGCTCCAGCTACCTGTC CCTGACCCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACCGGTCTACAGCTGCCAGG TCACACATGAGGGCTCCACCGTGGAAGAACCGTGGCCCTACCGA GTGCTCCTAATGA
配列番号122	ATGGAAACCGATACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCC AGGCTCTACAGGACAGGTCCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTG GTCAAGCCCTCCGAGACACTGTCTCTGACCTGCACCGTGTCCGGCGG CTCTGTGTCTCCGGCTCCTACTACTGGTCTGGATCCGGCAGCCTCC AGGCAAGGGACTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGCAGC ACCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCTCCGTGG ACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCCGTGACCGCC GCTGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGAGGGCAAGAACGGCG CCTTCGATATCTGGGGCCAGGGCACCATGGTACCGTGTCTAGCGCT TCCACCAAGGGCCCTCCGTGTCCCTCTGGCCCTTCCAGCAAGTC CACCTCTGGCGGAACCGCTGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACT TCCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAACTCTGGCGCCCTGACATCC GGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGTCCAGCGCCCTGTACTC TCTGTCCAGCGTCTGTGACCGTGCCTTCCAGCTCTCTGGGCACACAGA CCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGA CAAGCGGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCT CCCTGTCTGCCCCTGAAGTGTGGGCGGACCCAGCGTGTCTCTGTT CCCTCCAAAGCCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAA GTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCG TGCTGACAGTGTCTGCACCGAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAA GTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCTATCGAAAAGACC ATCAGCAAGGCTAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTTTACACAC TGCTTCCCTGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGTG GTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGG AGTCCAACGGCCAGCCCGAGAACAACATAAGACCAACCCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCTCTGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAG CCCCGGCAAGTAATGA
配列番号123	ATGGAAACCGATACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCC AGGCTCTACCGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGT CCGCCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCTCCAG TCCATCTCCTCTACCTGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGC CCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCCAGTCTGCAGTCTGGCGTGC CATCTGGCTTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTACCCCTGACC ATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCCGCACCTACTACTGCCAGCA GTCCTACTCCACCCCTCTGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGA TCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCACCTTCCG ACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTTCTGTCTGTGCTGTGAAC AACTTCTACCCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATG CCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTACCGAGCAGGACTCC AAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTTACCCTGACCCGTGCCAAGGC CGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACAG

10

20

30

40

【0721】

50

【表 18】

	GGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACAGAGGCGAGTGCT AATGA
配列番号118	ATGGAAACCGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCC AGGCAGCACCGGCGATATCCAGATGACACAGAGCCCTAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGATAGAGTGACCATCACCTGTCGGGCCAGCC AGAGCATCAACAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAA GGCCCCCTACCCTGCTGATCTATGCCGCTTCTAGCCTGCAGAGCGGCG TGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCAGATCCGGCACCGACTTCACCCTG ACAATCAGCAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCGCCTACTTCTGCCA GCAGACCTACAGCAATCCCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAA GTGAAGAGAACAGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCACCCAG CGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCAGCGTCGTGTGCTGCTG AACAACCTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACA ACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGA CAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGTCCAGCACCTGACCCTGAGCA AGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCA CCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAATAGAGGCGAG TGCTAATGA
配列番号134	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACCGGACAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCTTCTGTGTCTG GCTCTCCCCGGCCAGTCCATCACCATCTCTTGTACCGGCACCTCCTCTG ACGTCGGCGGCTACAACCTACGTGTCTTGGTATCAGCAGCATCCCCGGC AAGGCCCTAAGCTGATGATCTACGACGTGTCCAACCCGGCCTCCGG CGTGTCCAATAGATTCTCCGGCTCCAAGTCCGGCAACACCGCTTCTC TGACAATCAGCGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTG TTCCTCCTACACCTCCTCCAGCACCCAGAGTGTTTGGCACCGGCACCA AAGTGACCGTGCTGGGACAGCCTAAGGCCAATCCTACCGTGACACT GTTCCCTCCATCCTCCGAGGAACTGCAGGCTAACAAGGCTACCTCTG TGTGCTGATCTCCGACTTTTACCCTGGCGCTGTGACCGTGGCCTGG AAGGCTGATGGATCTCCTGTGAAGGCTGGCGTGGAACACCAAGC CTTCCAAGCAGTCCAACAACAATAACGCCGCCTCCTCCTACCTGTCT CTGACCCCTGAACAGTGGAAGTCCCACCGGTCTACAGCTGCCAAGT GACCCATGAGGGCTCCACCGTGGAAGAGACCGTGCGTCTCTACTGAG TGTTCTGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGAGGCGGTG GATCTGCTCCTACCTCCAGCTCCACCAAGAAAACCCAGCTGCAGTTG GAGCATCTGCTGCTGGACCTGCAGATGATCCTGAACGGCATCAACA ACTACAAGAACCCCAAGCTGACCCGGATGCTGACCGCCAAGTTTGC CATGCCTAAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGCTTGAA GAGGAAGTGAAGCCCCTGGAAGAAGTGCTGAATCTGGCCCAGTCCA AGAACTTCCACCTGAGGCCCTCGGGACCTGATCAGCAACATCAACGT GATCGTGCTCGAGCTGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCATGTGCGAGT ACGCCGACGAGACAGCTACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGAT CACCTTCTGCCAGAGCATCATCAGCACCTGACCTGATGA
配列番号135	ATGGAAACCGATACCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCC AGGATCTACAGGCGAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTT CACCTTCTCCAGCTATATCATGATGTGGGTCCGACAGGCCCTGGCA AGGGCCTGGAATGGGTGTCCTCTATCTACCCCTCCGGCGGCATCAC TTTACGCCGACACCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGGACAA CTCCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAATCAAGCTGGGCACCGTGA CCACCGTGGACTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTACCGTGTCTCTCT GCTTCTACCAAGGGCCCCCTCCGTGTCCCTCTGGCCCCCTTCCAGCAA GTCCACCTCTGGCGGAACCGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT

10

20

30

40

【0722】

【表 19】

	ACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACCTCTGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGACACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCCAGCGGCCTGTA CTCTCTGTCCCTCCGTGCTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACAC AGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGT GGACAAGCGGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGT CCTCCCTGTCTGCCCCCTGAACGTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCT GTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCTG AAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGT GAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAG ACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGT CCGTGCTGACAGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTA CAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCTATCGAAAAG ACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGAGAGCCTCAAGTCTGCA CACTGCCTCCCAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT GAGCTGCGCTGTGAAGGGCTTCTACCTTCCGATATCGCCGGAAT GGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAATTACAAGACACCCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGGTGTCCAAGCTGACCG TGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCTGTGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCT GTCTCCCGGCAAGTAATGA	10
配列番号137	ATGGAAACCGACACACTGCTGTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGACAGGTCCAGCTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACTG GTCAAGCCTTCCGAGACACTGTCTCTGACCTGCACCGTGTCTGGCGG CTCTGTGTCTCTGGCTCCTACTACTGGTCTTGATCAGACAGCCTCC TGGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGCTCCA CCAATAACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCTCCGTGGAC ACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCCGTGACCGCTGC TGATAACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGAGGGCAAGAACGGCGCC TTCGATATTTGGGGCCAGGGCACCATGGTCACCGTGTCCAGTGCTTC TACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCTGCTGGCTCCAGCTCTAAGTCTA CCTCTGGCGGAACAGCTGCCCTGGGCTGTCTGGTCAAGGATTACTTC CCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCTCTGACATCCGG CGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCT GTCCAGCGTCTGTGACCGTGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCTCA TGTCTGTCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTCTGTTCCT CCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGAC CTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC TAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCA AGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCCTGCCTC CATGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGTGGTGCCT CGTGAAGGGCTTCTACCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGTGGA CTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGT CCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGTCCCTGG AAAAGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGAGGCGGTGG ATCTGAAGTGCAGCTCCAAGAATCTGGACCCGGGCTCGTGAAGCCC AGCCAGTCTCTGAGTCTGACCTGTACAGTGACCGGCTACTCCATCAC CTCCGACTACGCTTGGAACTGGATCCGGCAGTTCCCGGCAACAAGT TGGAGTGGATGGGCTATATCACCTACAGCGGCAGCACCTTTACAAC	20 30 40

【0723】

10

20

30

40

50

【表 2 0】

	CCTTCTCTGGAATCCCGGATCAGCATCACCCGGGACACCTCTACCAA TCAGTTCTTTCTGCAGCTGAACAGCGTGACCACCGAGGACACCGCCA CCTACTATTGTGCTAGAGGCGGCTACTACGGCTCCTCTGGGGAGTG TTTGCTTACTGGGGACAGGGAACCCCTCGTGACTGTTTCTGCTGGTGG CGGAGGAAGCGGCGGAGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGTCTGGTGGC GGCGGATCTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCCAGCCTGTCTGC TTCTGTGGGCGAGACAGTGACCATTACCTGCCGGGTGTCCGAGAACA TCTACTCCTACCTGGCCTGGTATCAACAGAAACAGGGCAAGTCCCCT CAGCTGCTGGTGTACAATGCTAAGACCCCTGGCTGAGGGCGTGCCCTC TAGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCCAGTTTAGCCTGAAGATCA ACTCCCTGCAGCCTGAGGACTTCGGCAGCTACTACTGCCAGCACCAC TATGGCACCCCTTGGACATTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCA AGTGATGA	10
配列番号138	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGACAGGTCCAGCTGCAAGAGTCTGGCCCTGGACTG GTCAAGCCTTCCGAGACACTGTCTCTGACCTGCACCGTGTCTGGCGG CTCTGTGTCCTCTGGCTCCTACTACTGGTCTCGGATCAGACAGCCTCC TGGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCTACTACTCCGGCTCCA CCAACTACAACCCAGCCTGAAGTCCAGAGTGACCATCTCCGTGGAC ACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCCGTGACCGCTGC TGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGAGGGCAAGAACGGCGCC TTCGATATTTGGGGCCAGGGCACCATGGTCACCGTGTCCAGTGCTTC TACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCTCACTGGCTCCCAGCTCTAAGTCTA CCTCTGGCGGAACAGCTGCCCTGGGCTGTCTGGTCAAGGATTACTTC CCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGGAATTCTGGCGCTCTGACATCCGG CGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACTCTCT GTCCAGCGTCGTGACCGTGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAA GAGAGTGGAACCCAAGTCTCGGACAAGACCCACACCTGTCTCTCA TGTCTGTCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTCTCTGTTTCT CCAAAGCCTAAGGACACCCGTGATGATCTCTCGGACCCCTGAAGTGAC CTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCC TAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCA AGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCTATCGAAAAGACCATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACCCCTGCCTC CATGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGTGGTGCCT CGTGAAGGGCTTCTACCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGA CTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGAACAAGT CCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCTCCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTGTCCCCTGG AAAAGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGAGGCGGTGG ATCTCAGGTTTCAAGTGCAGCAGTCTGCCGTGGAACCTGGCTAGACCTG GCGCTTCCGTGAAGATGTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACC AGCTTCACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCTTGG	20 30 40

【0 7 2 4】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

	AGTGGATTGGATATATCAACCCTAGCTCTGGCTACACCGAGTACAAC CAGAAGTTCAAGGACAAGACCACTCTGACCGCCGACAAGTCCTCCA GCACCGCTTACATGCAGCTCGACTCCCTGACCTCTGACGACTCTGCT GTGTACTATTGCGTGCGGGGCTCCTCCAGAGGCTTCGATTATTGGGG ACAAGGCACACTCGTGACAGTGTGAGCTGGTGGTGGCGGTAGTGGC GGTGGCGGTTTCAGGTGGCGGAGGAAGCGGCGGAGGCGGATCTGATA TCCAGATGATCCAGTCTCCTGCCAGCCTGTCCGTGTCTGTGGGAGAG ACTGTGACCATCACCTGTGCGGGCCTCCGAGAACATCTACTCCAACCT GGCCTGGTTCCAGCAGAAGCAGGGAAAGTCTCCTCAGCTGCTGGTGT ACGCCGCCACCAATTTGGCTGATGGCGTGCCCTCTCGGTTCTCCGGA TCTGGATCTGGCACACAGTATTCCCTGAAGATCAACTCCCTGCAGTC CGAGGACTTCGGCATCTACTATTGCCAGCACTTCTGGGGCACCCCTA GAACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCAAGTGATGA

10

【0 7 2 5】

【表 2 2】

20

表4. 抗原の核酸配列

配列ID	説明	核酸配列
配列番号139	hIL2R α	ATGGAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGG TGCCAGGATCTACAGGCGAGCTGTGCGACGATGACCCTCCTGA GATCCCTCACGCCACCTTCAAGGCCATGGCTTACAAAGAGGGC ACCATGCTGAACTGCGAGTGCAAGCGGGGCTTCAGACGGATC AAGTCCGGCAGCCTGTACATGCTGTGCACCGGCAACTCCTCTC ACTCCTCCTGGGACAACCAGTGCCAGTGCACTCCTCTGCCAC CAGAAACACCACCAAGCAAGTGACCCCTCAGCCTGAGGAACA GAAAGAGCGCAAGACCACCGAGATGCAGAGCCCCATGCAGCC TGTGGATCAGGCTTCTCTGCCTGGCCACTGTAGAGAGCCTCCA CCTTGGGAGAATGAGGCCACCGAGCGGATCTACCACTTTGTCTG TGGGCCAGATGGTGTACTACAGTGCGTGCAGGGATACAGAG CCCTGCATAGAGGCCCTGCTGAGTCCGTGTGCAAGATGACCCA TGGCAAGACCAGATGGACCCAGCCTCAGCTGATCTGTACAGG CGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGTGGATCTGGCCTGAACGA CATCTTCGAGGCCAGAAAATCGAGTGCCACGAAGGCGGTGG CGGCTCCCACCATCATCATCACCACCATCACTGATGA
配列番号140	hメソテリン	ATGGAACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTCTGGG TCCCAGGCTCCACCGGCGGACTGAACGACATCTTCGAGGCCCA GAAAATCGAGTGGCAGGAGGGCGGAGGCGGCTCCGAGCCTAG AACCGACACCGACACCTGTCCCAACCCCCCGACCCCTGCCCT ACCTGTCTACCCCTGATCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTTCAT CTTCCCACCAAGCCTAAGGACGTGCTGATGATCTCCCTGACC CCCAAGATCACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCGAAGAGGAA CCCGACGTGCAGTTCAATTGGTACGTGAACAACGTGGAAGAT AAGACCGCCCAGACCGAGACACGGCAGCGGCAGTACAACCTCC ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGCCCATCAAGCACCAGGACT GGATGTCCGGCAAGGTGTTCAAGTGCAAAGTGAACAACAACG CCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGCCTCGGGG CCAAGTCCGAGTGCCCCAGATCTACACCTTCCCACCCCTATC

30

40

【0 7 2 6】

50

【表 2 3】

		GAGCAGACCGTGAAGAAAGACGTGTCCGTGACCTGCCTCGTG ACCGGATTCTTGCCACAAGACATCCACGTGGAATGGGAGTCC AACGGCCAGCCCCAGCCGAGCAGAACTACAAGAACACCCAG CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTACTTCCTGTACTCCAAGC TGAACGTGCCCAAGTCCAGATGGGACCAGGGCGACTCCTTCAC CTGTTCCGTGATCCACGAGGCCCTGCACAACCACCATGACC AAGACCATCAGCCGGTCCCTGGGCAATGGCGGCGGAGGCTCC GAGGTGGAAAAGACCGCCTGCCCTCCGGCAAGAAGGCCAGA GAGATCGACGAGTCCCTGATCTTCTACAAGAAGTGGGAGCTG GAAGCCTGCGTGGACGCCGCCCTGCTGGCCACCCAGATGGAC AGAGTGAACGCCATCCCCTTACCTACGAGCAGCTGGATGTGC TGAAGCACAAGCTGGACGAGCTGTACCCCCAGGGCTACCCCCG AGAGCGTGATCCAGCACCTGGGCTACCTGTTTCTGAAGATGTC CCCCGAGGACATCCGGAAGTGGAACGTGACCTCCCTGGAAAC CCTGAAGGCCCTGCTGGAAGTGAACAAGGGCCACGAGATGAG CCCCAGGCCCCCAGACGACCTCTGCCTCAGGTGGCAACCCTG ATCGATAGATTCTGTGAAGGGCAGAGGCCAGCTGGACAAGGAC ACCTGGACACACTGACCGCCTTCTACCCCGGCTACCTGTGCT CCCTGTCCCTGAGGAACTGTCTCCGTGCCCCCTCCTCTATC TGGGCCGTGCGGCCTCAGGATCTGGACACCTGTGACCCTCGGC AGCTGGATGTCTGTATCCCAAGGCCCGGTGGCCTTCCAGAA CATGAACGGCTCCGAGTACTTCTGTGAAGATCCAGTCTTCTGT GGCGGAGCCCCACCGAGGACCTGAAGGCTCTGTCCCAGCAG AACGTGTCCATGGACCTGGCCACCTTCATGAAGCTGCGGACCG ACGCCGTGCTGCCTCTGACCGTGGCTGAGGTGCAGAAGCTGCT GGGCCCCACGTGGAAGGCTGAAGGCCGAGGAACGGCACAG ACCCGTGCGGGACTGGATCCTGCGGCAGAGACAGGACGACCT GGATACCCTGGGCCTGGGCCTGCAGTAATGA	10
配列番号141	hPD1L1	ATGAGAATCTTCGCCGTGTTTCATCTTCATGACCTACTGGCATCT GCTGAACGCCTTCACCGTGACCGTGCCCAAGGACCTGTACGTG GTGGAATACGGCTCCAACATGACCATCGAGTGCAAGTTCCCCG TGGAAAAGCAGCTGGACCTGGCCGCCCTGATCGTGTACTGGG AGATGGAAGATAAGAACATCATCCAGTTCTGTGCACGGGGAAG AGGACCTGAAGGTGCAGCACTCCTCCTACCGGCAGAGAGCCA GACTGCTGAAGGACCAGCTGTCCCTGGGCAATGCCGCCCTGCA GATCACCGACGTGAAGCTGCAGGATGCCGGCGTGTACCGGTG CATGATCTCTTACGGCGGAGCCGACTACAAGCGGATCACCGTG AAAGTGAACGCCCCCTACAACAAGATCAACCAGCGGATCCTG GTGGTGGACCCCGTGACCTCTGAGCACGAGCTGACCTGTGAGG CCGAGGGCTACCCTAAGGCCGGAAGTGATCTGGACCTCCTCCGA CCACCAGGTGCTGTCCGGCAAGACCACCACCAAACTCCAA GCGGGAAGAGAAGCTGTTCAACGTGACCTCCACCCTGCGGAT CAACACAACCACCAACGAGATCTTCTACTGTACCTTCCGGCGG CTGGACCCCGAGGAAAATCACACCGCTGAGCTCGTGATCCCCG AGCTGCCTCTGGCCACCCCTCCTAATGAGAGAACAGGCGGCG GAGGCTCCGGCCTGAACGACATCTTTGAGGCCAGAAAATCG AGTGGCACGAGGGCGGAGGCGGCTCCCACCATCATCACCACC ACCATCACTGATGA	20
配列番号142	hNKp30	ATGGCTTGGATGCTGCTGCTGATCCTGATCATGGTGCACCCCG GCTCTTGCGCCCTGTGGGTGTCCCAGCCTCCTGAGATCAGAAC CCTGGAAGGCTCCTCCGCCTTCTGCCCTGTCTCTCAATGCCT CTCAGGGCAGACTGGCCATCGGCTCCGTGACCTGGTTTCAGGGA TGAGGTGGTGGCCGCAAGAAAGTGCAGAACGGCACACCTGA GTTTCAGAGGCAGACTCGCCCCCTCTGGCCTCCTCTAGATTCTG	30

【0 7 2 7】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

		CACGATCACCAGGCCGAGCTGCACATCAGAGATGTGCGGGGC CACGACGCCTCCATCTACGTGTGCAGAGTGGAAAGTGCTGGGCGC TGGGCGTGGGCACCGGCAATGGAACACGGCTGGTGGTGGA AAGAGGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGCTCTGATAAGA CCCACACCTGTCTCCCTGTCTGCCCCCTGAACTGCTGGGCGG ACCTTCCGTGTCTCTGTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTG ATGATCTCCCGGACCCCTGAAAGTGACCTGCGTGGTGGTGACG TGTCACACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGA CGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGA ACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTG CTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAG GTGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACCATCT CCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCTCAGGTGTACACAC TGCCCTCCAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGACCTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGT GGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAGAC CACCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACT CCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTCTCTCTGTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCTGGCAAAGGTGGTGGT GGTAGCGGTGGCGGAGGCAGCGGCCTGAACGATATCTTCGAG GCCCAGAAAATCGAGTGGCACGAGTAATGA	10
配列番号143	hNKp46	ATGGAACCCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGG TGCCAGGATCTACCGGCCAGCAGCAGACACTGCCCAAGCCTTT TATCTGGGCGGAGCCTCACTTCATGGTGGCCAAAGAAAAGCAA GTGACCATCTGCTGCCAGGGCAACTACGGCGCTGTGGAATACC AGCTGCACTTCGAGGGCTCCCTGTTCGCGGTGGATAGACCTAA GCCTCCTGAGCGGATCAACAAAGTGAAGTTCTACATCCCCGAC ATGAACTCCCGGATGGCTGGCCAGTACTCCTGCATCTATAGAG TGGGCGAGCTTTGGAGCGAGCCCTCCAATCTGCTGGATCTGGT GGTCACCGAGATGTACGACACCCCTACACTGAGCGTGCACCCC GGACCTGAAGTGATCTCTGGCGAGAAAGTGACCTTCTACTGCA GACTGGATACCGCCACCTCCATGTTTCTGCTGCTCAAAGAGGG CAGATCCTCTCACGTGCAGCGCGGCTATGGAAGGTGCAGGCT GAGTTTCTCTGGGCCCTGTGACCACCGCTCACAGAGGCACCT ACAGATGCTTCGGCTCCTACAACAACCACGCCTGGTCTTTCCC ATCCGAGCCTGTGAAGCTGCTGGTCACCGGCGACATCGAGAA CACATCTCTGGCCCCCTGAGGACCCACCTTTCTGATACCTGG GGCACCTATCTGCTGACCACCGAGACAGGCCTGCAGAAAGAT CACGCCCTGTGGGATCACACCGCTCAGAATGGTGGCGGAGGA TCTGGCGGAGGCGGATCTGAACCTAGAACCAGACACCGACACC TGTCTAATCCTCCAGATCCTTGTCTACCTGTCCAACACCTGA CCTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCATCTTCCACCTAAGCCA AAGGACGTGCTGATGATCTCTCTGACCCCTAAGATCACCTGTG TGGTGGTGGACGTGTCCGAAGAGGAACCCGACGTGCAGTTCA ATTGGTACGTGAACAACGTCGAGGACAAGACAGCCCAGACCG AGACACGGCAGCGGCAGTACAACCTCTACCTACAGAGTGGTGT CCGTGCTGCCCATCAAGCACCAGGATTGGATGTCCGGCAAGGT GTTCAAGTGCAAAGTGAACAACAACGCCCTGCCTTCTCCAATC GAAAAGACCATCTCCAAGCCTCGGGGCCAAGTGCGAGTGCCC CAGATCTATACCTTTCCACCTCCTATCGAGCAGACCGTGAAGA AAGATGTGTCCGTGACCTGCCTCGTGACCGGCTTCTGCCTCA AGACATCCATGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTCAGCC TGAGCAGAACTACAAGAACACCCAGCCTGTGCTGGACTCCGA CGGCAGCTACTTCTGTACTCCAAGCTGAACGTGCCCAAGTCC	20 30 40

【0 7 2 8】

【表 2 5】

		AGATGGGACCAGGGCGACTCCTTCACCTGTTCCGTGATCCACG AGGCCCTGCACAACCACCACATGACCAAGACCATCAGCAGAT CCCTCGGCAATGGCGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGAGGTTCCGG ACTGAACGATATCTTCGAGGCCAGAAAATCGAGTGGCACGA GTGATGA
配列番号144	BirA	ATGGAACTGACACCCTCCTCTTTGGGTGCTGCTGCTTTGGG TGCCTGGATCGACCGGGATGAAGGACAATACCGTGCCTCTGA AGCTCATTGCCCTGCTGGCCAACGGAGAATTCCATTCCGGCGA ACAGCTGGGGGAGACTCTCGGGATGTCCCGGGCCGCCATCAA CAAGCACATCCAGACTTTGCGCGACTGGGGAGTCGACGTGTTT ACGGTGCCGGGAAGGGCTACTCGCTCCCGGAACCGATCCAG CTGCTGAACGCCAAGCAGATTCTGGGACAGCTGGATGGCGGA AGCGTGGCAGTGTGCCCCGTGATCGACTCAACCAACAGTATC TGCTGGATAGAATCGGTGAACTGAAATCCGGCGACGCTTGAT TGCCGAGTACCAACAGGCCGGAAGGGGACGGCGCGGCAGGAA GTGGTTCTCTCCATTCCGGCGCAACCTCTACCTGAGCATGTTCT GGAGATTGGAGCAGGGTCCCGCCGCGGCCATCGGCCTCTCCCT GGTCATCGGCATTGTGATGGCTGAAGTGCTGAGGAAGTTGGGT GCCGACAAGGTCCGCGTGAAGTGGCCGAACGACCTGTACCTC CAAGACCGGAAATTGGCGGGGATTCTCGTCGAGCTTACCGGA AAGACTGGCGATGCCGCACAAATTGTGATCGGGGCGGGAATC AACATGGCGATGCGACGGGTGGAAGAGAGCGTCGTGAACCAG GGATGGATCACCTGCAAGAGGCCGGAATCAACCTGGATCGC AACACCCTGGCTGCCATGCTCATTGCGCAACTGAGAGCCGCAC TGGAGCTGTTTGAAGCAGGAGGGTCTGGCCCCCTACCTGTCACG CTGGGAAAAGCTTGATAACTTCATCAATCGGCCTGTGAAGCTG ATCATCGGAGACAAGGAGATTTTCGGCATCTCGAGAGGCATC GACAAACAAGGAGCCCTCTGCTGGAACAGGACGGAATCATT AAGCCCTGGATGGGTGGAGAGATCTCCCTGCGGTCCGCCGAA AAGTCCGGAAGGATGAACTC

10

20

【0 7 2 9】

【表 2 6】

表 5. アミノ酸配列

配列 ID	説明	アミノ酸配列
配列番号 145	α メソテリン Ab237 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSSINNNYYWTWIRQHPGKGLE WIGYIYYSGSTFYNPSLKSRTISVDTSKTQFSLKLSSVTAADTAVYYC AREDTMTGLDVWGQGTITVTVSS
配列番号 146	α メソテリン Ab237 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSINNYLNWYQQKPGKAPTLIIY AASSLQSGVPSRFSGSRSGDFTLTISSLQPEDFAAYFCQQTYSNPTFGQ GTKVEVK
配列番号 20	hIL2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKG SETTFMCEYADETATVEFLNRWITFCQSIISTLT
配列番号 43	2x4GS リンカー	GGGGSGGGGS
配列番号 83	ヒト CH2、 CH3 ノブ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPVYTLPPCREEMTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

40

【0 7 3 0】

50

【表 27】

配列番号 82	ヒト CH2、 CH3 ホール	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 14	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSC
配列番号 11	CL (κ)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
配列番号 147	CL (λ)	GQPKANPTVITLPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSP VKAGVETTKPSKQSNKYAAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTV EKTVAPECS
配列番号 148	αPD1L1 アベルマブ VH	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEW VSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARIKLGTVTTVDYWGQGLTVTVSS
配列番号 149	αPD1L1 アベルマブ VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKL MIYDVSNRPSGVSNRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSTSS TRVFGTGTKVTVL
配列番号 96	3x4GS リンカー	GGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGAGGCGGTGGATCT
配列番号 150	αNKp46 VH	QVQLQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWGKQRSGQGLEW IGEYIPGSGTNYNNEKFKAKATLTADKSSNIAYMQLSSLTSEDSAVYFC ARRGRYGLYAMDYWGQGSVTVSS
配列番号 151	αNKp46 VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTINNLEQEDIATYFCQQGNTRPWF GGGTKLEIK
配列番号 152	4x 4GS リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGS
配列番号 153	α メソテリン M912 VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLE WIGYIYYSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC AREGKNGAFDIWGQGTMTVSS
配列番号 154	α メソテリン M912 VL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
配列番号 42	1x4GS	GGGGS
配列番号 155	αNKp30 scFv	BioLegend カタログ #325207
配列番号 156	hIL7	DCDIEGKDQKQYESVLMVSIQDQLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDA NKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTILLNCTGQVK GRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKLNLCFLKRLLEIKTCWNKI LMGTKEH
配列番号 157	αIGF1R、 イスチラツマ ブ重鎖	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMFSRYPMHWVRQAPGKGLEW VGSISGSGGATPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKDFYQILTGNADFYWGQGTITVTVSS
配列番号 158	αIGF1R、 イスチラツマ ブ軽鎖	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIY AKSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSATYYCQQYWTFPLTFG GGTKVEIK

10

20

30

40

【0731】

【表 2 8】

配列番号 159	α HER3 イスチラツマ ブ重鎖	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVAGISWDSGSTGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCARDLGAYQWVEGFDYWGQGLTVTVSS
配列番号 160	α HER3 イスチラツマ ブ軽鎖	SYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIY GKNNRPSGIPDRFSGSTSGNSASLTITGAQAEDEADYYCNSRSDSPGNQ WVFGGGTKVTVLG
配列番号 161	α CD3 テプリズマブ 重鎖	QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLE WIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVY FCARYYDDHYSLDYWGQGPVTVSS
配列番号 162	α CD3 テプリズマブ 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIY DTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLPEDIATYYCQQWSSNPFTFG QGTKLQIT
配列番号 163	hIL2 F42A Y45A	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPK KATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKG SETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
配列番号 164	α NKp46 2 重鎖	QLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSDYAWNWIQFPGNKLEWMG YITYSGSTSYNPSLESRISITRDTSTNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARGG YYGSSWGVFAYWGQGLTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
配列番号 165	α NKp46 2 軽鎖	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRVSENIYSYLAWYQQKQGKSPQLLVY NAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYGTPTWF GGGKLEIK
配列番号 166	α NKp46 重鎖 4	QVQLQQSAVELARPGASVKMSCKASGYTFTSFTMHWVKRPGQGLE WIGYINPSSGYTEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLDSLTSDDSAVY YCVRGSSRGFDYWGQGLTVTVSA
配列番号 167	α NKp46 軽鎖 4	DIQMIQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWFQQKQGKSPQLLVY AATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGIYYCQHFHWGTPRTF GGGKLEIK

10

20

【0 7 3 2】

【表 2 9】

表 6. 完全重鎖および軽鎖のアミノ酸配列

構築物 配列番号	N 末端	リンカー	可変	定常	Fc	リンカー	C 末端
配列番号 168			配列番号 145	配列番号 14	配列番号 83		
配列番号 169			配列番号 146	配列番号 11			
配列番号 170	配列番号 20	配列番号 43			配列番号 82		
配列番号 120			配列番号 148	配列番号 14	配列番号 82	配列番号 96	配列番号 20
配列番号 171			配列番号 149	配列番号 147			
配列番号 172			配列番号 153	配列番号 14	配列番号 83		
配列番号 173			配列番号 154	配列番号 11			
配列番号 174			配列番号 145	配列番号 14	配列番号 83	配列番号 96	配列番号 155

30

40

【0 7 3 3】

50

【表 3 0】

配列番号 175					配列番号 82		
配列番号 176					配列番号 83		
配列番号 177			配列番号 148	配列番号 14	配列番号 82	配列番号 96	配列番号 20
配列番号 178		配列番号 42				配列番号 42	
配列番号 179		配列番号 43				配列番号 43	
配列番号 180		配列番号 43				配列番号 43	
配列番号 181		配列番号 42				配列番号 42	
配列番号 182	配列番号	配列番号 43				配列番号 42	
配列番号 183			配列番号 157	配列番号 14	配列番号 82		
配列番号 184			配列番号 158	配列番号 11			
配列番号 185			配列番号 157	配列番号 14	配列番号 82	配列番号 96	配列番号 20
配列番号 186			配列番号 157	配列番号 14	配列番号 82	配列番号 96	配列番号 156
配列番号 187	配列番号 159	配列番号 152	配列番号 160	配列番号 43	配列番号 83		
配列番号 188	配列番号 159	配列番号 152	配列番号 160	配列番号 43	配列番号 83	配列番号 96	配列番号 150、 152、151
配列番号 189	配列番号 159	配列番号 152	配列番号 160	配列番号 43	配列番号 83	配列番号 96	配列番号 161、 152、162
配列番号 190			配列番号 145	配列番号 14	配列番号 83	配列番号 96	配列番号 150、 152、151
配列番号 191			配列番号 149	配列番号 147		配列番号 96	配列番号 163
配列番号 192			配列番号 148	配列番号 14	配列番号 82		
配列番号 193			配列番号 153	配列番号 11	配列番号 83	配列番号 96	配列番号 150、152 151
配列番号 194			配列番号 153	配列番号 11	配列番号 83	配列番号 96	配列番号 164、 152、165
配列番号 195			配列番号 153	配列番号 11	配列番号 83	配列番号 96	配列番号 166、 152、167

10

20

30

40

【0 7 3 4】

50

【表 3 1】

表7. 多重特異性分子を構築するのに使用される鎖のアミノ酸配列

配列ID	アミノ酸配列
配列番号168	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSINNNYYWTWIRQHPGKGLE WIGYIYYSGSTFYNP SLKSRVTISVDTSKTQFSLKLSVTAADTAVYYCA REDTMTGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
配列番号169	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSINNYLNWYQQKPGKAPTLLIY AASSLQSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFAAYFCQQTYSNPTFGQ GTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号170	APTSSSTKKTQLQLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGS ETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLTGGGGSGGGGSDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号174	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSINNNYYWTWIRQHPGKGLE WIGYIYYSGSTFYNP SLKSRVTISVDTSKTQFSLKLSVTAADTAVYYCA REDTMTGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGS (+ BioLegend カタログ #325207タンパク質配列)
配列番号197	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV KAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
配列番号176 ノブ	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWV SSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RIKLGTVTTVDYWGQGLTVTVSS
配列番号177	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWV SSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RIKLGTVTTVDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS

【0 7 3 5】

10

20

30

40

50

【表 3 2】

	KAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLL DLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFL NRWITFCQSIISTLT
配列番号183	EVQLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMFSRYPMHWVRQAPGKGLEW VGSISGSGGATPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDFYQILTGNADYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
配列番号184	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYA KSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDSATYYCQQYWTPLTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号185	EVQLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMFSRYPMHWVRQAPGKGLEW VGSISGSGGATPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDFYQILTGNADYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQLEHLL LDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT
配列番号186	EVQLQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMFSRYPMHWVRQAPGKGLEW VGSISGSGGATPYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDFYQILTGNADYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPSPREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSGGGGSDCDIEGKDGKQYESVLM VSIDQLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHICDANKEGMFLFRAARKLRQF LKMNSTGDFDLHLLKVSEGTITLLNCTGQVKGKPKAALGEAQPTKSLEE NKSLEQKQLNDLCFLKRLLEIKTCWNKILMGTKHEH
配列番号187	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVAGISWDSGSTGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTALY YCARDLGAYQWVEGFYWGQGTITVTVSSASTGGGSGGGSGGGGS GGGSSYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYASWYQKPKQAP VLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNSASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSP GNQWVFGGGTKVTVLGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

10

20

30

40

【0 7 3 6】

【表 3 3】

	PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
配列番号188	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVAGISWDSGSTGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALY YCARDLGAYQWVEGFDYWGQGTLLVTVSSASTGGGGSGGGSGGGGS GGGGSSYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAP VLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNSASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSP GNQWVFGGGTKVTVLGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQSGPELVKPGASVK MSCKASGYTFTDYVINWGKQRSGQGLEWIGEIPGSGTNYYNEKFKAK ATLTADKSSNIAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGRYGLYAMDYWGQGT SVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSDIQTQTSSLSASLGDRVTISC RASQDISNLYNWWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTINNLEQEDIATYFCQQGNTRPWTFGGGTKLEIK
配列番号189	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVAGISWDSGSTGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALY YCARDLGAYQWVEGFDYWGQGTLLVTVSSASTGGGGSGGGSGGGGS GGGGSSYELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAP VLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSTSGNSASLTITGAQAEDEADYYCNSRDSP GNQWVFGGGTKVTVLGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGGTVVQPGSLR LSCKASGYTFTTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKD RFTISRDNANKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYDDHYSLDYWGQGT VTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTITCS ASSSVSYMNWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTF TISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGQGTQLQIT
配列番号190	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSINNNYYWTWIRQHPGKGLE WIGYIYSGSTFYNPSLKSRTISVDTSKTQFSLKLSSVTAADTAVYYCA REDTMTGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGSQVQLQQSGPELVKPGASVK MSCKASGYTFTDYVINWGKQRSGQGLEWIGEIPGSGTNYYNEKFKAK ATLTADKSSNIAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGRYGLYAMDYWGQGT SVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSDIQTQTSSLSASLGDRVTISC RASQDISNLYNWWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYS LTINNLEQEDIATYFCQQGNTRPWTFGGGTKLEIK

10

20

30

40

【0 7 3 7】

【表 3 4】

配列番号193	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEW IGYIYYSGSTNYNPSLSKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR EGKNGAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQSGPELVKPGASVKMS CKASGYTFTDYVINWGKQRSGGLEWIGEIPGSGTNYNEKFKAKAT LTADKSSNIAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRGRYGLYAMDYWGQGTSTV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQTMTTSSLSASLGDRVTISCR AQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSLRHSGLVPSRFSGSGSGTDYSLTI NNLEQEDIATYFCQQGNTRPWTFGGGTKLEIK	10
配列番号173	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSGFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGG TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	
配列番号171	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTR VFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS	20
配列番号172	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEW IGYIYYSGSTNYNPSLSKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR EGKNGAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	
配列番号191	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTR VFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECSGGGGSGGGGSGGGGSAPTSSSTKKTQLQ LEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLCLE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	30
配列番号192	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWV SSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RIKLGTVTTVDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	40

【0 7 3 8】

【表 3 5】

配列番号194	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEW IGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR EGKNGAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSEVQLQESGPGLVKPSQSLSLTC TVTGYSITSDYAWNIRQFPGNKLEWMGYITYSGSTSYNPSLESRISITR DTSTNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARGGYGSSWGVFAIYWGQGTLLV VSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRVS ENIYSYLAWYQQKQKGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKI NSLQPEDFGSYQCQHHYGTPTWTFGGGTKLEIK	10
配列番号195	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEW IGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR EGKNGAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQAVALARPGASVKM SCKASGYTFTSFTMHVVKQRPGQGLEWIGYINPSSGYTEYNQKFKDKT TLTADKSSSTAYMQLDSLTSDDSAVYYCVRGSSRGFDYWGQGTLLVTVS AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMIQSPASLSVSVGETVTITCRASEN IYSNLAWFQQKQKGKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINS LQSEDFGIYYCQHFHWGTPRTFGGGTKLEIK	20

【0 7 3 9】

30

40

50

【表 3 6】

表8. 抗原のアミノ酸配列

配列ID	説明	アミノ酸配列
配列番号181	hMeso 1-7	GLNDIFEAQKIEWHEGGGGSEPRDTDTCNPPDPCPTCPTDLLG GPSVFIFPPKPKDVLMSLTPKITCVVVDVSEEEPDVQFNWYVNN VEDKTAQTETRQRQYNSTYRVVSVLPIKHQDWMMSGKVFCKCKVN NNALPSPIEKTISKPRGQVRVPQIYTFPPPIEQTVKKDVSVTCLVTG FLPQDIHVEWESNGQPQPEQNYKNTQPVLDSDGSYFLYSKLNVP KSRWDQGDSFTCSVIHEALHNHMTKTISRSLGNGGGGSEVEKT ACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFT YEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNV TSLETLKALLEVNKGHEMSPQAPRRPLPQVATLIDRFVKGRGQLD KDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSIWAVRPQDLDTCDPRQ LDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNV SMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPV RDWILRQRQDDDLDTLGLGLQ
配列番号178	hPD1L1	FTVTVPKDLVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDK NIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQ DAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVITSEH ELTCQAEQYKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVSTST LRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTGGGG SGLNDIFEAQKIEWHEGGGGSHHHHHHHH
配列番号182	hIL2Rα	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMNLNCECKRGFRRIKSGSLYM LCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEM QSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQC VQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGGGGGSGGGG SGLNDIFEAQKIEWHEGGGGSHHHHHHHH
配列番号180	hNKp30	LWVSQPPEIRTELEGSSAFLPCSFNASQGRLAIGSVTWFRDEVVPG KEVRNGTPEFRGRLAPLASSRFLHDHQAELHIRDVRGHDASIYVC RVEVLGLGVGTGNGTRLVVEKEGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGG GGGGSGLNDIFEAQKIEWHE
配列番号179	hNKp46	TEMYDTPTLVHPGPEVISGEKVTFYCRLDTATSMFLLKEGRSS HVQRGYGVQAEFPLGPVTTAHRGTYRCFGSYNNHAWSPSEP KLLVTGDIENTSLAPEDPTFPDWTGTYLLTTETGLQKDHAWDH TAQNGGGGSGGGGSEPRDTDTCNPPDPCPTCPTDLLGGPSVFI FPPKPKDVLMSLTPKITCVVVDVSEEEPDVQFNWYVNNVEDKT AQETETRQRQYNSTYRVVSVLPIKHQDWMMSGKVFCKCKVNNALP SPIEKTISKPRGQVRVPQIYTFPPPIEQTVKKDVSVTCLVTGFLPQD IHVEWESNGQPQPEQNYKNTQPVLDSDGSYFLYSKLNVPKSRWD QGDSFTCSVIHEALHNHMTKTISRSLGNGGGGSGGGGSGLNDIF EAQKIEWHE

【 0 7 4 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 7】

表 9. 多重特異性分子を生成するのに使用される配列

多重特異性 分子	重鎖 1	軽鎖 1	重鎖 2	軽鎖 2
1	配列番号 168	配列番号 169	配列番号 196	
2	配列番号 174	配列番号 169	配列番号 196	
3	配列番号 174	配列番号 169	配列番号 197	
4	配列番号 176		配列番号 196	
5	配列番号 172	配列番号 173	配列番号 192	配列番号 171
6	配列番号 172	配列番号 173	配列番号 177	配列番号 171
7	配列番号 193	配列番号 173	配列番号 192	配列番号 171
8	配列番号 193	配列番号 173	配列番号 177	配列番号 171
9	配列番号 194	配列番号 173	配列番号 192	配列番号 171
10	配列番号 194	配列番号 173	配列番号 177	配列番号 171
11	配列番号 195	配列番号 173	配列番号 192	配列番号 171
12	配列番号 195	配列番号 173	配列番号 177	配列番号 171
13	配列番号 187		配列番号 185	配列番号 184
14	配列番号 188		配列番号 183	配列番号 184
15	配列番号 189		配列番号 183	配列番号 184
16	配列番号 188		配列番号 185	配列番号 184
17	配列番号 189		配列番号 185	配列番号 184
18	配列番号 187		配列番号 183	配列番号 184
19	配列番号 187		配列番号 186	配列番号 184
20	配列番号 189		配列番号 186	配列番号 184
21	配列番号 190	配列番号 169	配列番号 186	配列番号 184
22	配列番号 190	配列番号 169	配列番号 192	配列番号 191
23	配列番号 168	配列番号 169	配列番号 192	配列番号 171

【0 7 4 1】

10

20

30

40

50

【表 3 8】

表10. 核酸配列

配列ID	説明	核酸配列
配列番号88	2x4GSリンカー	GGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGCAGC
配列番号89	ヒトCH2、 CH3ノブ	GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCCCCTGAGCTGCTGGG CGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCAAAGCCCCAAGGACACCCTG ATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGT CCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAA CAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCC CTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CCCGCGAACCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCCTGCCGGGAAGAGAT GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGCCTGGTCAAGGGCTTCTAC CCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAG ACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTT CTTCCTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAG GGCAATGTGTTTCAGCTGTAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAGTAATGA
配列番号90	ヒトCH2、 CH3ホール	GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCCCCTGAGCTGCTGGG CGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCTCCAAAGCCCCAAGGACACCCTG ATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGT CCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAA CAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCC CTGCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CTAGAGAGCCTCAGGTCTGCACCCTGCCTCCCAGCCGGGAAGAGAT GACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTAC CCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAG ACAACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTT CTTCCTGGTGTCCAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAG GGCAATGTGTTTCAGCTGTAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCTCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAGTAATGA

10

20

30

【 0 7 4 2】

40

50

【表 3 9】

配列番号91	CH1	GCCAGACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCTCTGGCCCCCTAGCTCTAA GAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAT TACTTTCTGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACCTGGTGTCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTG TACAGCCTGTCTAGCGTGGTACAGTGCCTAGCAGCAGCCTGGGCA CACAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGCGGGTGGAAACCAAGAGCTGC
配列番号92	CL(κ)	AGAACAGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCACCCAGCGACG AGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCAGCGTCGTGTGCCTGCTGAACAA CTTCTACCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCC CTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGACAGC AAGGACTCCACCTACAGCCTGTCCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGG CCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCA GGGCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAATAGAGGCGAGTGC TAATGA
配列番号93	CL(λ)	GGCCAGCCCAAGGCCAACCCACCGTGACCCTGTTCCTCCATCCTC CGAGGAACTCAGGCTAACAAGGCCACCCTCGTGTGCCTGATCTCC GACTTCTACCCTGGCGCCGTGACCGTGGCTTGGAAGGCTGATGGCT CTCCTGTGAAGGCCGCGTGGAAACCACCAAGCCCTCCAAGCAGTC CAACAACAAATACGCCGCTCCAGCTACCTGTCCCTGACCCCTGAG CAGTGGAAGTCCCAACCGTCTACAGCTGCCAGGTACACATGAGG GCTCCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCTACCGAGTGTCTCTAATG A
配列番号94	αPD1L1 アベルマブVH	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCG GCTCTCTGAGACTGTCTTGTCGCCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGC TATATCATGATGTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGAAT GGGTGTCTCTATCTACCCCTCCGGCGGCATACCTTTTACGCCGAC ACCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGAACAACCTCAAGAACA CCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGT GTACTACTGCGCTAGAATCAAGCTGGGCACCGTGACCACCGTGGAC TATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
配列番号95	αPD1L1 アベルマブVL	CAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCTGTGTCTGGCTCCCCTGGCCA GTCCATCACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTCCGACGTGGGCGGCT ACAACCTACGTGTCTGGTATCAGCAGCATCCCGGCAAGGGCCCTAA GCTGATGATCTACGACGTGTCCAACCGGCCCTCCGGCGTGTCCAATC GGTCTCTGGCTCCAAGTCCGGCAACACCGCCTCCCTGACAATCAGC GGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCTCTCTCTACA CCTCCAGCTCTACCCGGGTGTTCCGGCACCGGCACCAAGTGACAGT GCTG
配列番号96	3x4GSリンカー	GGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGAGGCGGTGGATCT
配列番号97	αNKp46 VH	CAGGTTCAAGTTCAGCAGTCCGGACCTGAGCTGGTTAAGCCTGGCG CTTCCGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCCGGCTACACCTTACCCGAC TACGTGATCAACTGGGGCAAGCAGAGATCTGGCCAGGGACTCGAGT GGATCGGCGAGATCTATCCTGGCTCCGGCACCAATTACTACAACGA GAAGTTCAAGGCTAAGGCTACCCTGACCGCCGACAAGTCTCTCAAT ATCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCTCTGAGGACTCCGCTGT GTACTTCTGCGCTCGGAGAGGCAGATACGGCCTGTATGCCATGGAT TACTGGGGACAGGGAACCAAGTGTGACAGTGTCAAGT

10

20

30

40

【0 7 4 3】

50

【表 4 0】

配列番号98	αNKp46 VL	GATATTCAGATGACCCAGACCACCTCCAGCCTGTCCGCTTCTCTGGG CGACAGAGTGACAATCAGCTGCAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAA CTACCTGAACTGGTATCAACAGAAACCCGACGGCACCGTGAAGCTG CTGATCTACTACACCTCTCGGCTGCACTCTGGCGTGCCCTCTAGATT TTCTGGCAGCGGAAGCGGCACCGACTATTCCCTGACCATCAACAAC CTGGAACAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCAAGGCAACA CCCGGCCTTGACATTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAAATCAAGTG ATGA
配列番号99	4x 4GSリンカー	GGTGGCGGAGGAAGCGGCGGAGGCGGCTCTGGTGGTGGTGGTCTG GTGGCGGTGGCTCC
配列番号102	1x4GS	GGCGGCGGAGGCTCC
配列番号198	MMP2	TACAACCTTCTTCCCACGGAAACCCAAGTGGGACAAGAACCAGATCA CCTACCGGATCATCGGCTACACCCCTGACCTGGATCCTGAGACAGT GGACGATGCCCTTCGCCAGAGCCTTCCAAGTTTGGAGCGACGTGACC CCTCTGCGGTTTCTCCAGAATCCATGATGGCGAGGCCGACATCATGA TCAACTTCGGCAGATGGGAGCACGGCGACGGCTACCCTTTTGATGG CAAGGATGGCCTGTCTGGCCACGCTTTTGCCCTGGAACAGGTGTT GGCGGCGACTCTCACTTCGACGACGATGAGTTGTGGACCTCGGCG AAGGACAGGTCTGTCAGAGTGAAGTACGGCAACGCCGATGGCGAGT ACTGCAAGTTCCCTTCTCTGTTCAACGGCAAAGAGTACAACCTCTGC ACCGACACCGGCAGATCTGACGGCTTCTGTGGTGTCTCCACCACCT ACAACCTTGAGAAGGACGGCAAATACGGCTTCTGCCCTACGAGGC CCTGTTTACCATGGGCGGAAATGCTGAGGGCCAGCCATGCAAGTTT CCATTCCGGTTCCAAGGGACCTCTACGACAGCTGTACCACCGAGG GAAGAACCGATGGCTATCGTTGGTGCGGCACCACAGAGGACTACGA CAGAGACAAGAAGTATGGCTTCTGTCCCGAGACAGCCATGTCTACC GTCGGCGGCAATTCTGAAGGCGCCCCCTGTGTGTTCCCTTTACCTT CCTGGGCAACAAATACGAGTCTCTGCACCTCCGCTGGCCGCTGTGAT GGAAAAATGTGGTGGCTACCACCGCCAACCTACGACGACGACAGA AAGTGGGGCTTTTGTCTGACCAGGGCTACTCCCTGTTTCTGGTGGC CGCTCACGAGTTTGGCCATGCTATGGGCCTCGAGCACTCTCAAGATC CCGGTGCATGATGGCCCCCTATCTACACCTACACCAAGAACTTCCG GCTGTCCCAGGACGACATCAAGGGCATCCAAGAGCTGTACGGCGCC TCTCCTGATATCGATCTCGGCACCGGACCTACTCCTACACTGGGACC TGTGACACCCGAGATCTGCAAGCAGGACATCGTGTTCGACGGAATC GCCCAGATCCGGGGCGAGATCTTCTTTTAAAGGACCGGTTTATCTG GCGGACAGTGACCCCTAGAGACAAGCCTATGGGACCTCTGCTGGTG GCTACCTTCTGGCCTGAGCTGCCTGAGAAGATCGACGCCGTGTACG AGGCCCTCAAGAGGAAAAGGCCGTCTTTTCGCCGGCAACGAGTA CTGGATCTACTCCGCTTCTACCCTGGAACGGGGCTACCCCAAGCCTC TGACATCTCTGGGACTGCCTCCAGACGTGCAGAGAGTGGACGCCGC CTTCAACTGGTCCAAGAACAAGAAAACCTACATCTTCGCCGGGGAC AAGTTCTGGCGGTACAACGAAGTGAAGAAAAAGATGGACCTGGCT TCCCAAGCTGATCGCCGATGCCTGGAACGCTATCCCCGATAACCT GGACGCTGTGGTGGATCTCCAAGGCGGCGGACACTCTACTTTTCA AGGGCGCTACTACCTGAAGCTGGAAAACAGAGCCTGAAGTCCGT GAAGTTCGGCTCCATCAAGTCCGACTGGCTCGGATGT
配列番号199	HYAL1	TTAGAGGGCCCTCTGCTGCCCAACAGACCCTTACACACCGTGTGGA ACGCCAACACCCAGTGGTGCCTGGAAAGACACGGCGTGGACGTGG ACGTGTCCGTGTTTCGATGTGGTGGCCAACCCCGGCCAGACCTTCAG GGGCCCTGACATGACCATCTTCTACTCCAGCCAGCTGGGCACCTACC CCTACTACACCCCTACAGGCGAGCCTGTGTTTGGCGGCTGCCTCAG

10

20

30

40

【0 7 4 4】

50

【表 4 1】

		AACGCCTCTCTGATCGCTCACCTGGCCCCGGACCTTCCAGGACATCCT GGCTGCTATCCCTGCCCCGACTTTTCTGGCCTGGCCGTGATCGATT GGGAGGCCTGGCGACCTAGATGGGCCTTCAACTGGGACACCAAGGA CATCTACCGGCAGCGGTCCAGAGCCCTGGTGCAGGCTCAGCATCCT GATTGGCCTGCCCCTCAGGTGGAAGCCGTGGCCCAGGATCAGTTTC AGGGCGCTGCCAGAGCTTGGATGGCTGGCACACTGCAGCTGGGAAG GGCCCTGAGGCCTAGAGGACTGTGGGGCTTCTACGGCTTCCCCGAC TGCTACAACCTACGACTTCCTGTCCCCCAACTACACCGGCCAGTGCCC CTCTGGAATCCGGGGCCAGAATGATCAGCTGGGCTGGCTGTGGGGC CAGTCTAGAGCCCTGTACCCCTCCATCTACATGCCCGCCGTGCTGGA AGGCACCGGCAAGTCCCAGATGTACGTGCAGCACAGAGTGGCCGA GGCCTTCAGGGTGGCAGTGGCTGCTGGCGATCCTAACCTGCCCCGTG CTGCCCTACGTGCAGATCTTCTACGATACCACCAACCCTTTCTGCC CCTGGACGAGCTGGAACACTCCCTGGGAGAGTGTGCTGCTCAGGGT GCTGCAGGCGTGGTGTCTGTGGGTGTCTGGGAGAACACCCCGACCA AAGAGTCCTGCCAGGCCATCAAAGAGTACATGGACACCACCCCTGGG CCCCCTTCATCTGAACGTGACCTCTGGCGCCCTGCTGTGTAGCCAGG CTCTGTGTTCTGGCCACGGCAGATGCGTGCGGAGAACCTCTCACCT AAGGCTCTGCTGCTGCTGAACCCCGCCTCCTTCAGCATCCAGCTGAC ACCTGGCGGCGGACCCCTGTCTCTGAGAGGTGCTCTGTCCCTGGAA GATCAGGCCAGATGGCCGTGGAATTCAAGTGCCGGTGCTACCCCTG GCTGGCAGGCCCTTGGTGCGAGCGGAAATCTATGTGG	10
配列番号200	α FAP重鎖	CAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCG CCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGACCTCTCGGTACACCTTTACCGAG TACACCATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCCAGAGACTGGAAT GGATCGGCGGCATCAACCCCAACAACGGCATCCCCAACTACAACCA GAAATTCAAGGGCCGCGTGACCATACCGTGGACACCTCTGCTTCT ACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCG TGTAATACTGCGCCAGAAGAAGAATCGCCTACGGCTACGATGAGGG CCACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACCGTGTC TCT	20
配列番号201	α FAP軽鎖	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCTCTGGCCGTGTCTCTGGG CGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCTCAGTCCCTGCTGTACT CCCGGAACCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGG CCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTTCTGGGCCTCCACCAGAGAATCTG GCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTTTGGCACCGACTTTACC CTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACT GCCAGCAGTACTTCAGCTACCCTCTGACCTTTGGCCAGGGCACCAA GGTGGAATCAAG	30
配列番号111	hIL2 F42A Y45A	GTCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAACCCAGCTGCAGTTGGAGC ATCTGCTGCTGGACCTCCAGATGATCCTGAATGGCATCAACAATTAC AAGAACCCCAAGCTCACCCGGATGCTGACCGCCAAGTTTGCCATGC CTAAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTGGAAGAGG AACTGAAGCCCCTGGAAGAAGTGCTGAATCTGGCCAGTCCAAGAA CTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCTGATCTCCAACATCAACGTGATCG TGCTCGAGCTGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCATGTGCGAGTACGC CGACGAGACAGCTACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGGATCACC TTCTGTCACTCCATCATCAGCACCTGACC	40

【0 7 4 5】

【表 4 2】

表 11. ORF を構築するのに使用される配列

構築物 配列番号	N 末端	リンカー	可変	定常	Fc	リンカー	C 末端
配列番号 202			配列番号 200	配列番号 91	配列番号 89		
配列番号 203			配列番号 201	配列番号 92			
配列番号 204			配列番号 200	配列番号 91	配列番号 90	配列番号 96	配列番号 198
配列番号 205	配列番号 198	配列番号 96			配列番号 90		
配列番号 206			配列番号 200	配列番号 91	配列番号 89	配列番号 96	配列番号 111
配列番号 207			配列番号 200	配列番号 91	配列番号 90	配列番号 96	配列番号 199
配列番号 208			配列番号 94	配列番号 91	配列番号 89		
配列番号 209			配列番号 94	配列番号 91	配列番号 89	配列番号 96	配列番号 111
配列番号 210			配列番号 97	配列番号 91	配列番号 90	配列番号 96	配列番号 199
配列番号 211			配列番号 98	配列番号 92			
配列番号 121			配列番号 95	配列番号 93			
配列番号 212	配列番号 199	配列番号 16			配列番号 90		

【 0 7 4 6 】

10

20

30

40

50

【表 4 3】

表12. ORFの核酸配列

配列ID	核酸配列
配列番号202	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGACAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTG AAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCCTGCAAGACCTCTCGGTA CACCTTTACCGAGTACACCATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCC AGAGACTGGAATGGATCGGCGGCATCAACCCCAACAACGGCATCCC CAACTACAACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCATCACCGTGGAC ACCTCTGCTTCTACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCTGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAAGAAGAATCGCCTACGGC TACGATGAGGGCCACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGAACACTGG TCACCGTGTCTCTGCCTCTACAAAGGGCCCCCTCTGTGTTCCCTCTGG CTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACCTC TGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACACCTTTCAGCTGTGCTGCAAT CTTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTGCTGACAGTGCCTTCTAGCT CTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGA CCCACACCTGTCCACCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCT TCCGTGTTCTCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCT CGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGG ACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTAC AGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGATTGGCTGAACG GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCC TATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCC CAGGTTTACACCCTGCCTCCATGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACC AGGTGTCCCTGTGGTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATC

10

20

【0 7 4 7】

30

40

50

【表 4 4】

	GCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAACACTACAAG ACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAG CAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTC TCCTGTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAA GTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAGTGATGA
配列番号203	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACCGGCGACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCTCTGG CCGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCTCAG TCCCTGCTGTACTCCCGGAACCAGAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCA GCAGAAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTTCTGGGCCCTCCA CCAGAGAATCTGGCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTTTGGC ACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGC CGTGTAATACTGCCAGCAGTACTTCAGCTACCCTCTGACCTTTGGCC AGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTTCCGT GTTCATCTTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCT CTGTCGTGTGCTGCTGAACAACCTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTG CAGTGGAAAGGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGT CTGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCC ACACTGACCTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACG CCTGCGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCT TTCAACCGGGGCGAGTGCTGATGA
配列番号204	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGACAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTG AAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCTTCAAGACCTCTCGGTA CACCTTTACCGAGTACACCATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCC AGAGACTGGAATGGATCGGCGGCATCAACCCCAACAACGGCATCCC CAACTACAACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCATACCGTGGAC ACCTCTGCTTCTACCGCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCTGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAAGAAGAATCGCCTACGGC TACGATGAGGGCCACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGAACACTGG TCACCGTGTCTCTGCTCTACAAAGGGCCCTCTGTGTTCCCTCTGG CTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACTC TGGCGCTCTGACATCCCGCGTGCACACCTTTCAGCTGTGCTGCAAT CTTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTCTGACAGTGCCTTCTAGCT CTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAAACCAAGTCTTGCAGACAAGA CCACACCTGTCCACCATGTCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCT TCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCT CGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTACGAGG ACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTAC AGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGATTGGCTGAACG GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCC TATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAACCT CAAGTCTGTACCCTGCCTCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACC AGGTGTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCTGATATC GCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAACACTACAAG ACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGGTGTCC AAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTCT CCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAA GTCCCTGTCTCTGTCCCCTGGCAAAGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAG GTGGAAGCGGCGGAGGCGGCTCTTACAACCTTCTTCCACGGAACCC CAAGTGGGATAAGAACCAGATCACCTACCGGATCATCGGCTACACC

10

20

30

40

【0 7 4 8】

50

【表 4 5】

	CCTGACCTGGATCCTGAGACTGTGGACGATGCCTTCGCCAGGGCCTT CCAAGTTTGGAGCGACGTGACCCCTCTGCGGTTCTCCAGAATCCATG ATGGCGAGGCCGACATCATGATCAACTTCGGCAGATGGGAGCACGG CGACGGCTACCCCTTTGATGGCAAGGATGGCCTGCTGGCCACGCTT TTGCCCTGGAACAGGTGTTGGCGGCGACTCTCACTTCGACGACGAT GAGTTGTGGACCCTCGGCGAAGGACAGGTTCGTACAGGTGAAGTACG GCAACGCCGATGGCGAGTACTGCAAGTTCCTTCTGTTCATATGGG AAAGAGTATAACTCCTGCACCGACACCGGCAGATCTGACGGCTTCCT GTGGTGCTCCACCACCTACAACCTTCGAGAAGGACGGCAAATACGGC TTCTGCCCTCACGAGGCTCTGTTCAACCATGGGCGGAAATGCTGAGGG ACAGCCCTGCAAGTTTCCATTTCAGATTCCAAGGGACCTCCTACGACT CTTGACACCACCGAGGGAAGAACCGATGGCTATCGTTGGTGCGGCAC CACAGAGGACTACGACCGGGACAAGAAGTATGGCTTCTGTCCCGAG ACAGCCATGTCTACCGTCGGCGGCAATTCTGAGGGTGCCCTTTCGCT GTTCCCTTTCACCTTCTTGGGCAACAAATACGAGTCTGACCTCCG CTGGCAGATCCGATGGAAAGATGTGGTGCGCTACCACCGCCAACTA CGACGACGACAGAAAGTGGGGCTTTGTCTTGACAGGGGTACAGC CTGTTTCTGGTGGCCGCTACGAGTTCGGCCATGCTATGGGACTCGA GCACTCTCAAGATCCCGGCGCACTGATGGCCCCCTATCTACACCTACA CCAAGAACTTCGGGCTGTCCAGGACGACATCAAGGGCATCCAAGA GCTGTACGGCGCCTCTCTGATATCGATCTCGGCACCGACCTACTC CTACACTGGGACCTGTGACACCCGAGATCTGCAAGCAGGATATCGT GTTTCGACGGAATCGCCAGATCCGGGGCGAGATCTTCTTTTAAAGG ACCGCTTCATTTGGCGGACCGTGACTCCTCGGGACAAGCCTATGGGA CCTCTGCTGGTGGCTACCTTCTGGCCTGAACTGCCCGAGAAGATCGA TGCCGTGTACGAGGCCCCCTCAAGAGGAAAAGGCCGTCTTTTCGCCG GCAACGAGTACTGGATCTACTCCGCTAGCACCCCTGGAACGGGGCTA CCCTAAGCCTCTGACTTCTCTGGGACTGCCACCTGACGTGCAGCGAG TGGATGCCGCCTTCAACTGGTCCAAGAACAAGAAAACCTATATCTTC GCCGGGGACAAGTCTTGCGGTTACAACGAAGTCAAGAAAAAGATGG ACCCTGGCTTCCCCAAGCTGATCGCCGATGCCTGGAACGCTATCCCC GATAACCTGGACGCTGTGGTGGACTTGCAAGGCGGCGACACTCT ACTTTTCAAGGGCGCCTACTACCTGAAGCTGGAAAACGAGAGCCTG AAGTCCGTGAAGTTCGGCTCCATCAAGTCCGACTGGCTGGGCTGCTG ATGA	10
配列番号205	ATGGAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGCTCTACCGGCTACAACCTTCTTCCACGGAAACCCAAGTGGGACA AGAACCAGATCACTACCGGATCATCGGCTACACCCCTGACCTGGAT CCTGAGACAGTGGACGATGCCTTCGCCAGAGCCTTCCAAGTTTGGAG CGACGTGACCCCTCTGCGGTTCTCCAGAATCCATGATGGCGAGGCCG ACATCATGATCAACTTCGGCAGATGGGAGCACGGCGACGGCTACCC TTTTGATGGCAAGGATGGCCTGCTGGCCACGCTTTTGCCCTGGAA CAGGTGTTGGCGGCGACTCTCACTTCGACGACGATGAGTTGTGGACC CTCGGCGAAGGACAGGTTCGTACAGAGTGAAGTACGGCAACGCCGATG GCGAGTACTGCAAGTTCCTTCTGTTCACGGCAAAGAGTACAAC TCCTGCACCGACACCGGCAGATCTGACGGCTTCTGTGGTGCTCCAC CACCTACAACCTTGAGAAGGACGGCAAATACGGCTTCTGCCCTCACG AGGCCCTGTTTACCATGGGCGGAAATGCTGAGGGCCAGCCATGCAA GTTTCCATTCCGGTTCCAAGGGACCTCCTACGACAGCTGTACCACCG AGGGAAGAACCAGTGGCTATCGTTGGTGCGGCACCAAGAGGACTA CGACAGAGACAAGAAGTATGGCTTCTGTCCCGAGACAGCCATGTCT ACCGTCGGCGGCAATTCTGAAGGCGCCCTTGTGTGTTCCTTTTCAC CTTCTGGGCAACAAATACGAGTCTGCACCTCCGCTGGCCGCTCTG ATGGA AAAATGTGGTGCGCTACCACCGCCAACTACGACGACGACAG AAAGTGGGGCTTTTGTCTGACCAGGGCTACTCCCTGTTTCTGGTGG	30
		40

【0 7 4 9】

【表 4 6】

	CCGCTCACGAGTTTGGCCATGCTATGGGCCTCGAGCACTCTCAAGAT CCCGGTGCAGTATGGCCCTATCTACACCTACACCAAGAAGTCCG GCTGTCCCAGGACGACATCAAGGGCATCCAAGAGCTGTACGGCGCC TCTCCTGATATCGATCTCGGCACCGGACCTACTCTACACTGGGACC TGTGACACCCGAGATCTGCAAGCAGGACATCGTGTTGACGGAATC GCCCAGATCCGGGGCGAGATCTTCTTTTAAAGACCGGTTTCACTG GCGGACAGTGACCCCTAGAGACAAGCCTATGGGACCTCTGCTGGTG GCTACCTTCTGGCCTGAGCTGCCTGAGAAGATCGACGCCGTGTACGA GGCCCCCTCAAGAGGAAAAGGCCGTCTTTTTCGCCGGCAACGAGTACT GGATCTACTCCGCTTCTACCTTGGAAACGGGGCTACCCCAAGCCTCTG ACATCTCTGGGACTGCCTCCAGACGTGCAGAGAGTGGACGCCGCCTT CAACTGGTCCAAGAACAAGAAAACCTACATCTTCGCCGGGGACAAG TTCTGGCGGTACAACGAAGTGAAGAAAAAGATGGACCCCTGGCTTCC CCAAGCTGATCGCCGATGCCTGGAACGCTATCCCCGATAACCTGGAC GCTGTGGTGGATCTCCAAGGCGGCGGACACTCTACTTTTCAAGGG CGCCTACTACCTGAAGCTGGAACCAAGAGCCTGAAGTCCGTGAAG TTCGGCTCCATCAAGTCCGACTGGCTCGGATGTGGTGGCGGAGGAA GCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGTGGCGGATCTGATAAGACCCACAC CTGTCCACCTTGCTCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTT CCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCC CTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCAGA AGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCC AAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACAGAGTGG TGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGATTGGCTGAATGGGAAAGA GTATAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAA AGACCATCAGCAAGGCCAAGGGACAGCCCCGGGAACCTCAAGTCTG TACCCTGCCTCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCC CTGTCTTGCGCCGTGAAGGGCTTTTACCCCTCCGATATCGCCGTGGA ATGGGAGTCTAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACACCT CCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTCTCTGGTGTCCAAGCTGAC TGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCTCCG TGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCTCTGAG CCTGTCTCCTGGCAAGTGATGA	10
配列番号206	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGACAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTG AAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCTGCAAGACCTCTCGGTA CACCTTTACCGAGTACACCATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCC AGAGACTGGAATGGATCGGCGGCATCAACCCCAACAACGGCATCCC CAACTACAACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCATCACCGTGGAC ACCTCTGCTTCTACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAGATCTGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAAGAAGATCGCCTACGGC TACGATGAGGGCCACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGAACACTGG TCACCGTGTCTCTGCCTCTACAAAGGGCCCCCTCTGTGTTCCCTCTGG CTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAATC TGGCGCTCTGACATCCGGCGTGACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAT CTTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTCGTGACAGTGCCTTCTAGCT CTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGAACCCAAGTCTCGGACAAGA CCCACACCTGTCCACCATGTCCTGCTCCAGAACTGTCGGCGGACCT TCCGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCT CGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGG ACCCAGAAAGTGAAGTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTAC AGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACACAGGATTGGCTGAACG	20
		30
		40

【0 7 5 0】

【 0 7 5 1 】

	GCAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCCAACCAAGGCCCTGCCTGCTCC TATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCC CAGGTTTACACCCTGCCTCCATGCCGGAAGAGATGACCAAGAACC AGGTGTCCCTGTGGTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATC GCGGTGGAATGGGAGAGCAATGGCCAGCCAGAGAACAATAACAAG ACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTCTGTACAG CAAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTT TCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAA GTCCCTGTCTCTGTCCCTGGCAAAGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAG GTGGAAGCGGCGGAGGCGGATCTGCTCCTACATCCTCCAGACCAA GAAAACCCAGCTGCAGTTGGAGCATCTGCTGCTGGACCTGCAGATG ATCCTGAATTGGCATCAACAATTACAAGAACCCCAAGCTGACCCGGA TGCTGACCGCCAAGTTTGCCATGCCTAAGAAGGCCACCGAGCTGAA ACATCTGCAGTGCCTGGAAGAGGAACTGAAGCCCTGGAAGAAGTG CTGAATCTGGCCCAGTCCAAGAACTTCCACCTGAGGCCTCGGGACCT GATCTCCAACATCAACGTGATCGTGTCTCGAGCTGAAGGGCTCCGAG ACAACCTTCATGTGCGAGTACGCCGACGAGACAGCTACCATCGTGG AATTTCTGAACCGGTGGATCACCTTCTGCCAGTCCATCATCAGCACC CTGACCTGATGA
配列番号207	ATGGAACCCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGACAGGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTG AAGAAACCTGGCGCCTCTGTGAAGGTGTCTTCAAGACCTCTCGGTA CACCTTTACCGAGTACACCATCCACTGGGTCCGACAGGCTCCAGGCC AGAGACTGGAATGGATCGGCGGCATCAACCCCAACAACGCGATCCC CAACTACAACCAGAAATTCAAGGGCCGCGTGACCATACCCGTGGAC ACCTCTGCTTCTACCGCCTACATGGAACTGTCCAGCCTGAGATCTGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAAGAAGAATCGCCTACGGC TACGATGAGGGCCACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGAAACACTGG TCACCGTGTCTCTGCCTCTACAAAGGGCCCCCTCTGTGTTCCCTCTGG CTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGTGTC CTGGTCAAGGACTACTTTCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACCTC TGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCAAT CTTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTTCCGTCTGTGACAGTGCCTTCTAGCT CTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAAACCAAGTCTTCCGACAAGA CCCAACCTGTCCACCATGTCTGTCTCCAGAACTGTCTCGGCGGACCT TCCGTGTTCTCTGTTTCTTCCAAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCTCT CGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGG ACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTAC AGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAAGGATTTGGCTGAACG GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTTCC TATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAACCT CAAGTCTGTACCCTGCCTCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACC AGGTGTCCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCTGATATC GCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAACACTACAAG ACAACCCCTCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTCTGGTGTCC AAGCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCT CCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAA GTCCCTGTCTCTGTCCCTGGCAAAGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAG GTGGAAGCGGCGGAGGCGGATCTTTAGAGGACCTCTGCTGCCCAA CCGGCCTTTCACCACAGTGTGGAACGCTAACACCCAGTGGTGCCTGG AAAGACACGGCGTTGACGTGGACGTGTCCGTGTTTCGATGTGGTGGCT AATCCCGGCCAGACCTTCAGAGGCCCTGACATGACCATCTTCTACTC CAGCCAGCTGGGCACCTATCCTTACTACACCCCTACAGGCGAGCCCC

40

【表 4 8】

	TGTTTGAGGGCTTGCCTCAGAAATGCCAGCCTGATCGCTCACCTGGCC AGAACCTTTCAGGACATCCTGGCTGCTATCCCCGCTCCTGACTTTTCC GGACTGGCCGTGATCGATTGGGAAGCCTGGCGACCTAGATGGGCCCT TCAACTGGGACACCAAGGACATCTACCGGCAGCGGTCTAGAGCACT GGTGCAGGCTCAACATCCTGACTGGCCTGCTCCACAGGTTGAGGCTG TTGCCCAGGATCAGTTTCAGGGCGCTGCCAGAGCTTGGATGGCTGGA ACATTGCAGCTGGGGAGAGCCCTGAGGCCTAGAGGACTGTGGGGCT TTTACGGCTTCCCCGACTGCTACAACTACGACTTCCTGTCTCCTAACT ACACCGGCCAGTGTCTTCCGGCATCAGAGCCCAGAATGATCAGCTC GGATGGCTCTGGGGACAGTCCAGGGCTCTGTACCCCTCCATCTACAT GCCTGCTGTCTTGGAAGGCACCGGCAAGTCCCAGATGTACGTGCAG CATAGAGTGGCCGAGGCCTTCAGAGTGGCTGTTGCTGCTGGCGATCC TAACCTGCCTGTGCTGCCTTACGTGCAGATCTTCTACGATACCACCA ACCACTTTCTGCCCCTGGACGAGCTGGAACACTCCCTGGGAGAATCT GCTGCTCAAGGTGCTGCAGGCGTGGTGTGTGGGTGTCTGGGAAAA CACCCGGACCAAAGAGTCTGCCAGGCCATCAAAGAGTATATGGAC ACCACACTGGGCCCCCTTCATCCTGAACGTGACATCTGGCGCACTGCT GTGCAGCCAGGCACTGTGTTCTGGACACGGAAGATGCGTGCAGGAGA ACCTCTCATCCCAAGGCTCTGCTGCTGCTGAACCCTGCCAGCTTCTCC ATCCAGTTGACACCAGGCGGAGGCCCTCTGTCTTTGAGAGGTGCACT GTCCCTGGAAGATCAGGCCAGATGGCTGTGGAATTCAAGTGCAGA TGCTACCCCGGTGGCAAGCTCCTTGGTGGAGAGAAAAGTCCATGTG GTAGTGA	10
配列番号208	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGCGAGGTGCAGCTGTTGGAATCTGGCGGAGGATTG GTTACAGCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCCGGCTTC ACCTTCTCCAGCTATATCATGATGTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAA AGGACTGGAATGGGTGTCTCTATCTACCCCTCTGGCGGCATCACCT TTTACGCCGACACCGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCTCGGACAAC TCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAATCAAGCTGGGCACCGTGAC CACCGTGGATTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTCAACGTGTCTCTG CTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAG TCTACCTCCGGTGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCTCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCCGGCGCTCTGACAT CTGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTCCTCGGCCTGTAC TCTCTCAGCTCTGTCTGTGACCGTGCTTCCAGCTCTCTGGGAACCCA GACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTG GACAAGAGAGTGGAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTC CTCCATGTCTGTCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTGT TTCTTCCAAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAA GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCGAAGTGA AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCAACGCCAAGAC CAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTCC GTGCTGACAGTGTGTCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGAC CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCACAGTTTACACC CTGCCTCCATGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGT GGTGCCTGGTTAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGG GAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTG TGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGA GCCCCGGCAAGTGATGA	20 30 40

【0 7 5 2】

【表 4 9】

配列番号209	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGCGAGGTGCAGCTGTTGGAATCTGGCGGAGGATTG GTTACGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTTCCGGCTTC ACCTTCTCCAGCTATATCATGATGTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAA AGGACTGGAATGGGTGTCCTCTATCTACCCCTCTGGCGGCATCACCT TTTACGCCGACACCGTGAAGGGCAGATTACCATCTCTCGGGACAAC TCCAAGAACACCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAATCAAGCTGGGCACCGTGAC CACCGTGGATTATTGGGGACAGGGCACCTGGTCACCGTGTCTCTG CTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTTCCAGCAAG TCTACCTCCGGTGGAAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTTCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGAACCTCCGGCGCTCTGACAT CTGGCGTGACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTCCTCCGGCCTGTAC TCTCTCAGCTCTGTCTGACCGTGCCTTCCAGCTCTCTGGGAACCCA GACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGTG GACAAGAGAGTGGAAACCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGTC CTCCATGTCTGTCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTCTGT TTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCTGATGATCTCTCGGACCCCTGAA GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCGAAGTGA AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAACGCCAAGAC CAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGCTC GTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCTATCGAAAAGAC CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTTTACACC CTGCCTCCATGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGT GGTGCCTGGTTAAGGGCTTCTACCTTCCGATATCGCCGTGGAATGG GAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACATAAGACAACCCCTCCTG TGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTG GACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGT CTCCCGGAAAAGGCGGAGGTGGAAGCGGCGGAGGCGGATCTGGTGG CGGTGGATCTGCTCCTACCTCCTCCAGCACCAAGAAAACCCAGCTGC AGTTGGAGCATCTGCTGCTGGACCTCCAGATGATCTGAATGGCATC AACAATTACAAGAACCCCAAGCTCACCCGGATGTGACCGCCAAGT TTGCCATGCCTAAGAAGGCCACCGAGCTGAAACATCTGCAGTGCCTG GAAGAGGAACTGAAGCCCTGGAAGAAGTGCTGAATCTGGCCCAGT CCAAGAACTTCCACCTGAGGCCCTCGGGACCTGATCTCCAACATCAAC GTGATCGTGCTCGAGCTGAAGGGCTCCGAGACAACCTTCATGTGCGA GTACGCCGACGAGACAGCTACCATCGTGGAATTTCTGAACCGGTGG ATCACCTTCTGTGAGTCCATCATCAGCACCTGACCTGATGA	10
配列番号210	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACAGGACAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGCCCTGAACTT GTGAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTA CACCTTACCGACTACGTGATCAACTGGGGCAAGCAGAGATCTGGC CAGGGCCTCGAGTGGATCGGCGAGATCTATCCTGGCTCCGGCACCA ACTACTACAACGAGAAAGTTCAAGGCCAAGGCTACCCTGACCGCCGA CAAGTCCTCCAATATCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCTGACCTCTG AGGACTCCGCCGTGTACTTCTGCGCCAGAAGAGGCAGATACGGCCT GTACGCCATGGACTATTGGGGCCAGGGCACCTCTGTGACCGTGTCTCT CTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCCTCTGGCTCCTTCCAGC AAGTCTACCTCTGGCGGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA CTACTTTCCTGAGCCTGTGACAGTGTCTTGAACCTCTGGCGCCCTGA CATCCGGCGTGACACATTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTCTGGCCTG TACTCTCTGTCTCCGTCTGTGACCGTGCCTTCTAGCTCTCTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGT	30

40

【0 7 5 3】

【表 5 0】

	GGACAAGAGAGTGGAAACCCAAGTCCTGCGACAAGACCCACACCTGT CCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCCTG TTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTCGGACCCCTGA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCCAAGTG AAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGA CCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGAGTGGTGTC CGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTAC AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAAGA CCATCTCCAAGGCTAAGGGCCAGCCTCGCGAACCCCAAGTCTGTACA CTGCCTCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGT CCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTACCCTTCTGATATCGCCGTGGAATGG GAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTCCTG TGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGGTGTCCAAGCTGACAGTG GACAAGTCCCGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCTGTGAT GCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTGTGT CCCTTGAAAAAGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTGGAAGCGGAG GCGGTGGATCTTTTAGAGGACCTCTGCTGCCCAACCGGCCCTTTCACC ACAGTGTGGAACGCTAACACCCAGTGGTGCCTGGAAGACATGGCG TCGACGTGGACGTGTCCGTGTTGATGTGGTGGCTAATCCCGGCCAG ACCTTCAGAGGCCCGACATGACCATCTTCTACTCCAGCCAGTGGG CACCTATCCTTACTACACCCCTACAGGCGAGCCGTGTTTGGTGGCT TGCTCAGAATGCCTCTCTGATCGCCACCTGGCTAGAACCTTCCAG GATATTCTGGCTGCTATCCCGCTCCTGACTTTTCTGGCCTGGCCGTG ATCGATTGGGAAGCTTGGAGGCCTAGATGGGCCTTCAACTGGGACA CCAAGGACATCTACCGGCAGCGGTCTAGAGCACTGGTGCAGGCTCA ACATCCTGACTGGCCTGCTCCACAGGTTGAGGCTGTTGCCAGGATC AGTTTCAGGGCGCTGCCAGAGCTTGGATGGCTGGAACATTGCAGCTG GGGAGAGCCCTGAGGCCAAGAGGATTGTGGGGCTTTACGGCTTCC CCGACTGCTACAACCTACGACTTCTGTCTCCTAACTACACCGGCCAG TGTCTTCCGGCATCAGAGCCCAGAATGATCAGCTCGGATGGCTCTG GGGACAGTCCAGGGCTCTGTACCCCTCCATCTACATGCCTGCTGTGC TCGAAGGCACCGCAAGTCCCAGATGTACGTGCAGCATAGAGTGGC CGAGGCCCTCAGAGTGGCTGTTGCTGCTGGCGATCCTAACCTGCCTG TGCTGCCTTACGTGCAGATCTTCTACGATACCACCAACCACTTCTGC CCCTGGACGAGCTGGAACACTCCCTGGGAGAATCTGCTGCTCAAGGT GCTGCAGGCGTGGTGTGTGGGTGTCTGGGAAAACACCCGGACCA AAGAGTCCCTGCCAGGCCATCAAAGAGTATATGGACACCACACTGGG CCCTTCATCCTGAACGTGACATCTGGCGCTCTGCTGTGCAGCCAGG CTCTGTGTTCTGGCCATGGTAGATGCGTGGGAGAACCTCTCATCCC AAGGCTCTGCTGCTGCTGAACCCTGCCAGCTTCTCCATCCAGTTGAC ACCAGGCGGAGGCCCTCTGTCTTTGAGAGGTGCACTGTCCCTGGAAG ATCAGGCCAGATGGCTGTGGAATTCAAGTGCAGATGCTACCCCGG CTGGCAAGCTCCTTGGTGCAGAGAGAAAGTCCATGTGGTAGTGA
配列番号211	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCC AGGATCTACCGGCGACATCCAGATGACCCAGACCACCTTAGCCTGT CTGCCTCTCTGGGCGACAGAGTGACCATCTCCTGTAGAGCCAGCCAG GACATCTCCAACCTACCTGAACCTGGTATCAGCAGAAACCCGACGGCA CCGTGAAGCTGCTGATCTACTACACCTCTCGGCTGCACTCTGGCGTG CCCTCTAGATTTTCTGGCTCCGGCTCTGGCACCGACTACTCCCTGACC ATCAACAACCTGGAACAAGAGGATATCGCTACCTACTTCTGCCAGCA AGGCAACACCCGGCCTTGGACATTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAA ATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTTCCGTGTTTATCTTCCACCTTCC GACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCTGTGCTGTGAA CAACTTCTACCCTCGGGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAT GCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACT

10

20

30

40

【0 7 5 4】

【表 5 1】

	CCAAGGACAGCACCTACAGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCAT CAGGGCCTGTCTAGCCCTGTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTG CTGATGA
配列番号121	ATGGAAACCGATACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCC AGGCTCTACCGGCCAGTCTGCTCTGACCCAGCCTGCCTCTGTGTCTG GCTCCCTGGCCAGTCCATCACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTCC GACGTGGGCGGCTACAACCTACGTGTCCTGGTATCAGCAGCATCCCGG CAAGGCCCCCTAAGCTGATGATCTACGACGTGTCCAACCGGCCCTCCG GCGTGTCCAATCGGTTCTCTGGCTCCAAGTCCGGCAACACCGCCTCC CTGACAATCAGCGGACTGCAGGCCGAGGACGAGGCCGACTACTACT GCTCCTCCTACACCTCCAGCTCTACCCGGGTGTTCCGGCACCGGCACC AAAGTGACAGTGCTGGGCCAGCCCAAGGCCAACCCACCGTGACCC TGTTCCCTCCATCCTCCGAGGAAGTGCAGGCTAACAAGGCCACCTC GTGTGCCTGATCTCCGACTTCTACCTGGCGCCGTGACCGTGGCTTG GAAGGCTGATGGCTCTCCTGTGAAGGCCGGCGTGGAACCAACCAAG CCCTCCAAGCAGTCCAACAACAATAACGCCGCTCCAGCTACCTGTC CCTGACCCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACCGGTCCTACAGCTGCCAGG TCACACATGAGGGCTCCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCCTACCGA GTGCTCCTAATGA
配列番号212	ATGGCTGCTCATCTGCTGCCTATCTGCGCCCTGTTCTGACCCTGCTG GATATGGCCCAGGGCTTCAGAGGCCCTCTGCTGCCCAACAGACCCCT CACCACCGTGTGGAACGCCAACACCCAGTGGTGCCTGGAAAGACAC GGCGTGGACGTGGACGTGTCCGTGTTTCGATGTGGTGGCCAACCCCGG CCAGACCTTCAGGGGCCCTGACATGACCATCTTCTACTCCAGCCAGC TGGGCACCTACCCCTACTACACCCCTACAGGCGAGCCTGTGTTGGC GGCCTGCCCTCAGAACGCCTCTCTGATCGCTCACCTGGCCCCGACCTT CCAGGACATCCTGGCTGCTATCCCTGCCCCGACTTTTCTGGCCTGG CCGTGATCGATTGGGAGGCCTGGCGACCTAGATGGGCCTTCAACTGG GACACCAAGGACATCTACCGGCAGCGGTCCAGAGCCCTGGTGCAGG CTCAGCATCCTGATTGGCCTGCCCCCTCAGGTGGAAGCCGTGGCCCAG GATCAGTTTCAGGGCGCTGCCAGAGCTTGGATGGCTGGCACACTGCA GCTGGGAAGGGCCCTGAGGCCTAGAGGACTGTGGGGCTTCTACGGC TTCCCCGACTGCTACAACCTACGACTTCCTGTCCCCCAACTACACCGG CCAGTGGCCCTCTGGAATCCGGGGCCAGAATGATCAGCTGGGCTGGC TGTGGGGCCAGTCTAGAGCCCTGTACCCCTCCATCTACATGCCCGCC GTGCTGGAAGGCACCGGCAAGTCCCAGATGTACGTGCAGCACAGAG TGGCCGAGGCCTTCAGGGTGGCAGTGGCTGCTGGCGATCCTAACCTG CCCGTGCTGCCCTACGTGCAGATCTTCTACGATACCACCAACCACTT TCTGCCCCCTGGACGAGCTGGAACACTCCCTGGGAGAGTCTGCTGCTC AGGGTGTGTCAGGCGTGGTGTGTGGGTGTCTGGGAGAACACCCG GACCAAAGAGTCTGCCAGGCCATCAAAGAGTACATGGACACCACC CTGGGGCCCCCTTCATCCTGAACGTGACCTCTGGCGCCCTGCTGTGTAG CCAGGCTCTGTGTTCTGGCCACGGCAGATGCGTGCGGAGAACCTCTC ACCCTAAGGCTCTGCTGCTGCTGAACCCCGCCTCCTTACGATCCAG CTGACACCTGGCGGCGGACCCCTGTCTCTGAGAGGTGCTCTGTCCCT GGAAGATCAGGCCCAGATGGCCGTGGAATTCAAGTGCCGGTGTCTAC CCTGGCTGGCAGGCCCCCTTGGTGGAGCGGAAATCTATGTGGGGCG GAGGCGGATCAGGCGGCGGAGGATCTGGGGGTGGTGGCTCTGATAA GACCCACACCTGTCTCCCTGCCCTGCCCTGAACTGCTGGGAGGCC CTTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC TCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGA GGACCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGGGTGGAAAGTG

10

20

30

40

【0 7 5 5】

【表 5 2】

	CACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCT ACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAAC GGCAAAGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCCCGCTC CCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGAACC TCAAGTGTGCACCCTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGTCCCTGCGCCGTGAAGGGCTTTTACCCCTCCGATAT CGCTGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAG ACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGGTGTCC AAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCT CCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA GTCCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGTGATGA

10

【 0 7 5 6 】

【表 5 3】

表13. 使用される抗原のDNA配列

配列ID	説明	核酸配列
配列番号141	ヒトPDIL1	ATGAGAATCTTCGCCGTGTTTCATCTTCATGACCTACTGGCATCTGCT GAACGCCTTCACCGTGACCGTGCCCAAGGACCTGTACGTGGTGGAA TACGGCTCCAACATGACCATCGAGTGCAAGTTCCCGTGGAAGATAA AGCTGGACCTGGCCGCCCTGATCGTGTACTGGGAGATGGAAGATAA GAACATCATCCAGTTCGTGCACGGGGAAGAGGACCTGAAGGTGCA GCACTCCTCCTACCGGCAGAGAGCCAGACTGCTGAAGGACCAGCTG TCCCTGGGCAATGCCGCCCTGCAGATCACCGACGTGAAGCTGCAGG ATGCCGGCGTGTACCGGTGCATGATCTCTTACGGCGGAGCCGACTA CAAGCGGATCACCGTGAAAGTGAACGCCCCCTACAACAAGATCAA CCAGCGGATCCTGGTGGTGGACCCCGTGACCTCTGAGCACGAGCTG ACCTGTCAGGCCGAGGGCTACCCTAAGGCCGAAGTGATCTGGACCT CCTCCGACCACCAGGTGCTGTCCGGCAAGACCACCACCAAACTC CAAGCGGGAAGAGAAGCTGTTCAACGTGACCTCCACCCTGCGGATC AACACAACCACCAACGAGATCTTCTACTGTACCTTCCGGCGGCTGG ACCCCGAGGAAAATCACACCGCTGAGCTCGTGATCCCCGAGCTGCC TCTGGCCACCTCCTAATGAGAGAACAGGCGGCGGAGGCTCCGGC CTGAACGACATCTTTGAGGCCAGAAAATCGAGTGGCACGAGGGC GGAGGCGGCTCCCACCATCATCACCACCACCATCACTGATGA

20

30

【 0 7 5 7 】

40

50

【表 5 4】

配列番号213	hFAP	ATGAAGACCTGGGTCAAGATCGTGTTTGGCGTGGCCACCTCTGCTG TGCTGGCTCTGCTGGTCATGTGCATCGTGCTGCGGCTTCCAGAGTG CACAACCTCCGAAGAGAACACCATGCGGGCTCTGACCCTGAAGGAC ATCCTGAACGGCACCTTCAGCTACAAGACCTTCTTTCCCAACTGGAT CTCCGGCCAAGAGTACCTGCACCAGTCCGCCGACAACAATATCGTG CTGTACAACATCGAGACAGGCCAGTCCTACACCATCCTGTCCAACC GGACCATGAAGTCCGTGAACGCCTCCAACCTACGGACTGTCTCCTGA CCGGCAGTTTCGTGTACCTGGAATCCGACTACTCCAAGCTGTGGCGG TACTCCTACACCGCCACCTACTACATCTACGACCTGAGCAACGGCG AGTTCGTGCGGGGAAATGAGCTGCCCAGACCTATCCAGTACCTGTG CTGGTCCCCTGTGGGCTCTAAGCTGGCTTACGTGTACCAGAACAAC ATCTACCTGAAGCAGCGGCTTGGCGACCCTCCATTCCAGATCACCT TCAACGGCAGAGAGAAACAAGATCTTTAACGGCATCCCCGACTGGGT GTACGAGGAAGAGATGCTGCCCCTAAGTACGCCCTCTGGTGGTCC CCTAACGGCAAGTTTCTGGCCTACGCCGAGTTCAACGACAAGGATA TCCCGTGATCGCCTACTCCTACTACGGCGACGAGCAACCGTCG GACCATCAACATCCCTTATCCTAAGGCTGGCGCCAAGAATCCCGTC GTGCGGATCTTCATCATCGACACCACCTATCCTGCCTACGTGGGCCC TCAAGAGGTGCCAGTGCCTGCTATGATCGCCTCCAGCGACTACTAC TTCTCCTGGCTGACATGGGTACCGACGAGCGAGTTTGTCTGCAGT GGCTGAAGCGGGTGCAGAACGTGTCCGTGCTGTCCATCTGCGACTT CAGAGAGGACTGGCAGACCTGGGACTGCCCCAAGACACAAGAGCA CATCGAGGAATCTCGGACCGGATGGGCTGGCGGCTTCTTCGTGTCT AGACCCGTGTTCTCCTACGACGCCATCAGCTACTATAAGATCTTCTC CGACAAGGACGGCTACAAGCACATCCACTACATCAAGGACACCGTC GAGAACGCCATCCAGATTACCTCCGGCAAGTGGGAAGCCATCAATA TCTTCAGAGTGACCCAGGACTCCCTGTTCTACTCCTCCAACGAGTTC GAGGAATACCCCGGACAGCGAACATCTACAGAATCTCCATCGGCA GCTACCCTCCATCCAAGAAATGCGTGACCTGCCACCTGAGAAAAAG GCGGTGCCAGTACTATACCGCCAGCTTCTCTGACTACGCCAAGTAC TACGCCCTCGTGTGTTACGGCCCTGGCATCCCTATCTCTACCTTCA CGATGGCAGAACCGACCAAGAGATCAAGATCCTGGAAGAAAAACAA AGAGCTGGAAAACGCCCTGAAGAACATTAGCTGCCCAAAGAGGA AATCAAGAAGCTGGAAGTCGACGAGATCACCTGTGGTACAAGAT GATCCTGCCTCCTCAGTTCGACCGGTCCAAGAAGTACCCTCTGCTGA TCCAGGTGTACGGCGGACCTTGCTCTCAGTCCGTGAGATCTGTGTTT GCCGTGAATTGGATCTCCTACCTGGCCTCCAAAGAAGGCATGGTTA TCGCCCTGGTGGACGGCAGAGGCACAGCTTTTCAAGGCGACAAGCT GCTGTACGCCGTGTACAGAAAGCTGGGCGTGTACGAAGTGGAAGAT CAGATCACCGCCGTGCGGAAGTTCATCGAGATGGGCTTCATCGACG AGAAGCGGATCGCTATCTGGGGCTGGTCTTACGGCGGCTACGTTTC CTCTCTGGCCCTGGCTTCTGGCACCGGCCTGTTCAAGTGTGGAATCG CTGTTGCCCTGTGTCCTCCTGGGAGTACTATGCCTCTGTGTACACC GAGCGGTTTCATGGGCTGCCTACCAAGGACGACAACCTGGAACACT ACAAGAACAGCACCGTGATGGCCAGAGCCGAGTACTTCCGGAACG TGGACTACCTGCTGATTACGGCACCGCCGACGACAACGTGCACCT CCAAAACAGCGCCAGATCGCCAAGGCTCTGGTCAATGCCAGGTG GACTTTCAGGCCATGTGGTACTCCGACCAGAACCACGGCCTGTCTG GCCTGAGCACCAATCACCTGTACACCCACATGACCCACTTTCTGAA GCAGTGCTTCTCCCTGTCTGATGGCGGCGGAGGCTCTGGACTGAAC GATATCTTCGAGGCCAGAAAAATCGAGTGGCACGAAGGCGGAGGC GGCTCCCACCATCATCATCACCACCATCACTGATGA

10

20

30

40

【0 7 5 8】

【表 5 5】

配列番号143	hNKp46	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGC CAGGATCTACCGGCCAGCAGCAGACACTGCCCAAGCCTTTTATCTG GGCCGAGCCTCACTTCATGGTGCCCAAGAAAAGCAAGTGACCATC TGCTGCCAGGGCAACTACGGCGCTGTGGAATACCAGCTGCACTTCG AGGGCTCCCTGTTCCGCGTGATAGACCTAAGCCTCCTGAGCGGAT CAACAAAGTGAAGTTCTACATCCCCGACATGAACTCCCCGATGGCT GGCCAGTACTCCTGCATCTATAGAGTGGGCGAGCTTTGGAGCGAGC CCTCCAATCTGCTGGATCTGGTGGTCACCGAGATGTACGACACCCC TACACTGAGCGTGACCCCCGACCTGAAGTGATCTCTGGCGAGAAA GTGACCTTCTACTGCAGACTGGATACCGCCACCTCCATGTTTCTGCT GCTCAAAGAGGGCAGATCCTCTCACGTGCAGCGCGGCTATGGAAAG GTGCAGGCTGAGTTTCTCTGGGCCCTGTGACCACCGCTCACAGAG GCACCTACAGATGCTTCGGCTCCTACAACAACCACGCTGGTCTTTC CCATCCGAGCCTGTGAAGCTGCTGGTCACCGGCGACATCGAGAACA CATCTCTGGCCCCTGAGGACCCACCTTTCCTGATACCTGGGGCACC TATCTGCTGACCACCGAGACAGGCCTGCAGAAAGATCACGCCCTGT GGGATCACACCGCTCAGAATGGTGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCG GATCTGAACCTAGAACCGACACCGACACCTGTCTAATCCTCCAGA TCCTTGCTCTACCTGTCCAACACCTGACCTGCTCGGCGGACCTTCCG TGTTTCATCTTCCACCTAAGCCAAAGGACGTGCTGATGATCTCTCTG ACCCCTAAGATCACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCGAAGAGGAAC CCGACGTGCAGTTCAATTGGTACGTGAACAACGTCGAGGACAAGAC AGCCAGACCGAGACACGGCAGCGGCAGTACAACCTCTACCTACAG AGTGGTGTCCGTGCTGCCCATCAAGCACCAGGATGGATGTCCGGC AAGGTGTTCAAGTGCAAAGTGAACAACAACGCCCTGCCTTCTCCAA TCGAAAAGACCATCTCCAAGCCTCGGGGCCAAGTGCGAGTGCCCCA GATCTATACCTTTCCACCTCCTATCGAGCAGACCGTGAAGAAAGAT GTGTCCGTGACCTGCCTCGTGACCGGCTTCCTGCCTCAAGACATCCA TGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTCAGCCTGAGCAGAACTAC AAGAACACCCAGCCTGTGCTGGACTCCGACGGCAGCTACTTCTGT ACTCCAAGCTGAACGTGCCCAAGTCCAGATGGGACAGGCGGACTC CTTACCTGTTCCGTGATCCACGAGGCCCTGACAACCAACCCACATG ACCAAGACCATCAGCAGATCCCTCGGCAATGGCGGTGGTGGTTCTG GCGGCGGAGGTTCCGGACTGAACGATATCTTCGAGGCCCAGAAAAT CGAGTGGCACGAGTGATGA	10
配列番号139	hIL2R α	ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGC CAGGATCTACAGGCGAGCTGTGCGACGATGACCCTCCTGAGATCCC TCACGCCACCTTCAAGGCCATGGCTTACAAAGAGGGCACCATGCTG AACTGCGAGTGCAAGCGGGGCTTCAGACGGATCAAGTCCGGCAGC CTGTACATGCTGTGCACCGGCAACTCCTCTCACTCCTCCTGGGACAA CCAGTGCCAGTGACCTCCTCTGCCACCAGAAACACCACCAAGCAA GTGACCCCTCAGCCTGAGGAACAGAAAGAGCGCAAGACCACCGAG ATGCAGAGCCCCATGCAGCCTGTGGATCAGGCTTCTCTGCCTGGCC ACTGTAGAGAGCCTCCACCTTGGGAGAATGAGGCCACCGAGCGGAT CTACCACTTTGTCTGGGCCAGATGGTGTACTACCAGTGCGTGACAG GGATACAGAGCCCTGCATAGAGGCCCTGCTGAGTCCGTGTGCAAGA TGACCCATGGCAAGACCAGATGGACCCAGCCTCAGCTGATCTGTAC AGGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGTGGATCTGGCCTGAACGA CATCTTCGAGGCCCAGAAAATCGAGTGGCACGAAGGCGGTGGCGG CTCCCACCATCATCATCACCACCATCACTGATGA	30

【表 5 6】

配列番号144	BirA	ATGGAAACTGACACCCTCCTCTTTGGGTGCTGCTGCTTTGGGTGCC TGGATCGACCGGGATGAAGGACAATACCGTGCCTCTGAAGCTCATT GCCCTGCTGGCCAACGGAGAATTCCATTCCGGCGAACAGCTGGGGG AGACTCTCGGGATGTCCCGGGCCGCCATCAACAAGCACATCCAGAC TTTGCGGACTGGGGAGTCGACGTGTTACGGTGCCGGGGAAGGGC TACTCGCTCCCGGAACCGATCCAGCTGCTGAACGCCAAGCAGATT TGGGACAGCTGGATGGCGGAAGCGTGCGCAGTGCTGCCCCGTGATCGA CTCAACCAACCAGTATCTGCTGGATAGAATCGGTGAACTGAAATCC GGCGACGCTTGCATTGCCGAGTACCAACAGGCCGGAAGGGGACGG CGCGGCAGGAAGTGGTTCTCTCCATTCCGGCGGAACCTCTACCTGA GCATGTTCTGGAGATTGGAGCAGGGTCCCGCCGCGGCCATCGGCCT CTCCCTGGTCATCGGCATTGTGATGGCTGAAGTGCTGAGGAAGTTG GGTGCCGACAAGTCCGCGTGAAGTGGCCGAACGACCTGTACCTCC AAGACCGGAAATTGGCGGGGATTCTCGTCGAGCTTACCGGAAAGAC TGGCGATGCCGCACAAATTGTGATCGGGGCGGGAATCAACATGGCG ATGCGACGGGTGGAAGAGAGCGTCGTGAACAGGATGGATCACC CTGCAAGAGGCCGGAATCAACCTGGATCGAACACCCTGGCTGCCA TGCTCATTTCGCGAACTGAGAGCCGCACTGGAGCTGTTTGAGCAGGA GGGTCTGGCCCCCTACCTGTCACGCTGGGAAAAGCTTGATAACTTC ATCAATCGGCCTGTGAAGCTGATCATCGGAGACAAGGAGATTTTCG GCATCTCGAGAGGCATCGACAAACAAGGAGCCCTCCTGCTGGAACA GGACGGAATCATTAAAGCCCTGGATGGGTGGAGAGATCTCCCTGCGG TCCGCCGAAAAGTCCGGGAAGGATGAACTC

10

20

【0 7 6 0】

【表 5 7】

表 14. アミノ酸配列

配列 ID	説明	アミノ酸配列
配列番号 43	2x4GS リンカー	GGGGSGGGGS
配列番号 83	ヒト CH2、CH3 ノブ	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGD SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 82	ヒト CH2、CH3 ホール	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 14	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSC
配列番号 11	CL (κ)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 147	CL (λ)	GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADG SPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS

30

40

【0 7 6 1】

50

【表 5 8】

配列番号 148	α PD1L1 アベルマブ VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLE WVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARIKLGTVTTVDYWGQGLVTVSS
配列番号 149	α PD1L1 アベルマブ VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAP KLMIYDVSNRPSGVSNRFGSGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSY TSSSTRVFGTGKVTVL
配列番号 96	3x4GS リンカー	GGGSGGGSGGGGS
配列番号 150	α NKp46 VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWGKQRSGQGL EWIGEIYPGSGTNYNEKFKAKATLTADKSSNIAYMQLSSLTSEDSA VYFCARRGRYGLYAMDYWGQGSVTVSS
配列番号 151	α NKp46 VL	DIQMTQTSSLSASLGRDVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKL LIYYTSRLHSGVPSRFGSGSGTDYSLTINNLEQEDIATYFCQQGNTR PWTFGGGTKLEIK
配列番号 152	4x 4GS リンカー	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
配列番号 42	1x4GS	GGGGS
配列番号 63	MMP2	YNFFPRKPKWDKNQITYRIIGYTPDLDPETVDDAFARAFQVWSDVT PLRFSRIHDGEADIMINFRWEHGDGYPFDGKDGLLAHAFAPGTGV GGDSHFDDDELWTLGEGQVVRVKYGNADGEYCKFPFLFNGKEYN SCTDTGRSDGFLWCSTTYNFEKDGKYGFPCHEALFTMGNAEQGP CKFPFRFQGSYDSCCTTEGRTDGYRWCGTTEDYDRDKKYGFCEPET AMSTVGGNSEGAPCVFPFTFLGKNYESCTSAGRSDGKMWCAATTAN YDDDRKWGFCDPQGYSLFLVAAHEFGHAMGLEHSQDPGALMAPI YTYTKNFRLSQDDIKGIQELYGASPDIDLGTGPTPLGPVTPEICKQD IVFDGIAQIRGEIFFFKDRFIWRTVTPRDKPMGPLLVATFWPELPEKI DAVYEAPQEEKAVFFAGNEYWIYSASTLERGYPKPLTSLGLPPDVQ RVDAAFNWSKNKKTIFYAGDKFWRYNEVKKKMDPGFPKLIADAW NAIPDNLDVAVDLQGGGHSYFFKGAYYKLENQSLKSVKFGSIKSD WLGC
配列番号 62	HYAL1	FRGPLLPNRPFTTVWNANTQWCLERHGVDDVDSVFDVVANPGQTF RGPDMTIFYSSQLGTYPYTPTGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDI LAAIPAPDFSGLAVIDWEAWRPRWAFNWDTKDIYRQRSRALVQAQ HPDWPAPQVEAVAQDQFQGAARAWMAGTLQLGRALRPRGLWGF YGFPCYNYDFLSPNYTGQCPSGIRAQNDQLGWLWGQSRALYPSIY MPAVLEGTGKSQMYVQHRVAEAFRVAVAAGDPNLPVLPYVQIFY DTTNHFLPLDELEHSLGESAAQGAAGVVLWVSWENTRTKESCQAI KEYMDTTLGPFILNVTSGALLCSQALCSGHGRCVRRTSHPKALLL NPASFISQLTPGGGPLSLRGALSLEDQAQMAVEFKCRCYPGWQAP WCERKSMW
配列番号 65	α FAP 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRL EWIGGINPNNGIPNYNQKFKGRVTITVDTASTAYMELSSLRSEDTA VYYCARRRIAYGYDEGHAMDYWGQGLTVTVSS
配列番号 69	α FAP 軽鎖	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKP GQPPKLLIFWASTRESGVPRDFSGSGFGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CQQYFSYPLTFGQGTKVEIK

【0 7 6 2】

【表 5 9】

配列番号 163	hIL2 F42A Y45A	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFAM PKKATELKHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

【0 7 6 3】

【表 6 0】

表 15. 完全な重鎖および軽鎖のアミノ酸配列

構築物 配列番号	N 末端	リンカー	可変	定常	Fc	リンカー	C 末端
配列番号 214			配列番号 65	配列番号 14	配列番号 83		
配列番号 215			配列番号 69	配列番号 11			
配列番号 216			配列番号 65	配列番号 14	配列番号 82	配列番号 96	配列番号 63
配列番号 217	配列番号 63	配列番号 96			配列番号 82		
配列番号 218			配列番号 65	配列番号 14	配列番号 83	配列番号 96	配列番号 163
配列番号 219			配列番号 65	配列番号 14	配列番号 82	配列番号 96	配列番号 62
配列番号 220			配列番号 148	配列番号 14	配列番号 83		
配列番号 221			配列番号 148	配列番号 14	配列番号 83	配列番号 96	配列番号 163
配列番号 222			配列番号 150	配列番号 14	配列番号 82	配列番号 96	配列番号 62
配列番号 223			配列番号 151	配列番号 11			
配列番号 171			配列番号 149	配列番号 147			
配列番号 224	配列番号 62	配列番号 96			配列番号 82		

【 0 7 6 4】

【表 6 1】

表16. 多重特異性分子を構築するのに使用される鎖のアミノ酸配列

配列ID	アミノ酸配列
配列番号214	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWI GGINPNNGIPNYNQKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RRRIAYGYDEGHAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 7 6 5】

10

20

30

40

50

【表 6 2】

配列番号215	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSRNQKNYLAWYQQKPGQ PPKLLIFWASTRESGVPDRFSGSGFGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYF SYPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号216	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWI GGINPNNGIPNYNQKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RRRIAYGYDEGHAMDYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGSYNFFPRKPKWKDNQI TYRIIGYTPDLDPETVDDAFARAFQVWSDVTPLRFSRIHDGEADIMINFG RWEHGDGYFPDGDGLLAHAFAPGTGVGGDSHFDDDELWTLGEGQV VRVKYGNADGEYCKFPFLFNGKEYNSCTDTGRSDGFLWCSTTYNFEKD GKYGFCPHEALFTMGGNAEGQPCFPFRFQGTSDYDSCCTTEGRTDGYRW CGTTEDYDRDKKYGFCPETAMSTVGGNSEGAPCVFPFTFLGNKYESCT SAGRS DGKMW CATTANYDDDRKWGFCDPQGYSLFLVAAHEFGHAMG LEHSQDPGALMAPIYTYTKNFRLSQDDIKGIQELYGASPDIDLGTGPTPT LGPVTPEICKQDIVFDGIAQIRGEIFFKDRFIWRTVTPRDKPMGQLLVAT FWPELPEKIDAVYEAPQEEKAVFFAGNEYWIYSASTLERGYPKPLTSLG LPPDVQRVDAAFNWSKNKTYIFAGDKFWRYNEVKKKMDPGFPKLI DAWNAIPDNLDVVDLQGGGHSYFFKGAYYKLENQSLKSVKFGSIKS DWLGC
配列番号217	YNFFPRKPKWKDNQITYRIIGYTPDLDPETVDDAFARAFQVWSDVTPLR FSRIHDGEADIMINFGWRWEHGDGYFPDGDGLLAHAFAPGTGVGGDSH FDDDELWTLGEGQVVRVKYGNADGEYCKFPFLFNGKEYNSCTDTGRS DGFLWCSTTYNFEKDGKYGFCPHEALFTMGGNAEGQPCFPFRFQGTSDY YDSCCTTEGRTDGYRWCGTTEDYDRDKKYGFCPETAMSTVGGNSEGAP CVFPFTFLGNKYESCTSAGRS DGKMW CATTANYDDDRKWGFCDPQGY SLFLVAAHEFGHAMGLEHSQDPGALMAPIYTYTKNFRLSQDDIKGIQEL YGASPDIDLGTGPTPTLGPVTPEICKQDIVFDGIAQIRGEIFFKDRFIWRT VTPRDKPMGQLLVATFWPELPEKIDAVYEAPQEEKAVFFAGNEYWIYS ASTLERGYPKPLTSLGLPPDVQRVDAAFNWSKNKTYIFAGDKFWRYN EVKKKMDPGFPKLIADAWNAIPDNLDVVDLQGGGHSYFFKGAYYK LENQSLKSVKFGSIKSDWLGC GGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号218	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWI GGINPNNGIPNYNQKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RRRIAYGYDEGHAMDYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGSAPTSSSTKKTQLQL

10

20

30

40

【0 7 6 6】

【表 6 3】

	EHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLQCLEEE LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETA TIVEFLNRWITFCQSIISTLT
配列番号219	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSRYTFTEYTIHWVRQAPGQRLEWI GGINPNNGIPNYNQKFKGRVTITVDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RRRIAYGYDEGHAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGFRGPLLPNRPFTTVW NANTQWCLERHGVDDVSVFDVVANPGQTRFRGPDMTIFYSSQLGTYP YYTPTGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDILAAIPAPDFSGLAVIDWEAW RPRWAFNWDTKDIYRQRSRALVQAQHPDWPAPQVEAVAQDQFQGA RAWMAGTLQLGRALRPRGLWGFYGFPCDYNDFLSPNYTGQCPGSR AQNDQLGWLWGQSRALYPSIYMPAVLEGTKSQMYVQHRVAEAFRV AVAAGDPNLPVLPYVQIFYDTTNHFLPLDELEHSLGESAAQGAAGVVL WVSWENTRTKESCAIKEYMDTTLGPFILNVTSGALLCSQALCSGHGR CVRRTSHPKALLLNPAFSIQLTPGGGPLSLRGALSLEDQAQMAVEFK CRCYPGWQAPWCERKSMW
配列番号220	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWV SSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RIKLGTVTVDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
配列番号221	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKGLEWV SSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RIKLGTVTVDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGAPTSSSTKKTQLQLEHLL DLQMLNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLQCLEEEELKPLE EVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLT
配列番号222	QVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVINWGKQRSGQGLEW IGEYIPGSGTNYNNEKFKAKATLTADKSSNIAYMQLSSLTSEDSAVYFC ARRGRYGLYAMDYWGQTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL

10

20

30

40

【0 7 6 7】

【表 6 4】

	HNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSFRGPLLPNRPFTTVWNAN TQWCLERHGVDDVDSVFDVVDVANPGQTFRGPDMTIFYSSQLGTYPPYTP TGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDILAAIPAPDFSGLAVIDWEAWRPR WAFNWDTKDIYRQRSRALVQAQHPDWPAPQVEAVAQDQFQGAARAW MAGTLQLGRALRPRGLWGFYGFPCDYNDFLSPNYTGQCPSGIRAQND QLGWLWGQSRALYPSIYMPAVLEGTGKSQMYVQHRVAEAFRVAVA GDPNLPVLPYVQIFYDTTNHFLPLDELEHSLGESAAQGAAGVVLWVSW ENTRTKESCQAIKEYMDTTLGPFILNVTSGALLCSQALCSGHGRCVVRT SHPKALLLLNPASFQILTPGGGPLSLRGALSLEDQAQMAVEFKCRCYP GWQAPWCERKSMW	
配列番号223	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIY YTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTINNLEQEDIATYFCQQGNTRPWTFG GGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	10
配列番号171	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLM IYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTR VFGTGTKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
配列番号224	FRGPLLPNRPFTTVWNANTQWCLERHGVDDVDSVFDVVDVANPGQTFRG PDMTIFYSSQLGTYPPYTPTGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDILAAIPA PDFSGLAVIDWEAWRPRWAFNWDTKDIYRQRSRALVQAQHPDWPAPQ VEAVAQDQFQGAARAWMAGTLQLGRALRPRGLWGFYGFPCDYNDFL LSPNYTGQCPSGIRAQNDQLGWLWGQSRALYPSIYMPAVLEGTGKSQMY YVQHRVAEAFRVAVAAGDPNLPVLPYVQIFYDTTNHFLPLDELEHSLG ESAAQGAAGVVLWVSWENTRTKESCQAIKEYMDTTLGPFILNVTSGAL LCSQALCSGHGRCVVRTSHPKALLLLNPASFQILTPGGGPLSLRGALS LEDQAQMAVEFKCRCYPGWQAPWCERKSMWGGGGSGGGGSGGGGSD KTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	20

30

【0 7 6 8】

40

50

【表 6 5】

表17. 抗原の配列

配列ID	説明	アミノ酸配列
配列番号178	hPD1L1	FTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMED KNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVK LQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTS EHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNV TSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVPELPLAHPPNERTG GGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGGGSHHHHHHHH
配列番号225	hFAP	LLVMCIVLRPSRVHNSEENTMRALTLDKILNGTFSYKTFPPNWIS GQEYLHQADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNASNYGLSP DRQFVYLESYSLWRYSYTATYYIYDLSNGEFVRGNELPRPIQ YLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLLKQRPDPPFQITFNGRENKIFNGI PDWVYEEEMLPKYALWWSPNGKFLAYAEFNDKDIPVIAYSYY GDEQYPRITINIPYPKAGAKNPVVRIFIDTTYPAYVGPQEVVPA MIASSDYFWSLWTWVTDERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDW QTWDCPKTQEHIEESRTGWAGGFFVSRPVFSYDAISYYKIFSDK DGYKHIHYIKDTVENAIQITSGKWEAINIFRVTQDSLFSYSSNEFEE YPGRRNIYRISIGSYPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYY ALVCYGPPISTLHDGRDQEIKILEENKELENALKNIQLPKEEI KKLEVDEITLWYKMLPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSSSVRSVF AVNWISYLASKEGMVIALVDGRGTAQGDKLLYAVYRKLGVY EVEDQITAVRKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGL FKCGIAVAPVSSWEYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVM ARAEYFRNVLYLHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQA MWYSDQNHGLSGLSTNHLTYHMTHTFLKQCFSLSDGGGGSGLN DIFEAQKIEWHEGGGGSHHHHHHHH
配列番号179	hNKp46	QQQTLKPKFIWAEPHFMPVPEKQVTICCGNGYGAVEYQLHFEGS LFAVDRPKPPERINKVKFYIPDMNSRMAGQYSCIYRVGELWSEP SNLLDLVVTEMYDTPTLVHPGPEVISGEKVTFYCRLDTATSMF LLLKEGRSSHVQRGYGVQAEFPLGPVTTAHRGTYRCFGSYNN HAWSPSEPVKLLVTGDIENTSLAPEDPTFPDTWGTYLLTTETGL QKDHALWDHTAQNGGGGSGGGGSEPRDTDTCNPPDPCTCP TPDLLGGPSVFIFPPKPKDVLMSLTPKITCVVVDVSEEPDVQFN WYVNNVEDKTAQTETRRQYNSTYRVVSVLPIKHQDWMMSGKV FKCKVNNNALPSPIEKTISKPRGQVRVPQIYTFPPPIEQTVKKDVS VTCLVTGFLPQDIHVEWESNGQPQPEQNYKNTQPVLDSDGSYFL YSKLVNPKSRWDQGDSTCSVIHEALHNHMTKTISRSLGNGG GGSGGGGSGLNDIFEAQKIEWHE
配列番号182	hIL2R α	ELCDDDPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYM LCTGNSSHSSWDNQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTE MQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGMVYYQ CVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGGGGGSGG GGSGLNDIFEAQKIEWHEGGGGSHHHHHHHH
配列番号226	BirA	MKDNTVPLKLIALLANGEFHSGEQLGETLGMSRAAINKHIQTLR DWGVDVFTVPGKGYSLPEPIQLLNAKQILGQLDGGSAVLVVID STNQYLLDRIGELKSGDACIAEYQQAGRGRGRKWFSPFGANL YLSMFWRLEQGPAAIIGLSLVIGIVMAEVLRLKLGADKVRVKWP NDLYLQDRKLAGILVELTGKTGDAAQIVIGAGINMAMRRVEES VVNQGWITLQEAGINLDRNTLAAMLIRELRAALELFEQEGLAPY LSRWEKLDNFNRPVKLIIGDKEIFGISRGIDKQGALLLEQDGIKP WMGGEISLRS AEKSGKDEL

【0 7 6 9】

10

20

30

40

50

【表 6 6】

表 18. 多重特異性分子を生成するのに使用される配列

多重特異性分子	重鎖 1	軽鎖 1	重鎖 2	軽鎖 2
24	配列番号 214	配列番号 215	配列番号 219	配列番号 215
25	配列番号 218	配列番号 215	配列番号 219	配列番号 215
26	配列番号 214	配列番号 215	配列番号 224	
27	配列番号 220	配列番号 171	配列番号 219	配列番号 215
28	配列番号 221	配列番号 171	配列番号 219	配列番号 215
29	配列番号 221	配列番号 171	配列番号 222	配列番号 223
30	配列番号 214	配列番号 215	配列番号 216	配列番号 215
31	配列番号 214	配列番号 215	配列番号 217	
32	配列番号 221	配列番号 171	配列番号 216	配列番号 215

10

【0 7 7 0】

20

核酸

本発明はまた、本明細書に記載されるような抗体分子の重鎖および軽鎖可変領域および CDR または高度可変ループをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を特徴とする。例えば、本発明は、本明細書に開示される抗体分子の 1 つまたは複数から選択される抗体分子の重鎖および軽鎖可変領域をそれぞれコードする第 1 および第 2 の核酸を特徴とする。核酸は、本明細書の表に記載されるヌクレオチド配列またはそれと実質的に同一の配列（例えば、それと少なくとも約 85 %、90 %、95 %、99 % またはそれを超えて同一の配列、または本明細書の表に示される配列と 3、6、15、30、または 45 ヌクレオチド以下だけ異なる配列を含み得る。

【0 7 7 1】

30

いくつかの実施形態において、核酸は、本明細書の表に記載されるアミノ酸配列、またはそれと実質的に相同の配列（例えば、それと少なくとも約 85 %、90 %、95 %、99 % またはそれを超えて同一の、および／または 1 つまたは複数の置換、例えば、保存的置換を有する配列）を有する重鎖可変領域からの少なくとも 1 つ、2 つまたは 3 つの CDR または高度可変ループをコードするヌクレオチド配列を含み得る。他の実施形態において、核酸は、本明細書の表に記載されるアミノ酸配列、またはそれと実質的に相同の配列（例えば、それと少なくとも約 85 %、90 %、95 %、99 % またはそれを超えて同一の、および／または 1 つまたは複数の置換、例えば、保存的置換を有する配列）を有する軽鎖可変領域からの少なくとも 1 つ、2 つまたは 3 つの CDR または高度可変ループをコードするヌクレオチド配列を含み得る。さらに別の実施形態において、核酸は、本明細書の表に記載されるアミノ酸配列、またはそれと実質的に相同の配列（例えば、それと少なくとも約 85 %、90 %、95 %、99 % またはそれを超えて同一の、および／または 1 つまたは複数の置換、例えば、保存的置換を有する配列）を有する重鎖および軽鎖可変領域からの少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つまたは 6 つの CDR または高度可変ループをコードするヌクレオチド配列を含み得る。

40

【0 7 7 2】

いくつかの実施形態において、核酸は、本明細書の表に記載されるヌクレオチド配列、それと実質的に相同の配列（例えば、それと少なくとも約 85 %、90 %、95 %、99 % またはそれを超えて同一の、および／または本明細書に記載されるストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることが可能な配列）を有する重鎖可変領域からの少なくとも 1

50

つ、2つまたは3つのCDRまたは高度可変ループをコードするヌクレオチド配列を含み得る。別の実施形態において、核酸は、本明細書の表に記載されるヌクレオチド配列、またはそれと実質的に相同の配列（例えば、それと少なくとも約85%、90%、95%、99%またはそれを超えて同一の、および／または本明細書に記載されるストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることが可能な配列）を有する軽鎖可変領域からの少なくとも1つ、2つまたは3つのCDRまたは高度可変ループをコードするヌクレオチド配列を含み得る。さらに別の実施形態において、核酸は、本明細書の表に記載されるヌクレオチド配列、またはそれと実質的に相同の配列（例えば、それと少なくとも約85%、90%、95%、99%またはそれを超えて同一の、および／または本明細書に記載されるストリンジェンシー条件下でハイブリダイズすることが可能な配列）を有する重鎖および軽鎖可変領域からの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つのCDRまたは高度可変ループをコードするヌクレオチド配列を含み得る。

【0773】

別の態様において、本出願は、本明細書に記載される核酸を含有する宿主細胞およびベクターを特徴とする。核酸は、以下により詳細に説明されるように、同じ宿主細胞または別個の宿主細胞中に存在する単一のベクターまたは別個のベクター中に存在し得る。

【0774】

ベクター

本明細書に記載される抗体分子をコードするヌクレオチド配列を含むベクターが本明細書においてさらに提供される。一実施形態において、ベクターは、本明細書に記載される抗体分子をコードするヌクレオチドを含む。一実施形態において、ベクターは、本明細書に記載されるヌクレオチド配列を含む。ベクターとしては、限定はされないが、ウイルス、プラスミド、コスミド、λファージまたは酵母人工染色体（YAC）が挙げられる。

【0775】

多くのベクター系が用いられ得る。例えば、あるクラスのベクターは、例えば、ウシパピローマウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルス、レトロウイルス（ラウス肉腫ウイルス、MMTVまたはMOMLV）またはSV40ウイルスなどの動物ウイルスに由来するDNA要素を用いる。別のクラスのベクターは、セムリキ森林ウイルス、東部馬脳炎ウイルスおよびフラビウイルスなどのRNAウイルスに由来するRNA要素を用いる。

【0776】

さらに、DNAをその染色体に安定的に組み込んだ細胞は、トランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする1つまたは複数のマーカーを導入することによって選択され得る。マーカーは、例えば、栄養要求性宿主に対する原栄養性、殺生物剤耐性（例えば、抗生物質）、または銅などの重金属に対する耐性などを提供し得る。選択可能なマーカー遺伝子は、発現されるDNA配列に直接連結されるか、または共形質転換によって同じ細胞に導入され得る。さらなる要素も、mRNAの最適な合成に必要とされ得る。これらの要素は、スプライシングナル、ならびに転写プロモーター、エンハンサー、および終結シグナルを含み得る。

【0777】

構築物を含有する発現ベクターまたはDNA配列が、発現のために調製されたら、発現ベクターは、適切な宿主細胞にトランスフェクトまたは導入され得る。例えば、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、レトロウイルス形質導入、ウイルストランスフェクション、遺伝子銃、脂質ベースのトランスフェクションまたは他の従来の方法などの様々な技術が、これを行うのに用いられ得る。プロトプラスト融合の場合、細胞は、培地中で増殖され、適切な活性についてスクリーニングされる。

【0778】

得られたトランスフェクトされた細胞を培養するためのおよび生成された抗体分子を回収するための方法および条件は、当業者に公知であり、本明細書に基づいて、用いられる特定の発現ベクターおよび哺乳動物宿主細胞に応じて、変更または最適化され得る。

【0779】

細胞

別の態様において、本出願は、本明細書に記載される核酸を含有する宿主細胞およびベクターを特徴とする。核酸は、同じ宿主細胞または別個の宿主細胞中に存在する単一のベクターまたは別個のベクター中に存在し得る。宿主細胞は、真核細胞、例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、または原核細胞、例えば大腸菌（*E. coli*）であり得る。例えば、哺乳動物細胞は、培養細胞または細胞株であり得る。例示的な哺乳類細胞としては、リンパ球細胞株（例えば、NSO）、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、COS細胞、卵母細胞およびトランスジェニック動物に由来する細胞、例えば乳房上皮細胞が挙げられる。

10

【0780】

本発明は、本明細書に記載される抗体分子をコードする核酸を含む宿主細胞も提供する。

【0781】

一実施形態において、宿主細胞は、抗体分子をコードする核酸を含むように遺伝子操作される。

【0782】

一実施形態において、宿主細胞は、発現カセットを用いることによって遺伝子操作される。「発現カセット」という語句は、このような配列と適合する宿主における遺伝子の発現に影響を与えることが可能なヌクレオチド配列を指す。このようなカセットは、プロモーター、イントロンを伴うかまたは伴わないオープンリーディングフレーム、および終結シグナルを含み得る。例えば、誘導性プロモーターなど、発現を行うのに必要なまたは役立つさらなる因子も使用され得る。

20

【0783】

本発明は、本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞も提供する。

【0784】

細胞は、限定はされないが、真核細胞、細菌細胞、昆虫細胞、またはヒト細胞であり得る。好適な真核細胞としては、限定はされないが、Vero細胞、HeLa細胞、COS細胞、CHO細胞、HEK293細胞、BHK細胞およびMDCKII細胞が挙げられる。好適な昆虫細胞としては、限定はされないが、Sf9細胞が挙げられる。

【0785】

使用および併用療法

本明細書に記載される方法は、本明細書に記載される多重特異性分子を用いることにより、例えば、本明細書に記載される医薬組成物を用いることにより、対象における癌を治療することを含む。対象における癌の症状を軽減または改善するための方法、ならびに癌の増殖を抑制し、および／または1つまたは複数の癌細胞を殺滅するための方法も提供される。実施形態において、本明細書に記載される方法は、本明細書に記載されるまたは本明細書に記載される医薬組成物を投与された対象における、腫瘍のサイズを減少させ、および／または癌細胞の数を減少させる。

30

【0786】

実施形態において、癌は、血液癌である。実施形態において、血液癌は、白血病またはリンパ腫である。本明細書において使用される際、「血液癌」は、造血またはリンパ系組織の腫瘍、例えば血液、骨髄、またはリンパ節を冒す腫瘍を指す。例示的な血液悪性疾患としては、限定はされないが、白血病（例えば、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、有毛細胞白血病、急性単球性白血病（AMoL）、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、若年性骨髄単球性白血病（JMML）、または大顆粒リンパ球性白血病）、リンパ腫（例えば、AIDS関連リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫（例えば、古典的ホジキンリンパ腫または結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫）、菌状息肉腫、非ホジキンリンパ腫（例えば、B細胞非ホジキンリンパ腫（例えば、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫（CLL／SLL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ

40

50

腫、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、またはマントル細胞リンパ腫)またはT細胞非ホジキンリンパ腫(菌状息肉腫、未分化大細胞リンパ腫、または前駆Tリンパ芽球性リンパ腫))、原発性中枢神経系リンパ腫、セザリー症候群、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症)、慢性骨髄増殖性腫瘍、ランゲルハンス細胞組織球症、多発性骨髄腫／形質細胞腫、骨髄異形成症候群、または骨髄異形成／骨髄増殖性腫瘍が挙げられる。

【0787】

実施形態において、癌は、固形癌である。例示的な固形癌としては、限定はされないが、卵巣癌、直腸癌、胃癌、精巣癌、肛門部の癌、子宮癌、結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、肺の非小細胞癌、小腸の癌、食道の癌、黒色腫、カポジ肉腫、内分泌系の癌、甲状腺の癌、副甲状腺の癌、副腎の癌、骨肉腫、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部の癌、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮癌、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、類表皮癌、子宮頸部扁平上皮細胞癌、卵管の癌、子宮内膜の癌、膣の癌、軟組織の肉腫、尿道の癌、外陰部の癌、陰茎の癌、膀胱の癌、腎臓または尿管の癌、腎盂の癌、脊髄軸腫瘍、中枢神経系(CNS)の腫瘍、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管新生、前記癌の転移性病変、またはそれらの組合せが挙げられる。

【0788】

実施形態において、多重特異性分子(または医薬組成物)は、治療または予防される疾患に適切な方法で投与される。投与の量および頻度は、患者の病態、ならびに患者の疾患のタイプおよび重症度などの要因によって決定される。適切な投与量は、臨床試験によって決定され得る。例えば、「有効量」または「治療量」が示される場合、投与される医薬組成物(または多重特異性分子)の正確な量は、腫瘍のサイズの個人差、感染または転移の程度、対象の年齢、体重、および病態を考慮して、医師によって決定され得る。実施形態において、本明細書に記載される医薬組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ 個の細胞/kg体重、例えば、 $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞/kg体重の投与量(それらの範囲内の全ての整数値を含む)で投与され得る。実施形態において、本明細書に記載される医薬組成物は、これらの投与量で複数回投与され得る。実施形態において、本明細書に記載される医薬組成物は、免疫療法において説明される注入技術を用いて投与され得る(例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照)。

【0789】

実施形態において、多重特異性分子または医薬組成物は、非経口的に対象に投与される。実施形態において、細胞は、静脈内に、皮下に、腫瘍内に、リンパ節内に(intranasally)、筋肉内に、皮内に、または腹腔内に、対象に投与される。実施形態において、細胞は、腫瘍またはリンパ節内に直接、投与され、例えば注入される。実施形態において、細胞は、注入(例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988に記載されるように)または静脈内プッシュとして投与される。実施形態において、細胞は、注射可能なデポー製剤として投与される。実施形態において、対象は、哺乳動物である。実施形態において、対象は、ヒト、サル、ブタ、イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、ラット、またはマウスである。実施形態において、対象は、ヒトである。実施形態において、対象は、例えば、18歳未満、例えば、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1歳未満またはそれを下回る小児対象である。実施形態において、対象は、例えば、少なくとも18歳、例えば、少なくとも19、20、21、22、23、24、25、25~30、30~35、35~40、40~50、50~60、60~70、70~80、または80~90歳の成人である。

【0790】

併用療法

本明細書に開示される多重特異性分子は、第2の治療剤または手順と組み合わせて使用され得る。

【0791】

実施形態において、多重特異性分子および第2の治療剤または手順は、対象が癌と診断された後、例えば、癌が対象から除去される前に投与／実施される。実施形態において、多重特異性分子および第2の治療剤または手順は、同時にまたは並行して投与／実施される。例えば、1つの治療の送達は、第2の送達が開始するときに依然として行われており、例えば、治療の投与の重複がある。他の実施形態において、多重特異性分子および第2の治療剤または手順は、連続して投与／実施される。例えば、1つの治療の送達は、他の治療の送達が開始する前に停止する。

【0792】

実施形態において、併用療法は、いずれかの薬剤単独での単剤療法より有効な治療をもたらし得る。実施形態において、第1および第2の治療の組合せは、単独の第1または第2の治療より有効である（例えば、症状および／または癌細胞のより大きい減少をもたらす）。実施形態において、併用療法は、単剤療法として投与されるときと同様の効果を得るのに通常必要とされる第1または第2の治療の用量と比較して、第1または第2の治療のより低い用量の使用を可能にする。実施形態において、併用療法は、部分的な相加効果、完全な相加効果を有するか、または相加効果を超える効果を有する。

【0793】

一実施形態において、多重特異性分子は、治療、例えば、癌治療（例えば、抗癌剤、免疫療法、光線力学的療法（PDT）、手術および／または放射線の1つまたは複数）と組み合わせて投与される。「化学療法薬」、「化学療法剤」および「抗癌剤」という用語は、本明細書において同義的に使用される。多重特異性分子および治療、例えば、癌治療の投与は、連続（重複を伴うかまたは伴わない）または同時であり得る。多重特異性分子の投与は、治療（例えば、癌治療）の過程において、連続的または断続的であり得る。本明細書に記載されるいくつかの治療を用いて、癌および非癌性疾患を治療することができる。例えば、PDT有効性は、本明細書に記載される方法および組成物を用いて、癌性および非癌性の病態（例えば、結核）において強化され得る（例えば、Agostinis, P. et al. (2011) CA Cancer J. Clin. 61:250-281に概説される）。

【0794】

抗癌治療

他の実施形態において、多重特異性分子は、低または小分子量化学療法剤と組み合わせて投与される。例示的な低または小分子量化学療法剤としては、限定はされないが、13-シス-トレチノイン酸（イソトレチノイン、ACCCUTANE（登録商標））、2-CD A（2-クロロデオキシアデノシン、クラドリビン、LEUSTATIN（商標））、5-アザシチジン（アザシチジン、VIDAZA（登録商標））、5-フルオロウラシル（5-FU、フルオロウラシル、ADRUCIL（登録商標））、6-メルカプトプリン（6-MP、メルカプトプリン、PURINETHOL（登録商標））、6-TG（6-チオグアニン、チオグアニン、THIOGUANINE TABLOID（登録商標））、アブラキサン（タンパク結合パクリタキセル）、アクチノマイシン-D（ダクチノマイシン、COSMEGEN（登録商標））、アリトレチノイン（PANRETIN（登録商標））、オール-トランスレチノイン酸（ATRA、トレチノイン、VESANOID（登録商標））、アルトレタミン（ヘキサメチルメラミン、HMM、HEXALEN（登録商標））、アメトプテリン（メトトレキサート、メトトレキサートナトリウム、MTX、TREXALL（商標））、RHEUMATREX（登録商標））、アミホスチン（ETHYOL（登録商標））、アラビノシルシトシン（Ara-C、シタラビン、CYTOSAR-U（登録商標））、三酸化ヒ素（TRISENOX（登録商標））、アスパラギナーゼ（エルウィニア-アスパラギナーゼ、L-アスパラギナーゼ、ELSPAR（登録商標））、KIDROLASE（登録商標））、BCNU（カルムスチン、BiCNU（登録商標））、ベンダムスチン（TREANDA（登録商標））、ベキサロテン（TARGRETIN（登録商標））、ブレオマイシン（BLENOXANE（登録商標））、ブスルファ

10

20

30

40

50

ン (BUSULFEX (登録商標)、MYLERAN (登録商標))、カルシウムロイコボリン (シトロボラム因子、フォリン酸、ロイコボリン)、カンプトテシン-11 (CPT-11、イリノテカン、CAMPTOSAR (登録商標))、カペシタビン (XELODA (登録商標))、カルボプラチン (PARAPLATIN (登録商標))、カルムスチンウェハー (カルムスチンインプラントを有するプロリフェブロスパン (proliferospan) 20、GLIADEL (登録商標) ウェハー)、CCI-779 (テムシロリムス、TORISEL (登録商標))、CCNU (ロムスチン、CeeNU)、CDDP (シスプラチン、PLATINOL (登録商標)、PLATINOL-AQ (登録商標))、クロラムブシル (ロイケラン)、シクロホスファミド (CYTOXAN (登録商標)、NEOSAR (登録商標))、ダカルバジン (DIC、DTIC、イミダゾールカルボキサミド、DTIC-DOME (登録商標))、ダウノマイシン (ダウノルビシン、ダウノルビシン塩酸塩、ルビドマイシン塩酸塩、CERUBIDINE (登録商標))、デシタビン (DACOGEN (登録商標))、デクスラゾキサン (ZINECARD (登録商標))、DHAD (ミトキサントロン、NOVANTRONE (登録商標))、ドセタキセル (TAXOTERE (登録商標))、ドキシソルビシン (ADRIAMYCIN (登録商標)、RUBEX (登録商標))、エピルビシン (ELLENCE (商標))、エストラムスチン (EMCYT (登録商標))、エトポシド (VP-16、リン酸エトポシド、TOPOSAR (登録商標)、VEPESID (登録商標)、ETOPOPHOS (登録商標))、フロクスウリジン (FUDR (登録商標))、フルダラビン (FLUDARA (登録商標))、フルオロウラシル (クリーム) (CARAC (商標)、EFUDEX (登録商標)、FLUOROPLEX (登録商標))、ゲムシタビン (GEMZAR (登録商標))、ヒドロキシウレア (HYDREA (登録商標)、DROXIA (商標))、MYLOCEL (商標))、イダルビシン (IDAMYCIN (登録商標))、イホスファミド (IFEX (登録商標))、イクサベピロン (IXEMPRA (商標))、LCR (ロイロクリスチン (leurocristine)、ピンクリスチン、VCR、ONCOVIN (登録商標)、VINCASAR PFS (登録商標))、L-PAM (L-サルコリシン、メルファラン、フェニルアラニンマスタード、ALKERAN (登録商標))、メクロレタミン (メクロレタミン塩酸塩、ムスチン、ナイトロジェンマスタード、MUSTARGEN (登録商標))、メスナ (MESNEX (商標))、マイトマイシン (マイトマイシン-C、MTC、MUTAMYCIN (登録商標))、ネララビン (ARRANON (登録商標))、オキサリプラチン (ELOXATIN (商標))、パクリタキセル (TAXOL (登録商標)、ONXAL (商標))、ペガスパルガーゼ (PEG-L-アスパラギナーゼ、ONCOSPARE (登録商標))、ペメトレキセド (ALIMTA (登録商標))、ペントスタチン (NIPENT (登録商標))、プロカルバジン (MATULANE (登録商標))、ストレプトゾシン (ZANOSAR (登録商標))、テモゾロミド (TEMODAR (登録商標))、テニポシド (VM-26、VUMON (登録商標))、TESPA (チオホスファミド (thiophosphoamide)、チオテパ、TSPA、THIOPLEX (登録商標))、トポテカン (HYCAMTIN (登録商標))、ピンブラスチン (ピンブラスチン硫酸塩、ピンカレウコブラスチン、VLB、ALKABAN-AQ (登録商標)、VELBAN (登録商標))、ビノレルビン (ビノレルビン酒石酸塩、NAVELBINE (登録商標))、およびボリノスタット (ZOLINZA (登録商標)) が挙げられる。

【0795】

別の実施形態において、多重特異性分子は、生物製剤とともに投与される。癌の治療に有用な生物製剤は、当該技術分野において公知であり、本発明の結合分子は、例えば、このような公知の生物製剤とともに投与され得る。例えば、FDAは、乳癌の治療のための以下の生物製剤を承認している：HERCEPTIN (登録商標) (トラスツズマブ、Genentech Inc. (South San Francisco, Calif.))；HER2 陽性乳癌において抗腫瘍活性を有するヒト化モノクローナル抗体)；FASLODEX (登録商標) (フルベストラント、AstraZeneca Pharmaceu

10

20

30

40

50

ticals, LP (Wilmington, Del.) ; 乳癌を治療するのに使用されるエストロゲン受容体拮抗薬) ; ARIMIDEX (登録商標) (アナストロゾール、AstraZeneca Pharmaceuticals, LP ; エストロゲンを作製するのに必要とされる酵素であるアロマターゼをブロックする非ステロイド性アロマターゼ阻害剤) ; Aromasin (登録商標) (エキセメスタン、Pfizer Inc. (New York, N. Y.) ; 乳癌の治療に使用される不可逆的ステロイド性アロマターゼ不活性化剤) ; FEMARA (登録商標) (レトロゾール、Novartis Pharmaceuticals (East Hanover, N. J.) ; 乳癌を治療するためにFDAによって承認された非ステロイド性アロマターゼ阻害剤) ; およびNOLVADEX (登録商標) (タモキシフェン、AstraZeneca Pharmaceuticals, LP ; 乳癌を治療するためにFDAによって承認された非ステロイド性抗エストロゲン剤)。本発明の結合分子と組み合わせ得る他の生物製剤としては、AVASTIN (登録商標) (ペバシズマブ、Genentech Inc. ; 血管新生を阻害するように設計された最初にFDAに承認された治療) ; およびZEVALLIN (登録商標) (イブリツモマブチウキセタン、Biogen Idec (Cambridge, Mass.) ; B細胞リンパ腫の治療のために現在承認されている放射性標識モノクローナル抗体) が挙げられる。

【0796】

さらに、FDAは、大腸癌の治療のための以下の生物製剤を承認している：AVASTIN (登録商標) ; ERBITUX (登録商標) (セツキシマブ、ImClone Systems Inc. (New York, N. Y.)、およびBristol-Myers Squibb (New York, N. Y.) は；上皮成長因子受容体 (EGFR) に対して指向されたモノクローナル抗体である) ; GLEEVEC (登録商標) (メシル酸イマチニブ；プロテインキナーゼ阻害剤) ; およびERGAMISOL (登録商標) (レバミゾール塩酸塩、Janssen Pharmaceutica Products, LP (Titusville, N. J.) ; デュクスステージC結腸癌を有する患者における外科的切除後の5-フルオロウラシルと組み合わせされた補助療法として1990年にFDAによって承認された免疫調節剤)。

【0797】

肺癌の治療では、例示的な生物製剤としては、TARCEVA (登録商標) (エルロチニブHCL、OSI Pharmaceuticals Inc. (Melville, N. Y.) ; ヒト上皮成長因子受容体1 (HER1) 経路を標的化するように設計された小分子) が挙げられる。

【0798】

多発性骨髄腫の治療では、例示的な生物製剤としては、VELCADE (登録商標) Velcade (ボルテゾミブ、Millennium Pharmaceuticals (Cambridge Mass.) ; プロテアソーム阻害剤) が挙げられる。さらなる生物製剤としては、THALIDOMID (登録商標) (サリドマイド、Clegene Corporation (Warren, N. J.) ; 骨髄腫細胞の増殖および生存を阻害する能力ならびに抗血管新生を含む、複数の作用を有するようである免疫調節剤) が挙げられる。

【0799】

さらなる例示的な癌治療抗体としては、限定はされないが、3F8、アバゴボマブ (abagovomab)、アデカツマブ、アフツズマブ、アラシズマブペゴール、アテムツズマブ (CAMPATH (登録商標)、MABCAMPATH (登録商標))、アルツモマブペンテテート (altumomab pentetate) (HYBRI-CEAKER (登録商標))、アナツモマブマフェナトクス、アンルキンズマブ (IMA-638)、アポリズマブ、アルシツモマブ (CEA-SCAN (登録商標))、バビツキシマブ、ベクツモマブ (bectumomab) (LYMPHOSCAN (登録商標))、ベリムマブ (BENLYSTA (登録商標)、LYMPHOSTAT-B (登録商標))、ベ

10

20

30

40

50

シレスマブ (SCINTIMUN (登録商標))、ベバシズマブ (AVASTIN (登録商標))、ビバツズマブメルタンシン (bivatuzumab mertansine)、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、カンツズマブメルタンシン、カプロマブペンデチド (PROTASCIANT (登録商標))、カツマキシマブ (REMOVAB (登録商標))、CC49、セツキシマブ (C225、ERBITUX (登録商標))、シタツズマブボガトクス (citatumumab bogatox)、シクスツムマブ (cixutumumab)、クリバツズマブテトラキセタン (clivatuzumab tetraxetan)、コナツムマブ (conatumumab)、ダセツズマブ、デノスマブ (PROLIA (登録商標))、デツモマブ (detumomab)、エクロメキシマブ (ecromeximab)、エドレコロマブ (PANOREX (登録商標))、エロツズマブ、エピツモマブシツキセタン (epitumomab cituxetan)、エブラツズマブ、エルツマキシマブ (REXOMUN (登録商標))、エタラシズマブ (etaracizumab)、ファーレツズマブ、フィギツムマブ、フレソリムマブ、ガリキシマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン (MYLOTARG (登録商標))、ギレンツキシマブ (girentuximab)、グラムバツムマブベドチン (glembatumumab vedotin)、イブリツモマブ (イブリツモマブチウキセタン、ZEVALIN (登録商標))、イゴボマブ (igovomab) (INDIMACIS-125 (登録商標))、インテツムマブ (intetumumab)、イノツズマブオゾガマイシン、イピリムマブ、イラツムマブ (iratumumab)、ラベツズマブ (CEA-CIDE (登録商標))、レクサツムマブ、リンツズマブ、ルカツムマブ (lucatumumab)、ルミリキシマブ、マパツムマブ、マツズマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ (minretumomab)、ミツモマブ (mitumomab)、ナコロマブタフェナトクス (nacolumab tafentox)、ナプツモマブエスタフェナトクス (naptumomab estafentox)、ネシツムマブ、ニモツズマブ (THERACIM (登録商標)、THERALOC (登録商標))、ノフェツモマブメルペンタン (nofetumomab merpentan) (VERLUMA (登録商標))、オフアツムマブ (ARZERRA (登録商標))、オララツマブ (olaratumab)、オポルツズマブモナトクス (oportuzumab monatox)、オレゴボマブ (OVAREX (登録商標))、パニツムマブ (VECTIBIX (登録商標))、ペンツモマブ (pemtumomab) (THERAGYN (登録商標))、パーツズマブ (OMNITARG (登録商標))、ピンツモマブ (pintumomab)、プリツムマブ (pritumumab)、ラムシルマブ、ラニビズマブ (LUCENTIS (登録商標))、リロツムマブ (rilotumumab)、リツキシマブ (MABTHERA (登録商標)、RITUXAN (登録商標))、ロバツムマブ (robatumumab)、サツモマブペンデチド (satumomab pendetide)、シブロツズマブ (sibrotuzumab)、シルツキシマブ (siltuximab)、ソンツズマブ (sontuzumab)、タカツズマブテトラキセタン (AFP-CIDE (登録商標))、タプリツモマブパプトクス (taplitumomab paptox)、テナツモマブ (tenatumomab)、TGN1412、チシリムマブ (トレメリムマブ)、ティガツズマブ、TNX-650、トシツモマブ (BEXXAR (登録商標))、トラスツズマブ (HERCEPTIN (登録商標))、トレメリムマブ、ツコツズマブセルモロイキン、ベルツズマブ、ボロキシマブ、ボツムマブ (votumumab) (HUMASPECT (登録商標))、ザノリムマブ (HUMAX-EGFR (登録商標))、およびザノリムマブ (HUMAX-CD4 (登録商標)) が挙げられる。

【0800】

他の実施形態において、多重特異性分子は、ウイルス癌治療剤と組み合わせて投与される。例示的なウイルス癌治療剤としては、限定はされないが、ワクシニアウイルス (vvd-D-CDSR)、癌胎児性抗原発現麻疹ウイルス、組み換えワクシニアウイルス (TK-欠失+GM-CSF)、セネカバレーウイルス-001、ニューカッスル病ウイルス、コ

10

20

30

40

50

クサッキーウイルスA21、GL-ONC1、EBNA1 C末端／LMP2キメラタンパク質発現組み換え修飾型ワクシニアアンカラワクチン、癌胎児性抗原発現麻疹ウイルス、G207腫瘍溶解性ウイルス、p53発現修飾型ワクシニアアンカラウイルスワクチン、OncovEX GM-CSF修飾型1型単純ヘルペスウイルス、鶏痘ウイルスワクチンベクター、組み換えワクシニア前立腺特異的抗原ワクチン、ヒトパピローマウイルス16／18 L1ウイルス様粒子／AS04ワクチン、MVA-EBNA1／LMP2 Inj. ワクチン、四価HPVワクチン、四価ヒトパピローマウイルス（6、11、16、18型）組み換えワクチン（GARDASIL（登録商標））、組み換え鶏痘-CEA（6D）／TRICOMワクチン；組み換えワクシニア-CEA（6D）-TRICOMワクチン、組み換え修飾型ワクシニアアンカラ-5T4ワクチン、組み換え鶏痘-TRICOMワクチン、腫瘍溶解性ヘルペスウイルスNV1020、HPV L1 VLPワクチンV504、ヒトパピローマウイルス二価（16および18型）ワクチン（CERVARIX（登録商標））、単純ヘルペスウイルスHF10、Ad5CMV-p53遺伝子、組み換えワクシニアDF3／MUC1ワクチン、組み換えワクシニア-MUC-1ワクチン、組み換えワクシニア-TRICOMワクチン、ALVAC MART-1ワクチン、複製欠損I型単純ヘルペスウイルス（HSV-1）ベクター発現ヒトプレプロエンケファリン（NP2）、野生型レオウイルス、レオウイルス3型Dearing（REOLYSIN（登録商標））、腫瘍溶解性ウイルスHSV1716、エプスタイン・バーウイルス標的抗原をコードする組み換え修飾型ワクシニアアンカラ（MVA）ベースのワクチン、組み換え鶏痘-前立腺特異的抗原ワクチン、組み換えワクシニア前立腺特異的抗原ワクチン、組み換えワクシニア-B7.1ワクチン、rAd-p53遺伝子、Ad5-デルタ24RGD、HPVワクチン580299、JX-594（チミジンキナーゼ欠失ワクシニアウイルス+GM-CSF）、HPV-16／18 L1／AS04、鶏痘ウイルスワクチンベクター、ワクシニア-チロシナーゼワクチン、MEDI-517 HPV-16／18 VLP AS04ワクチン、単純ヘルペスウイルスTK99UNのチミジンキナーゼを含有するアデノウイルスベクター、HspE7、FP253／フルダラビン、ALVAC（2）黒色腫多重抗原治療用ワクチン、ALVAC-hB7.1、カナリアボックス-hIL-12黒色腫ワクチン、Ad-REIC／Dkk-3、rAd-IFN SCH 721015、TIL-Ad-IFNg、Ad-ISF35、およびクサッキーウイルスA21（CVA21、CAVATAK（登録商標））が挙げられる。

【0801】

他の実施形態において、多重特異性分子は、ナノ医薬品と組み合わせて投与される。例示的な癌ナノ医薬品としては、限定はされないが、ABRAXANE（登録商標）（パクリタキセル結合アルブミンナノ粒子）、CRLX101（直鎖状のシクロデキストリンベースのポリマーにコンジュゲートされたCPT）、CRLX288（ドセタキセルを生分解性ポリマーポリ（乳酸-コグリコール酸）にコンジュゲートする）、シタラビンリポソーム（リポソームAra-C、DEPOCYT（商標））、ダウノルビシンリポソーム（DAUNOXOME（登録商標））、ドキソルビシンリポソーム（DOXIL（登録商標））、CAELYX（登録商標）、封入ダウノルビシンクエン酸塩リポソーム（DAUNOXOME（登録商標））、およびPEG抗VEGFアプタマー（MACUGEN（登録商標））が挙げられる。

【0802】

ある実施形態において、多重特異性分子は、パクリタキセルまたはパクリタキセル製剤、例えば、TAXOL（登録商標）、タンパク結合パクリタキセル（例えば、ABRAXANE（登録商標））と組み合わせて投与される。例示的なパクリタキセル製剤としては、限定はされないが、ナノ粒子アルブミン結合パクリタキセル（Abraxis Bioscienceによって販売されるABRAXANE（登録商標））、ドコサヘキサエン酸結合パクリタキセル（DHA-パクリタキセル、Protargaによって販売されるTaxoprexin）、ポリグルタミン酸塩結合パクリタキセル（PG-パクリタキセル、パクリタキセルポリグルメクス（poliglumex）、Cell Therape

10

20

30

40

50

uticによって販売されるCT-2103、XYOTAX)、腫瘍活性化プロドラッグ(TAP)、ANG105(ImmunoGenによって販売される、パクリタキセルの3つの分子に結合されたAngiopep-2)、パクリタキセル-EC-1(erbB2認識ペプチドEC-1に結合されたパクリタキセル;Liet al.,Biopolymers(2007)87:225-230を参照)、およびグルコースコンジュゲートパクリタキセル(例えば、2'-パクリタキセルメチル2-グルコピラノシルスクシネート、Liu et al.,Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters(2007)17:617-620を参照)が挙げられる。

【0803】

癌を治療するための例示的なRNAiおよびアンチセンスRNA剤としては、限定はされないが、CALAA-01、siG12D LODER(Local Drug Eluter)、およびALN-VSP02が挙げられる。

【0804】

他の癌治療剤としては、限定はされないが、サイトカイン(例えば、アルデスロイキン(IL-2、インターロイキン-2、PROLEUKIN(登録商標))、 α インターフェロン(IFN- α 、インターフェロン α 、INTRON(登録商標)A(インターフェロン α -2b)、ROFERON-A(登録商標)(インターフェロン α -2a))、エポエチンアルファ(PROCRIT(登録商標))、フィルグラスチム(G-CSF、顆粒球-コロニー刺激因子、NEUPOGEN(登録商標))、GM-CSF(顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、サルグラモスチム、LEUKINE(商標))、IL-11(インターロイキン-11、オブレルベキン、NEUMEGA(登録商標))、インターフェロン α -2b(PEGコンジュゲート)(PEGインターフェロン、PEG-INTRON(商標))、およびペグフィルグラスチム(NEULASTA(商標))、ホルモン治療剤(例えば、アミノグルテチミド(CYTADREN(登録商標))、アナストロゾール(ARIMIDEX(登録商標))、ピカルタミド(CASODEX(登録商標))、エキセメスタン(AROMASIN(登録商標))、フルオキシメステロン(HALOTESTIN(登録商標))、フルタミド(EULEXIN(登録商標))、フルベストラント(FASLODEX(登録商標))、ゴセレリン(ZOLADEX(登録商標))、レトロゾール(FEMARA(登録商標))、ロイプロリド(ELIGARD(商標))、LUPRON(登録商標)、LUPRON DEPOT(登録商標)、VIADUR(商標))、メゲストロール(酢酸メゲストロール、MEGACE(登録商標))、ニルタミド(ANANDRON(登録商標)、NILANDRON(登録商標))、オクトレオチド(オクトレオチド酢酸塩、SANDOSTATIN(登録商標)、SANDOSTATIN LAR(登録商標))、ラロキシフェン(EVISTA(登録商標))、ロミプロスチム(NPLATE(登録商標))、タモキシフェン(NOVALDEX(登録商標))、およびトレミフェン(FARESTON(登録商標))、ホスホリパーゼA2阻害剤(例えば、アナグレリド(AGRYLIN(登録商標))、生体応答調節剤(例えば、BCG(THERACYS(登録商標)、TICE(登録商標))、およびダルベポエチンアルファ(ARANESP(登録商標))、標的治療剤(例えば、ボルテゾミブ(VELCADE(登録商標))、ダサチニブ(SPRYCEL(商標))、デニロイキンジフチトクス(ONTAK(登録商標))、エルロチニブ(TARCEVA(登録商標))、エベロリムス(AFINITOR(登録商標))、ゲフィチニブ(IRESSA(登録商標))、メシル酸イマチニブ(STI-571、GLEEVEC(商標))、ラパチニブ(TYKERB(登録商標))、ソラフェニブ(NEXAVAR(登録商標))、およびSU11248(スニチニブ、SUTENT(登録商標))、免疫調節抗血管新生剤(例えば、CC-5013(レナリドミド、REVLIMID(登録商標))、およびサリドマイド(THALOMID(登録商標))、糖質コルチコステロイド(例えば、コルチゾン(ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンリン酸エステルナトリウム、ヒドロコルチゾンコハク酸エステルナトリウム、ALAA-CORT(登録商標)、HYDROCORT ACETATE(登録商標)、ヒドロコルチゾンリン酸エステルLANAC

10

20

30

40

50

ORT（登録商標）、SOLU-CORTEF（登録商標）、デカドロン（デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム、DEXASONE（登録商標）、DIODEX（登録商標）、HEXADROL（登録商標）、MAXIDEX（登録商標）、メチルプレドニゾロン（6-メチルプレドニゾロン、酢酸メチルプレドニゾロン、メチルプレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム、DURALONE（登録商標）、MEDRALONE（登録商標）、MEDROL（登録商標）、M-PR EDNISOL（登録商標）、SOLU-MEDROL（登録商標）、プレドニゾロン（DELTA-CORTEF（登録商標）、ORAPRED（登録商標）、PEDIAPRED（登録商標）、PRELONE（登録商標）、およびプレドニゾン（DELTA SONE（登録商標）、LIQUID PRED（登録商標）、METICORTEN（登録商標）、ORASONE（登録商標））、およびビスホスホネート（例えば、パミドロネート（AREDIA（登録商標））、およびゾレドロン酸（ZOMETA（登録商標）））が挙げられる。

【0805】

ある実施形態において、多重特異性分子は、チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、受容体チロシンキナーゼ（RTK）阻害剤）と組み合わせて使用される。例示的なチロシンキナーゼ阻害剤としては、限定はされないが、上皮成長因子（EGF）経路阻害剤（例えば、上皮成長因子受容体（EGFR）阻害剤）、血管内皮成長因子（VEGF）経路阻害剤（例えば、VEGFに対する抗体、VEGFトラップ、血管内皮成長因子受容体（VEGFR）阻害剤（例えば、VEGFR-1阻害剤、VEGFR-2阻害剤、VEGFR-3阻害剤）、血小板由来成長因子（PDGF）経路阻害剤（例えば、血小板由来成長因子受容体（PDGFR）阻害剤（例えば、PDGFR- β 阻害剤）、RAF-1阻害剤、KIT阻害剤およびRET阻害剤が挙げられる。ある実施形態において、AHC剤と組み合わせて使用される抗癌剤は、アキシチニブ（AG013736）、ボスチニブ（SKI-606）、セジラニブ（RECENTIN（商標）、AZD2171）、ダサチニブ（SPRYCEL（登録商標）、BMS-354825）、エルロチニブ（TARCEVA（登録商標））、ゲフィチニブ（IRESSA（登録商標））、イマチニブ（Gleevec（登録商標）、CGP57148B、STI-571）、ラパチニブ（TYKERB（登録商標）、TYVERB（登録商標））、レスタウルチニブ（CEP-701）、ネラチニブ（HKI-272）、ニロチニブ（TASIGNA（登録商標））、セマキシニブ（セマキシニブ、SU5416）、スニチニブ（SUTENT（登録商標）、SU11248）、トセラニブ（PALLADIA（登録商標））、バンデタニブ（ZACTIMA（登録商標）、ZD6474）、バタラニブ（PTK787、PTK/ZK）、トラスズマブ（HERCEPTIN（登録商標））、ペバシズマブ（AVASTIN（登録商標））、リツキシマブ（RITUXAN（登録商標））、セツキシマブ（ERBITUX（登録商標））、パニツムマブ（VECTIBIX（登録商標））、ラニビズマブ（Lucentis（登録商標））、ニロチニブ（TASIGNA（登録商標））、ソラフェニブ（NEXAVAR（登録商標））、アレムツズマブ（CAMPATH（登録商標））、ゲムツズマブオゾガマイシン（MYLOTARG（登録商標））、ENMD-2076、PCI-32765、AC220、ドビチニブラクテート（dovitinib lactate）（TKI258、CHIR-258）、BIBW 2992（TOVOK（商標））、SGX523、PF-04217903、PF-02341066、PF-299804、BMS-777607、ABT-869、MP470、BIBF 1120（VARGATEF（登録商標））、AP24534、JNJ-26483327、MGCD265、DCC-2036、BMS-690154、CEP-11981、チボザニブ（tivozanib）（AV-951）、OSI-930、MM-121、XL-184、XL-647、XL228、AEE788、AG-490、AST-6、BMS-599626、CUDC-101、PD153035、ペリチニブ（pelitinib）（EKB-569）、バンデタニブ（zactima）、WZ3146、WZ4002、WZ8040、ABT-869（リニファニブ）、AEE788、AP24534（ポナチ

10

20

30

40

50

ニブ)、AV-951(チボザニブ)、アキシチニブ、BAY 73-4506(レゴラフェニブ(regorafenib))、ブリバニブアラニネート(brivanib alaninate)(BMS-582664)、ブリバニブ(BMS-540215)、セジラニブ(AZD2171)、CHIR-258(ドビチニブ)、CP 673451、CYC116、E7080、Ki8751、マシチニブ(masitinib)(AB1010)、MGCD-265、モテサニブジホスフェート(motesanib diphosphate)(AMG-706)、MP-470、OSI-930、パゾパニブ塩酸塩、PD173074、ソラフェニブトシル酸塩(Sorafenib Tosylate)(Bay 43-9006)、SU 5402、TSU-68(SU6668)、バタラニブ、XL880(GSK1363089、EXEL-2880)からなる群から選択される。選択されるチロシンキナーゼ阻害剤は、スニチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、またはソラフェニブから選択される。一実施形態において、チロシンキナーゼ阻害剤は、スニチニブである。

10

【0806】

一実施形態において、多重特異性分子は、抗血管新生剤、または血管標的化剤または血管破壊剤の1つまたは複数と組み合わせて投与される。例示的な抗血管新生剤としては、特に、限定はされないが、VEGF阻害剤(例えば、抗VEGF抗体(例えば、ベバシズマブ)；VEGF受容体阻害剤(例えば、イトラコナゾール)；内皮細胞の細胞増殖および／または遊走の阻害剤(例えば、カルボキシアミドトリアゾール、TNP-470)；血管新生刺激剤の阻害剤(例えば、スラミン)が挙げられる。血管標的化剤(VTA)または血管破壊剤(VDA)は、癌腫瘍の血管系(血管)を損傷して、中心壊死を引き起こすように設計される(例えば、Thorpe, P. E. (2004) Clin. Cancer Res. Vol. 10: 415-427に概説される)。VTAは、小分子であり得る。例示的な小分子VTAとしては、限定はされないが、微小管不安定化薬剤(例えば、コンブレタスタチンA-4リン酸二ナトリウム(CA4P)、ZD6126、AVE8062、Oxi 4503)；およびバジメザン(vadimezan)(ASA404)が挙げられる。

20

【0807】

免疫チェックポイント阻害剤

他の実施形態において、本明細書に記載される方法は、多重特異性分子と組み合わせた免疫チェックポイント阻害剤の使用を含む。本方法は、インビボで治療プロトコルに使用され得る。

30

【0808】

実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、チェックポイント分子を阻害する。例示的なチェックポイント分子としては、限定はされないが、CTLA4、PD1、PD-L1、PD-L2、TIM3、LAG3、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、BTLA、KIR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、およびA2aRが挙げられる。例えば、Pardoll, Nat. Rev. Cancer 12.4 (2012): 252-64(参照により本明細書に援用される)を参照されたい。

40

【0809】

実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1阻害剤、例えば、ニボルマブ、ペムブロリズマブまたはビディリズマブなどの抗PD-1抗体である。ニボルマブ(MDX-1106、MDX-1106-04、ONO-4538、またはBMS-936558とも呼ばれる)は、PD1を特異的に阻害する完全ヒトIgG4モノクローナル抗体である。例えば、米国特許第8,008,449号明細書および国際公開第2006/121168号パンフレットを参照されたい。ペムブロリズマブ(ランブルリズマブ、MK-3475、MK03475、SCH-900475またはKEYTRUDA(登録商標)とも呼ばれる；Merck)は、PD-1に結合するヒト化IgG4モノクローナル

50

抗体である。例えば、Hamid, O. et al. (2013) New England Journal of Medicine 369 (2) : 134-44、米国特許第8, 354, 509号明細書および国際公開第2009/114335号パンフレットを参照されたい。ピディリズマブ (CT-011またはCure Techとも呼ばれる) は、PD1に結合するヒト化IgG1kモノクローナル抗体である。例えば、国際公開第2009/101611号パンフレットを参照されたい。一実施形態において、PD-1の阻害剤は、それと実質的に同一または類似の配列、例えば、ニボルマブ、ペムブロリズマブまたはピディリズマブの配列と少なくとも85%、90%、95%またはそれを超えて同一の配列を有する抗体分子である。さらなる抗PD1抗体、例えば、AMP 514 (Amplimmune) は、例えば、米国特許第8, 609, 089号明細書、米国特許出願公開第2010028330号明細書、および/または米国特許出願公開第20120114649号明細書に記載されている。

【0810】

ある実施形態において、PD-1阻害剤は、イムノアドヘシン、例えば、定常領域 (例えば、免疫グロブリンのFc領域) に融合されるPD-1リガンド (例えば、PD-L1またはPD-L2) の細胞外/PD-1結合部分を含むイムノアドヘシンである。実施形態において、PD-1阻害剤は、AMP-224 (例えば、国際公開第2011/066342号パンフレットおよび国際公開第2010/027827号パンフレットに記載されるB7-DCIg)、B7-H1とPD-1との間の相互作用をブロックするPD-L2 Fc融合可溶性受容体である。

【0811】

実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L1阻害剤、例えば、抗体分子である。ある実施形態において、PD-L1阻害剤は、YW243.55.S70、MPDL3280A、MED1-4736、MSB-0010718C、またはMDX-1105である。ある実施形態において、抗PD-L1抗体は、MSB0010718C (A09-246-2とも呼ばれる; Merck Serono) であり、これは、PD-L1に結合するモノクローナル抗体である。例示的なヒト化抗PD-L1抗体は、例えば、国際公開第2013/079174号パンフレットに記載されている。一実施形態において、PD-L1阻害剤は、抗PD-L1抗体、例えば、YW243.55.S70である。YW243.55.S70抗体は、例えば、国際公開第2010/077634号パンフレットに記載されている。一実施形態において、PD-L1阻害剤は、例えば、国際公開第2007/005874号パンフレットに記載されるMDX-1105 (BMS-936559とも呼ばれる) である。一実施形態において、PD-L1阻害剤は、MDPDL3280A (Genentech/Roche) であり、これは、PD-L1に対するヒトFc-最適化IgG1モノクローナル抗体である。例えば、米国特許第7, 943, 743号明細書および米国特許出願公開第20120039906号明細書を参照されたい。一実施形態において、PD-L1の阻害剤は、それと実質的に同一または類似の配列、例えば、YW243.55.S70、MPDL3280A、MED1-4736、MSB-0010718C、またはMDX-1105の配列と少なくとも85%、90%、95%またはそれを超えて同一の配列を有する抗体分子である。

【0812】

実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-L2阻害剤、例えば、AMP-224である (これは、PD1とB7-H1との間の相互作用をブロックするPD-L2 Fc融合可溶性受容体である。例えば、国際公開第2010/027827号パンフレットおよび国際公開第2011/066342号パンフレットを参照されたい)。

【0813】

一実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、LAG-3阻害剤、例えば、抗LAG-3抗体分子である。実施形態において、抗LAG-3抗体は、BMS-986016 (BMS986016とも呼ばれる; Bristol-Myers Squibb) である。BMS-986016および他のヒト化抗LAG-3抗体は、例えば、米国特許出

10

20

30

40

50

願公開第2011/0150892号明細書、国際公開第2010/019570号パンフレット、および国際公開第2014/008218号パンフレットに記載されている。

【0814】

実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、例えば、米国特許第8,552,156号明細書、国際公開第2011/155607号パンフレット、欧州特許第2581113号明細書および米国特許出願公開第2014/044728号明細書に記載されるTIM-3阻害剤、例えば抗TIM3抗体分子である。

【0815】

実施形態において、免疫チェックポイント阻害剤は、CTLA-4阻害剤、例えば、抗CTLA-4抗体分子である。例示的な抗CTLA4抗体としては、トレメリムマブ（Pfizer製のIgG2モノクローナル抗体、以前はチシリムマブとして知られていた、CP-675,206）；およびイピリムマブ（MDX-010とも呼ばれる、CAS No. 477202-00-9）が挙げられる。他の例示的な抗CTLA-4抗体は、例えば、米国特許第5,811,097号明細書に記載されている。

【実施例】

【0816】

以下の実施例は、例示的であることが意図され、決して限定的であることは意図されていない。

【0817】

多重特異性分子およびその使用に向けられた実施例

一般的な方法：

1. プラスミドの構築

タンパク質配列をコードするDNAをモンゴルキヌゲネズミ（*Cricetulus griseus*）における発現について最適化し、合成し、Gatewayクローニングを用いて、pcDNA3.4-TOPO（Life Technologies A14697）へとクローニングした。全ての構築物は、Igκリーダー配列（配列番号84

【化136】

（配列番号84

ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCCAGGATCTACAGGA

、配列番号16METDTLLLVLLLVPGSTG）を含んでいた。使用される核酸配列は、表1に示される。

【0818】

2. 発現および精製

プラスミドを、Expi293細胞（Life Technologies A14527）またはExpiCHO細胞（Life Technologies A29127）のいずれかへと共トランスフェクトした。1：1のノブ対ホール重鎖比および3：2の軽鎖対重鎖比を用いて、多重特異性構築物のために1mgの全DNAを用いて、トランスフェクションを行った。ビオチン化が必要とされる場合、多重特異性構築物DNAに加えて、1リットル当たり250μgの配列番号226のBirAを加えた。Expi293細胞におけるトランスフェクションを、全DNAを用いて3：1の比率で直鎖状25,000Daポリエチレンイミン（PEI、Polysciences Inc 23966）を用いて行った。DNAおよびPEIをそれぞれ50mLのOptiMem（Life Technologies 31985088）培地に加え、滅菌ろ過した。DNAおよびPEIを、10分間組み合わせ、 $1.8 \sim 2.8 \times 10^6$ 個の細胞/mLの細胞密度および少なくとも95%の生存率を有するExpi293細胞に加えた。ExpiCHOトランスフェクションを、製造業者の指示に従って行った。Expi293細胞を、トランスフェクション後5～7日間にわたって8%のCO₂により、37℃において、加湿したイン

キュベータ中で成長させ、Exp i CHO細胞を、5 %のCO₂により、32℃において14日間にわたって成長させた。細胞を、4500×gで遠心分離によってペレット化し、上清を0.2 μmの膜に通してろ過した。プロテインA樹脂（GE 17-1279-03）を、ろ過された上清に加え、室温で1～3時間インキュベートした。樹脂を、3×10カラム体積のダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS、Life Technologies 14190-144）で洗浄されたカラムに充填した。結合タンパク質を、20mMのクエン酸塩、100mMのNaCl、pH2.9を含むカラムから溶出した。必要に応じて、DPBSの泳動用緩衝液を用いたSuperdex 200カラムにおいて、リガンド親和性および／またはサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、タンパク質をさらに精製した。

10

【0819】

3. ELISAアッセイ

ELISAアッセイを、Pierce 96ウェルストレプトアビジン被覆高容量プレート（15500）またはNunc-Immuno 96ウェルマキシソーププレート（Invitrogen 44-2404-21）のいずれかを用いて行った。プレートを1×リン酸緩衝生理食塩水tween 20（Pierce 28352）で洗浄し、次に10 μg/mLの捕捉タンパク質で被覆した。振とうしながら室温で2時間インキュベートした後、プレートを1×PBSTで洗浄し、分子を、1 μM～1 pMの連続希釈を用いて行A～Gに加えた。プレートを30分間インキュベートし、洗浄し、100 μLの、ペルオキシダーゼがコンジュゲートされたaffinipureヤギ抗ヒトIgG（109-035-008）またはstreptavidin-HRP（R&D Systems DY998）のいずれかを各ウェルに加えた。プレートを振とうしながら30分間インキュベートし、洗浄し、100 μLの1-step turbo TMB-ELISA基質溶液（Thermo Scientific 34022）を各ウェルに加えた。プレートを5分間インキュベートし、100 μLの1MのHClを用いて反応を停止させ、SpectraMax i3xプレートリーダーにおける450 nmでの吸光度を用いて、プレートを読み取った。

20

【0820】

4. 細胞殺滅アッセイ

産生された構築物の活性を評価するために、BxPC3-ルシフェラーゼ細胞殺滅アッセイを行った。ルシフェラーゼ（Genecopia SCL-C012-HLG）を含有するBxPC3細胞を、1 μg/mLのピュロマイシン（Gibco A1113802）とともに、RPMI 1640（Gibco 11875119）および10%のウシ胎仔血清（Gibco 10082147）中で成長させた。この細胞を用いて、1ウェル当たり15,000個の細胞で96ウェルプレートに播種した。1日インキュベートした後、培地を除去し、0.5%のPen/Strep（Gibco 15140122）を含む無血清培地RPMI 1640と交換した。無血清培地中のPBMC（C.T.L. Lot # LP_123）を、450,000個の細胞／ウェルで96ウェルプレートの行A～Gに加えた。化合物を、行A～F中の1 μM～1 pMの範囲の濃度において3連でカラムに加えた。プレートを測定前に6または24時間インキュベートした。細胞殺滅測定へと進む前に120 μLを各ウェルから取り出し、96ウェル低結合タンパク質プレートに加えた。これにより80 μLがプレートに残り、80 μLのBright-Glo（Promega E2610）を各ウェルに加えた。次に、SpectraMax i3xプレートリーダーにおいてプレートを読み取った。

30

40

【0821】

5. サイトカイン放出アッセイ

サイトカイン放出アッセイのために、細胞殺滅プレートから取り出した上清を、quansys洗浄緩衝液で5倍に希釈した。QuansysヒトIFNγ（Quansys 464649HU）singleplexアッセイキットについて、製造業者の指示に従った。プレートをBioRad ChemiDoc XRS+において撮像し、Quansy

50

s Q-viewソフトウェアを用いて分析した。

【0822】

実施例1

3つの異なるタンパク質鎖：配列番号168、配列番号169、および配列番号196を含む、メソテリンを標的化するFabアームおよびIL2エフェクターアームを含有する多重特異性分子1を、細胞に、配列番号116、配列番号118、および配列番号119を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子1を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図21に示される。図43は、多重特異性分子1のサイズ排除クロマトグラムを示す。配列番号181のヒトメソテリンを用いて行われたELISAにより、112pMのEC50が得られた（図48）。図53は、配列番号182のヒトIL2受容体αとの結合を評価し、111pMのEC50が得られたことを示す。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、79pMであった（図58）。図59は、アッセイにおける多重特異性分子1についてのIFNγのサイトカイン放出データを示す。

10

【0823】

実施例2

配列番号174、配列番号169、配列番号196を含む、メソテリンを標的化するFabアーム、IL2エフェクターアーム、および抗NKp30 NK細胞エンゲージャを含有する多重特異性分子2を、細胞に、配列番号117、配列番号118、および配列番号119を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子2を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図22に示される。配列番号181のヒトメソテリンを用いて行われたELISAにより、1.38nMのEC50が得られた（図48）。図53は、154pMのEC50で、配列番号182のヒトIL2受容体αとの結合を示す。配列番号180から生成されるヒトNKp30との結合により、230nMのEC50が得られた（図55）。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、4.7pMであった（図58）。図59は、アッセイにおける多重特異性分子2についてのIFNγのサイトカイン放出データを示す。

20

【0824】

実施例3

配列番号174、配列番号169、および配列番号197を含む、メソテリン標的化アームおよび抗NKp30 NK細胞エンゲージャを含有する多重特異性分子3を、細胞に、配列番号117、配列番号118、および配列番号125を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子3を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図23に示される。配列番号181のヒトメソテリンを用いて行われたELISAにより、152pMのEC50が得られた（図48）。配列番号180から生成されるヒトNKp30との結合により、93.4nMのEC50が得られた（図55）。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、5.9pMであった（図58）。図59は、アッセイにおける多重特異性分子3についてのIFNγのサイトカイン放出データを示す。

30

【0825】

実施例4

配列番号176および配列番号196を含む、IL2エフェクターアームを含有する多重特異性分子4を、細胞に、配列番号124および配列番号119を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子4を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図24に示される。図53は、配列番号182のヒトIL2受容体αとの結合を評価し、110pMのEC50が得られたことを示す。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、41pMであった（図58）。図59は、アッセイにおける多重特異性分子4についてのIFNγのサイトカイン放出データを示す。

40

【0826】

実施例5

配列番号172、配列番号173、配列番号192、および配列番号171を含む、メソテリン標的化アームおよびPDL1標的化アームを含有する多重特異性分子5を、細胞に

50

、配列番号122、配列番号123、配列番号135、および配列番号121を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子5を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図25に示される。図44は、多重特異性分子5のサイズ排除クロマトグラムを示す。配列番号181のヒトメソテリンを用いて行われたELISAにより、163 nMのEC50が得られた(図49)。配列番号178のヒトPDL1を用いて行われたELISAにより、250 pMのEC50が得られた(図51)。多重特異性分子5は、細胞殺滅アッセイにおいて有意な効果を有さなかった(図60)。

【0827】

実施例6

配列番号172、配列番号173、配列番号177、および配列番号171を含む、メソテリン標的化アーム、PDL1標的化アーム、およびIL2エフェクターアームを含有する多重特異性分子6を、細胞に、配列番号122、配列番号123、配列番号120、および配列番号121を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子6を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図26に示される。配列番号181のヒトメソテリンを用いて行われたELISAにより、13.1 nMのEC50が得られた(図49)。配列番号178のヒトPDL1を用いて行われたELISAにより、363 pMのEC50が得られた(図51)。図54は、配列番号182のヒトIL2受容体 α との結合を評価し、156 pMのEC50が得られたことを示す。多重特異性分子6は、図60に示される細胞殺滅アッセイにおいて、159 pMのEC50を示した。

【0828】

実施例7

配列番号193、配列番号173、配列番号192、および配列番号171を含む、メソテリン標的化アーム、PDL1標的化アーム、および抗NKp46 NK細胞エンゲージヤを含有する多重特異性分子7を、細胞に、配列番号136、配列番号123、配列番号135、および配列番号121を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子7を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図27に示される。配列番号181のヒトメソテリンを用いて行われたELISAにより、2.37 nMのEC50が得られた(図49)。配列番号178のヒトPDL1を用いて行われたELISAにより、158 pMのEC50が得られた(図51)。図56は、450 pMのEC50で、配列番号179からのヒトNKp46との結合を示す。多重特異性分子7は、15 pMのEC50で、細胞殺滅アッセイにおいて細胞の増殖を示した(図60)。

【0829】

実施例8

配列番号193、配列番号173、配列番号192、および配列番号171を含む、メソテリン標的化アーム、PDL1標的化アーム、IL2エフェクターアーム、および抗NKp46 NK細胞エンゲージヤを含有する多重特異性分子8を、細胞に、配列番号136、配列番号123、配列番号135、および配列番号121を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子8を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図28に示される。配列番号181のヒトメソテリンを用いて行われたELISAにより、1.77 nMのEC50が得られた(図49)。配列番号178のヒトPDL1を用いて行われたELISAにより、255 pMのEC50が得られた(図52)。図54は、84 pMのEC50で、配列番号182のヒトIL2受容体 α との結合を示す。図57は、670 pMのEC50で、配列番号179からのヒトNKp46との結合を示す。多重特異性分子8は、44 pMのEC50で、細胞殺滅アッセイにおいて細胞の増殖を示した(図60)。

【0830】

実施例9

配列番号193、配列番号173、配列番号192、および配列番号171を含む、メソテリン標的化アーム、PDL1標的化アーム、および抗NKp46 NK細胞エンゲージヤを含有する多重特異性分子9を、細胞に、配列番号136、配列番号123、配列番号

10

20

30

40

50

135、および配列番号121を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子9を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図29に示される。配列番号181のタンパク質1を用いて行われたELISAにより、275 nMのEC50が得られた(図50)。配列番号178のヒトPDL1を用いて行われたELISAにより、124 pMのEC50が得られた(図51)。図56は、6.2 nMのEC50で、配列番号179からのヒトNKp46との結合を示す。多重特異性分子9は、84 pMのEC50で、細胞殺滅アッセイにおいて細胞の増殖を示した(図)。

【0831】

実施例10

配列番号193、配列番号173、配列番号192、および配列番号171を含む、メソテリン標的化アーム、PDL1標的化アーム、IL2エフェクターアーム、および抗NKp46 NK細胞エンゲージャを含有する多重特異性分子10を、細胞に、配列番号136、配列番号123、配列番号135、および配列番号121を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子10を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図30に示される。配列番号181のヒトメソテリンを用いて行われたELISAにより、263 nMのEC50が得られた(図50)。配列番号178のヒトPDL1を用いて行われたELISAにより、1.91 nMのEC50が得られた(図52)。図54は、88 pMのEC50で、配列番号182のヒトIL2受容体 α との結合を示す。図57は、1.8 nMのEC50で、配列番号179からのヒトNKp46との結合を示す。多重特異性分子10は、35 pMのEC50で、細胞殺滅アッセイにおいて細胞の増殖を示した(図61)。

【0832】

実施例11

配列番号193、配列番号173、配列番号192、および配列番号171を含む、メソテリン標的化アーム、PDL1標的化アーム、および抗NKp46 NK細胞エンゲージャを含有する多重特異性分子11を、細胞に、配列番号136、配列番号123、配列番号135、および配列番号121を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子11を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図31に示される。図45は、多重特異性分子11のサイズ排除クロマトグラムを示す。配列番号178のヒトPDL1を用いて行われたELISAにより、206 pMのEC50が得られた(図52)。図56は、8.7 nMのEC50で、配列番号179からのヒトNKp46との結合を示す。多重特異性分子11は、119 pMのEC50で、細胞殺滅アッセイにおいて細胞の増殖を示した(図62)。

【0833】

実施例12

配列番号193、配列番号173、配列番号192、および配列番号171を含む、メソテリン標的化アーム、PDL1標的化アーム、IL2エフェクターアーム、および抗NKp46 NK細胞エンゲージャを含有する多重特異性分子12を、細胞に、配列番号136、配列番号123、配列番号135、および配列番号121を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子12を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図32に示される。図26は、多重特異性分子12のサイズ排除クロマトグラムを示す。配列番号181のヒトメソテリンを用いて行われたELISAにより、216 nMのEC50が得られた(図50)。配列番号178のヒトPDL1を用いて行われたELISAにより、1.82 nMのEC50が得られた(図52)。図54は、107 pMのEC50で、配列番号182のヒトIL2受容体 α との結合を示す。図57は、19.3 nMのEC50で、配列番号179からのヒトNKp46との結合を示す。多重特異性分子12は、16 pMのEC50で、細胞殺滅アッセイにおいて細胞の増殖を示した(図62)。

【0834】

実施例13

配列番号187、配列番号185、および配列番号184を含む、HER3標的化アーム、IGF1R標的化アーム、およびIL2エフェクターアームを含有する多重特異性分子13を、細胞に、配列番号DNA BH022、配列番号128、および配列番号127を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子13を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図33に示される。図47は、多重特異性分子13のサイズ排除クロマトグラムを示す。配列番号182からのヒトIL2R α を用いた多重特異性分子13のELISAにより、85 pMのEC50が得られた（図65）。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、14 pMであった（図67）。図68は、アッセイにおける多重特異性分子13についてのIFN γ のサイトカイン放出データを示す。

【0835】

実施例14

配列番号188、配列番号183、および配列番号184を含む、HER3標的化アーム、IGF1R標的化アーム、および抗NKp46 NK細胞エンゲージャを含有する多重特異性分子14を、細胞に、配列番号131、配列番号126、および配列番号127を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子14を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図34に示される。図66は、2.3 nMのEC50で、配列番号179からのヒトNKp46との結合を示す。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、100 pMであった（図67）。図68は、アッセイにおける多重特異性分子14についてのIFN γ のサイトカイン放出データを示す。

【0836】

実施例15

配列番号189、配列番号183、および配列番号184を含む、HER3標的化アーム、IGF1R標的化アーム、およびCD3標的化アームを含有する多重特異性分子15を、細胞に、配列番号132、配列番号126、および配列番号127を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子15を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図35に示される。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、277 pMであった（図69）。図70は、アッセイにおける多重特異性分子15についてのIFN γ のサイトカイン放出データを示す。

【0837】

実施例16

配列番号188、配列番号185、および配列番号184を含む、HER3標的化アーム、IGF1R標的化アーム、抗NKp46 NK細胞エンゲージャ、およびIL2エフェクターアームを含有する多重特異性分子16を、細胞に、配列番号131、配列番号128、および配列番号127を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子16を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図36に示される。配列番号182からのヒトIL2R α を用いた多重特異性分子16のELISAにより、167 pMのEC50が得られた（図65）。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、330 pMであった（図67）。図68は、アッセイにおける多重特異性分子16についてのIFN γ のサイトカイン放出データを示す。

【0838】

実施例17

配列番号189、配列番号185、および配列番号184を含む、HER3標的化アーム、IGF1R標的化アーム、CD3標的化アーム、およびIL2エフェクターアームを含有する多重特異性分子17を、細胞に、配列番号132、配列番号128、および配列番号127を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子17を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図37に示される。配列番号182からのヒトIL2R α を用いた多重特異性分子17のELISAにより、116 pMのEC50が得られた（図65）。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、18 pMであった（図69）。図70は、アッセイにおける多重特異性分子17についてのIFN γ のサイトカイン放出データを示す。

【0839】

実施例18

配列番号187、配列番号183、および配列番号184を含む、HER3標的化アームおよびIGF1R標的化アームを含有する多重特異性分子18を、細胞に、配列番号DNA BH022、配列番号126、および配列番号127を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子18を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図38に示される。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、28pMであった(図67)。図68は、アッセイにおける多重特異性分子18についてのIFN γ のサイトカイン放出データを示す。

【0840】

実施例19

配列番号187、配列番号186、および配列番号184を含む、HER3標的化アーム、IGF1R標的化アーム、およびIL7エフェクターアームを含有する多重特異性分子19を、細胞に、配列番号130、配列番号129、および配列番号127を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子19を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図39に示される。

【0841】

実施例20

配列番号189、配列番号186、および配列番号184を含む、HER3標的化アーム、IGF1R標的化アーム、CD3標的化アーム、およびIL7エフェクターアームを含有する多重特異性分子20を、細胞に、配列番号132、配列番号129、および配列番号127を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子20を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図40に示される。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、445pMであった(図71)。図72は、アッセイにおける多重特異性分子20についてのIFN γ のサイトカイン放出データを示す。

【0842】

実施例21

配列番号190、配列番号169、配列番号186、および配列番号184を含む、HER3標的化アーム、IGF1R標的化アーム、抗NKp46 NK細胞エンゲージャ、およびIL7エフェクターアームを含有する多重特異性分子21を、細胞に、配列番号133、配列番号118、配列番号128、および配列番号127を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子21を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図41に示される。図46は、1.3nMのEC50で、配列番号179からのヒトNKp46との結合を示す。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、770pMであった(図73)。図74は、アッセイにおける多重特異性分子21についてのIFN γ のサイトカイン放出データを示す。

【0843】

実施例22

配列番号190、配列番号169、配列番号192、および配列番号191を含む、メソテリン標的化アーム、IL2エフェクターを有するPDL1標的化アーム、および抗NKp46 NK細胞エンゲージャを含有する多重特異性分子22を、細胞に、配列番号133、配列番号118、配列番号135、および配列番号134を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子22を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図42に示される。配列番号181からのヒトメソテリンを用いた多重特異性分子22のELISAにより、310pMのEC50が得られた(図63)。図44は、8pMのEC50で、配列番号178からのヒトPDL1に結合する多重特異性分子22についてのデータを示す。配列番号182からのヒトIL2R α を用いた多重特異性分子22のELISAにより、8.2nMのEC50が得られた(図65)。図46は、2.4nMのEC50で、配列番号179からのヒトNKp46との結合を示す。細胞殺滅アッセイにおけるEC50は、995pMであった(図75)。図76は、アッセイにおける多重

10

20

30

40

50

特異性分子 22 についての IFN γ のサイトカイン放出データを示す。

【0844】

実施例 23

配列番号 168、配列番号 169、配列番号 192、および配列番号 171 を含む、メソテリン標的化アームおよび PDL1 標的化アームを含有する多重特異性分子 23 を、細胞に、配列番号 116、配列番号 118、配列番号 135、および配列番号 121 を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子 23 を精製し、図 75 に示される細胞殺滅アッセイに使用して、250 pM の EC₅₀ を得た。図 76 は、アッセイにおける多重特異性分子 23 についての IFN γ のサイトカイン放出データを示す。

【0845】

間質調節部分を含む多重特異性分子およびその使用に向けられた実施例

一般的な方法：

1. プラスミドの構築

タンパク質配列をコードする DNA をモンゴルキヌゲネズミ (*Cricetulus griseus*) における発現について最適化し、合成し、Gateway クローニングを用いて、pCDNA3.4-TOPO (Life Technologies A14697) へとクローニングした。全ての構築物は、Ig κ リーダー配列 (配列番号 84

【化 137】

(配列番号 84

ATGGAAACCGACACACTGCTGCTGTGGGTGCTGCTCTTGTGGGTGCCAGGATCTACAGGA

、配列番号 64 METDTLLLVLLLVPGSTG) を含んでいた。使用される核酸配列は、表 10 に示される。

【0846】

2. 発現および精製

プラスミドを、Expi293 細胞 (Life Technologies A14527) または ExpiCHO 細胞 (Life Technologies A29127) のいずれかへと共トランスフェクトした。1:1 のノブ対ホール重鎖比および 3:2 の軽鎖対重鎖比を用いて、多重特異性構築物のために 1 mg の全 DNA を用いて、トランスフェクションを行った。ビオチン化が必要とされる場合、多重特異性構築物 DNA に加えて、1 リットル当たり 250 μ g の配列番号 144 226 の BirA を加えた。Expi293 細胞におけるトランスフェクションを、全 DNA を用いて 3:1 の比率で直鎖状 25,000 Da ポリエチレンイミン (PEI, Polysciences Inc 23966) を用いて行った。DNA および PEI をそれぞれ 50 mL の OptiMem (Life Technologies 31985088) 培地に加え、滅菌ろ過した。DNA および PEI を、10 分間組み合わせて、 $1.8 \sim 2.8 \times 10^6$ 個の細胞/mL の細胞密度および少なくとも 95% の生存率を有する Expi293 細胞に加えた。ExpiCHO トランスフェクションを、製造業者の指示に従って行った。Expi293 細胞を、トランスフェクション後 5~7 日間にわたって 8% の CO₂ により、37℃において、加湿したインキュベータ中で成長させ、ExpiCHO 細胞を、5% の CO₂ により、32℃において 14 日間にわたって成長させた。細胞を、4500 $\times$ g で遠心分離によってペレット化し、上清を 0.2 μ m の膜に通してろ過した。プロテイン A 樹脂 (GE 17-1279-03) を、ろ過された上清に加え、室温で 1~3 時間インキュベートした。樹脂を、3 $\times$ 10 カラム体積のダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS, Life Technologies 14190-144) で洗浄されたカラムに充填した。結合タンパク質を、20 mM のクエン酸塩、100 mM の NaCl、pH 2.9 を含むカラムから溶出した。必要に応じて、DPBS の泳動用緩衝液を用いた Superdex 200 カラムにおいて、リガンド親和性および/またはサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、タ

10

20

30

40

50

ンパク質をさらに精製した。

【0847】

3. ELISAアッセイ

ELISAアッセイを、Pierce 96ウェルストレプトアビジン被覆高容量プレート(15500)またはNunc-Immuno 96ウェルマキシソーププレート(Invitrogen 44-2404-21)のいずれかを用いて行った。プレートを1×リン酸緩衝生理食塩水tween 20(Pierce 28352)で洗浄し、次に10 µg/mLの捕捉タンパク質で被覆した。振とうしながら室温で2時間インキュベートした後、プレートを1×PBSTで洗浄し、分子を、1 µM~1 pMの連続希釈を用いて行A~Gに加えた。プレートを30分間インキュベートし、洗浄し、100 µLの、ペルオキシダーゼがコンジュゲートされたaffinipureヤギ抗ヒトIgG(109-035-008)またはストレプトアビジン-HRP(R&D Systems DY998)のいずれかを各ウェルに加えた。プレートを振とうしながら30分間インキュベートし、洗浄し、100 µLの1-step turbo TMB-ELISA基質溶液(Thermo Scientific 34022)を各ウェルに加えた。プレートを5分間インキュベートし、100 µLの1MのHClを用いて反応を停止させ、SpectraMax i3xプレートリーダーにおける450 nmでの吸光度を用いて、プレートを読み取った。

【0848】

4. 細胞殺滅アッセイ

産生された構築物の活性を評価するために、BxPC3ルシフェラーゼ細胞殺滅アッセイを行った。ルシフェラーゼ(Genecopia SCL-C012-HLG)を含有するBxPC3細胞を、1 µg/mLのピューロマイシン(Gibco A1113802)とともに、RPMI 1640(Gibco 11875119)および10%のウシ胎仔血清(Gibco 10082147)中で成長させた。この細胞を用いて、1ウェル当たり15,000個の細胞で96ウェルプレートに播種した。1日インキュベートした後、培地を除去し、0.5%のPen/Strep(Gibco 15140122)を含む無血清培地RPMI 1640と交換した。無血清培地中のPBMC(C.T.L. Lot # LP_123)を、450,000個の細胞/ウェルで96ウェルプレートの行A~Gに加えた。化合物を行A~F中の1 µM~10 pMの範囲の濃度において3連でカラムに加えた。プレートを測定前に6または24時間インキュベートした。細胞殺滅測定へと進む前に120 µLを各ウェルから取り出し、96ウェル低結合タンパク質プレートに加えた。これにより80 µLがプレートに残り、80 µLのBright-Glo(Promega E2610)を各ウェルに加えた。次に、SpectraMax i3xプレートリーダーにおいてプレートを読み取った。

【0849】

5. サイトカイン放出アッセイ

サイトカイン放出アッセイのために、細胞殺滅プレートから取り出した上清を、quansys洗浄緩衝液で5倍に希釈した。QuansysヒトIFNγ(Quansys 464649HU) singleplexアッセイキットについて、製造業者の指示に従った。プレートをBioRad ChemiDoc XRS+において撮像し、Quansys Q-viewソフトウェアを用いて分析した。

【0850】

6. 比濁ヒアルロニダーゼ酵素アッセイ

ヒアルロニダーゼ活性を試験するために、酵素アッセイを、上述されるように行った(Dorfman, A., Ott, M. L. A Turbidimetric Method for the Assay of Hyaluronidase, Journal of Biological Chemistry, 1948)。ヒアルロン酸(Sigma 53747)のストック溶液を、300 mMのリン酸ナトリウム、pH 5.35中1 mg/mLで調製した。ヒアルロニダーゼ含有構築物を、20 mMのリン酸ナトリウム、pH 7

10

20

30

40

50

・ 0、77mMの塩化ナトリウム、0.01%のウシ血清アルブミン（Sigma A6003）中1mg/mLに希釈した。0.01mg/mL～1mg/mLの酵素構築物を、1mg/mLのヒアルロン酸と組み合わせて、37℃で45分間インキュベートした。次に、酸性化したBSA溶液（24mMの酢酸ナトリウム、79mMの酢酸、0.1%のウシ血清アルブミン、pH3.75）を、酵素および基質に加えた。室温で10分間インキュベートした後、活性を540nmでの吸光度で測定した。酵素がヒアルロン酸を分解するにつれて、ヒアルロニダーゼ活性は、吸光度の低下として見られる。

【0851】

7. ヒアルロニダーゼザイモグラム

ヒアルロニダーゼ活性をさらに実証するために、0.1mg/mLのヒアルロン酸（Sigma 53747）を含有する12%のSDS-PAGEゲルを作製した。構築物をゲル上で泳動させ、次にゲルを1時間にわたって3%のTriton X-100（Sigma 93443）中でインキュベートした。次に、ゲルを37℃で16時間にわたってアッセイ緩衝液（20mMのクエン酸塩、150mMの塩化ナトリウム、pH3.5）中でインキュベートした。ゲルを、0.5%のアルシアンブルー（Alcian Blue）（Sigma B8438）を用いてヒアルロニダーゼ活性について染色し、アルシアンブルーは、ヒアルロン酸を青色に染色し、酵素がヒアルロン酸を分解した場合は透明の点を残す。

【0852】

8. ゼラチナーゼA酵素アッセイ

製造業者の指示に従って、EnzCheckゼラチナーゼ/コラゲナーゼアッセイキット（Molecular Probes E-12055）を用いて、MMP-2を含有する構築物の酵素活性を決定した。

【0853】

実施例24

3つの異なるタンパク質鎖：配列番号214、配列番号215、および配列番号219を含む、FAPを標的化するFabアームおよびヒアルロニダーゼアームを含有する多重特異性分子24を、細胞に、配列番号202、配列番号203、および配列番号207を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子23を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図77に示される。多重特異性分子23のサイズ排除クロマトグラムが図86に示される。配列番号225から生成されるヒトFAPを用いて、ELISAを行ったところ、144nMのEC50が得られた（図94）。図98は、多重特異性分子24がヒアルロニダーゼ活性を有することを実証する。ヒアルロニダーゼザイモグラム（図100）中の青色背景における白色のバンドの存在は、多重特異性分子24のヒアルロニダーゼ活性をさらに実証する。

【0854】

実施例25

配列番号218、配列番号215、配列番号219を含む、FAPを標的化するFabアーム、IL2エフェクターアーム、およびヒアルロニダーゼアームを含有する多重特異性分子25を、細胞に、配列番号206、配列番号203、および配列番号207を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子24を精製し、最終産物のSDS-PAGEゲルが図78に示される。多重特異性分子24のサイズ排除クロマトグラムが図87に示される。配列番号225から生成されるヒトFAPを用いて、ELISAを行ったところ、128nMのEC50が得られた（図94）。図781は、101nMのEC50で、ヒトIL2Rα（配列番号182から生成される）への多重特異性分子25の結合を示す。図98は、多重特異性分子25がヒアルロニダーゼ活性を有することを実証する。ヒアルロニダーゼザイモグラム（図100）中の青色背景における白色のバンドの存在は、多重特異性分子25のヒアルロニダーゼ活性をさらに実証する。

【0855】

実施例26

配列番号 214、配列番号 215、および配列番号 224を含む、FAP 標的化アームおよびヒアルロニダーゼアームを含有する多重特異性分子 26 を、細胞に、配列番号 202、配列番号 203、および配列番号 212 を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子 25 を精製し、最終産物の SDS-PAGE ゲルが図 79 に示される。多重特異性分子 25 のサイズ排除クロマトグラムが図 88 に示される。配列番号 225 から生成されるヒト FAP を用いて、ELISA を行ったところ、18.5 nM の EC50 が得られた (図 94)。図 98 は、多重特異性分子 26 がヒアルロニダーゼ活性を有することを実証する。ヒアルロニダーゼサイモグラム (図 100) 中の青色背景における白色のバンドの存在は、多重特異性分子 26 のヒアルロニダーゼ活性をさらに実証する。

【0856】

実施例 27

配列番号 220、配列番号 171、配列番号 219、および配列番号 215を含む、PDL1 標的化アーム、FAP 標的化アーム、およびヒアルロニダーゼアームを含有する多重特異性分子 27 を、細胞に、配列番号 121、配列番号 207、および配列番号 208 を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子 26 を精製し、最終産物の SDS-PAGE ゲルが図 80 に示される。配列番号 178 のヒト PDL1 を用いて行われた ELISA により、52 pM の EC50 が得られた (図 93)。配列番号 225 から生成されるヒト FAP を用いて、ELISA を行ったところ、44 nM の EC50 が得られた (図 94)。図 99 は、多重特異性分子 27 がヒアルロニダーゼ活性を有することを実証する。ヒアルロニダーゼサイモグラム (図 100) 中の青色背景における白色のバンドの存在は、多重特異性分子 27 のヒアルロニダーゼ活性をさらに実証する。

【0857】

実施例 28

配列番号 221、配列番号 171、配列番号 219、および配列番号 215を含む、PDL1 標的化アーム、FAP 標的化アーム、IL2 エフェクターアーム、およびヒアルロニダーゼアームを含有する多重特異性分子 28 を、細胞に、配列番号 209、配列番号 121、配列番号 207、および配列番号 208 を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子 27 を精製し、最終産物の SDS-PAGE ゲルが図 81 に示される。多重特異性分子 27 のサイズ排除クロマトグラムが図 90 に示される。配列番号 178 のヒト PDL1 を用いて行われた ELISA により、0.207 nM の EC50 が得られた (図 93)。配列番号 225 から生成されるヒト FAP を用いて、ELISA を行ったところ、69 nM の EC50 が得られた (図 95)。図 97 は、97 nM の EC50 で、ヒト IL2R α (配列番号 182 から生成される) への多重特異性分子 27 の結合を示す。図 99 は、多重特異性分子 28 がヒアルロニダーゼ活性を有することを実証する。ヒアルロニダーゼサイモグラム (図 100) 中の青色背景における白色のバンドの存在は、多重特異性分子 28 のヒアルロニダーゼ活性をさらに実証する。

【0858】

実施例 29

配列番号 221、配列番号 171、配列番号 222、および配列番号 223を含む、PDL1 標的化アーム、抗 NKp46 NK 細胞エンゲージャ、IL2 エフェクターアーム、およびヒアルロニダーゼアームを含有する多重特異性分子 29 を、細胞に、配列番号 209、配列番号 121、配列番号 210、および配列番号 211 を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子 28 を精製し、最終産物の SDS-PAGE ゲルが図 82 に示される。多重特異性分子 28 のサイズ排除クロマトグラムが図 91 に示される。配列番号 178 のヒト PDL1 を用いて行われた ELISA により、866 pM の EC50 が得られた (図 93)。配列番号 179 からのヒト NKp46 を用いた ELISA により、126 pM の EC50 が得られた (図 96)。図 97 は、48 nM の EC50 で、ヒト IL2R α (配列番号 182 から生成される) への多重特異性分子 6 の結合を示す。図 99 は、多重特異性分子 29 がヒアルロニダーゼ活性を有することを実証する。ヒアルロニダーゼサイモグラム (図 100) 中の青色背景における白色のバンドの存在は、

多重特異性分子 29 のヒアルロニダーゼ活性をさらに実証する。

【0859】

実施例 30

配列番号 214、配列番号 215、および配列番号 216 を含む、FAP 標的化アームおよびゼラチナーゼアームを含有する多重特異性分子 30 を、細胞に、配列番号 202、配列番号 203、および配列番号 207 を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子 29 を精製し、最終産物の SDS-PAGE ゲルが図 83 に示される。多重特異性分子 30 のサイズ排除クロマトグラムが図 92 に示される。配列番号 225 から生成されるヒト FAP を用いて、ELISA を行ったところ、385 nM の EC50 が得られた (図 95)。図 101 は、多重特異性分子 30 がコラゲナーゼ活性を有すること

10

【0860】

実施例 31

配列番号 214、配列番号 215、および配列番号 217 を含む、FAP 標的化アームおよびゼラチナーゼアームを含有する多重特異性分子 31 を、細胞に、配列番号 202、配列番号 203、および配列番号 D205 を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子 30 を精製し、最終産物の SDS-PAGE ゲルが図 84 に示される。多重特異性分子 31 のサイズ排除クロマトグラムが図 93 に示される。配列番号 225 から生成されるヒト FAP を用いて、ELISA を行ったところ、466 nM の EC50 が得られた (図 95)。図 101 は、多重特異性分子 31 がコラゲナーゼ活性を有すること

20

【0861】

実施例 32

配列番号 221、配列番号 171、配列番号 216、および配列番号 215 を含む、PDL1 標的化アーム、FAP 標的化アーム、IL2 エフェクターアーム、およびゼラチナーゼアームを含有する多重特異性分子 32 を、細胞に、配列番号 209、配列番号 121、配列番号 204、および配列番号 203 を共トランスフェクトすることによって発現させた。多重特異性分子 31 を精製し、最終産物の SDS-PAGE ゲルが図 85 に示される。配列番号 178 のヒト PDL1 を用いて行われた ELISA により、155 pM の EC50 が得られた (図 93)。配列番号 225 から生成されるヒト FAP を用いて、ELISA を行ったところ、85 nM の EC50 が得られた (図 95)。図 97 は、36 nM の EC50 で、ヒト IL2R α (配列番号 182 から生成される) への多重特異性分子 32 の結合を示す。図 101 は、多重特異性分子 32 がコラゲナーゼ活性を有すること

30

【0862】

参照による援用

本明細書において言及される全ての刊行物および特許は、各個々の刊行物または特許が参照により援用されるように具体的にかつ個別に示されているかのように、全体が参照により本明細書に援用される。

【0863】

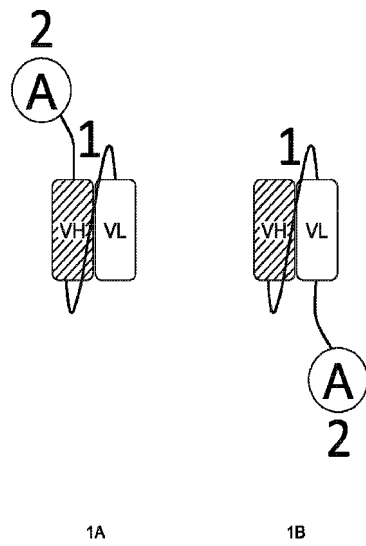
均等物

当業者は、単なる日常的な実験を用いて、本明細書に記載される本発明の特定の実施形態の多くの均等物を認識または確認することができる。このような均等物は、以下の特許請求の範囲によって包含されることが意図される。

40

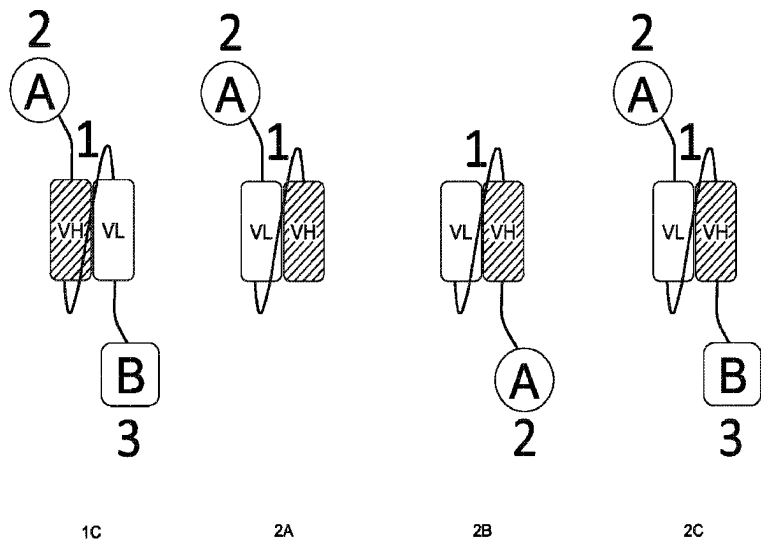
【図面】

【図 1 A - 1 C】



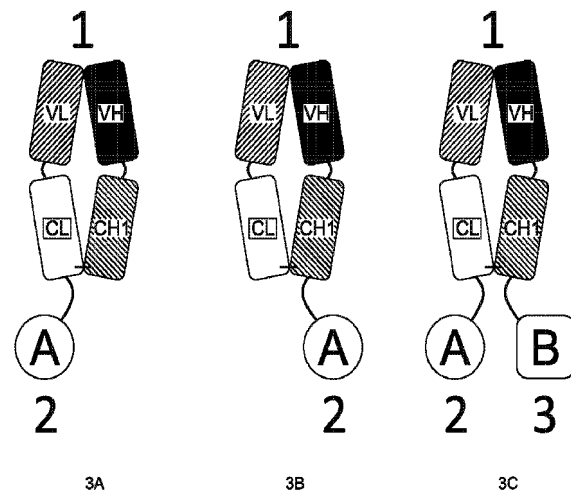
FIGS. 1A-1C

【図 2 A - 2 C】



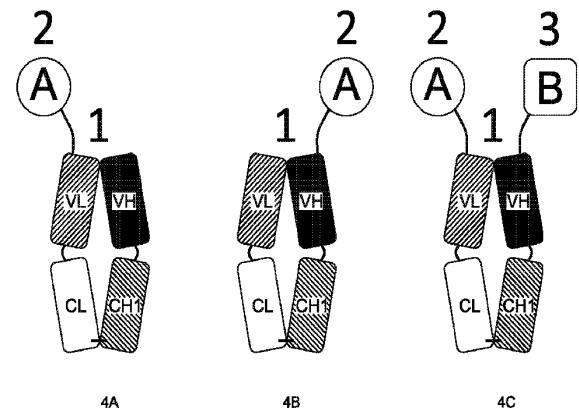
FIGS. 2A-2C

【図 3 A - 3 C】



FIGS. 3A-3C

【図 4 A - 4 C】



FIGS. 4A-4C

10

20

30

40

50

【図 5 A - 5 C】

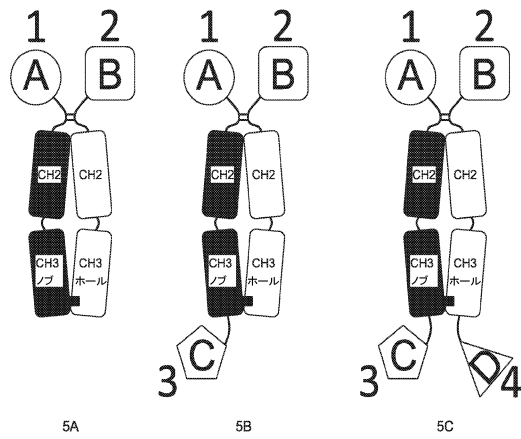
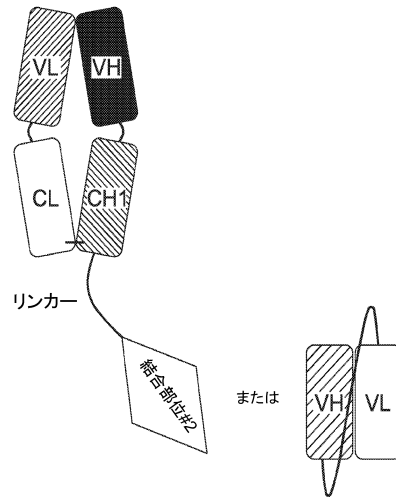


図 5A-5C

【図 6】

結合部位#1: Fab、例えば、腫瘍または間質標的化部分



結合部位#2: 免疫細胞エンゲージャ(例えば、リガンドまたは抗体分子、例えば、scFv)、または サイトカイン分子

図 6

【図 7】

結合部位#1: Fab、例えば、腫瘍または間質標的化部分

結合部位#2: 結合部位#2-免疫細胞
エンゲージャ(例えば、リガンドまたは抗体分子、
例えば、scFv)、または サイトカイン分子

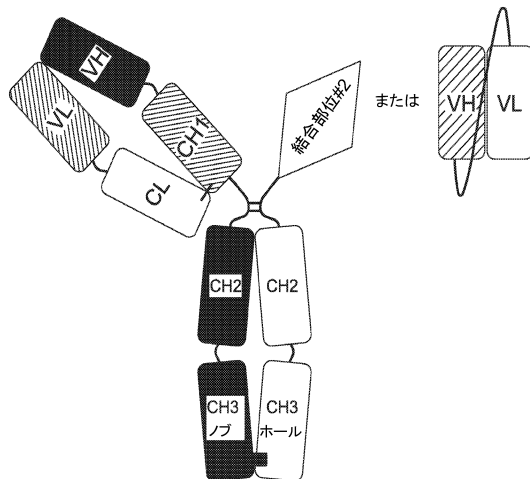
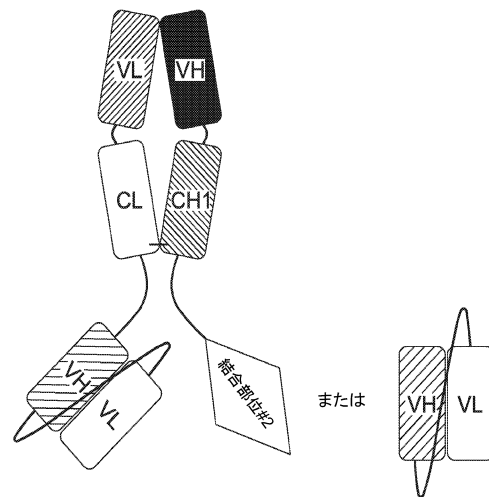


図 7

【図 8 A】

結合部位#1: Fab、例えば、腫瘍または間質標的化部分



結合部位#2: scFv、例えば、免疫細胞エンゲージャ#1

結合部位#3: サイトカイン分子、
または免疫細胞エンゲージャ#2、例えば、リガンド
または抗体分子、例えば、scFv

図 8A

【図 8 B】

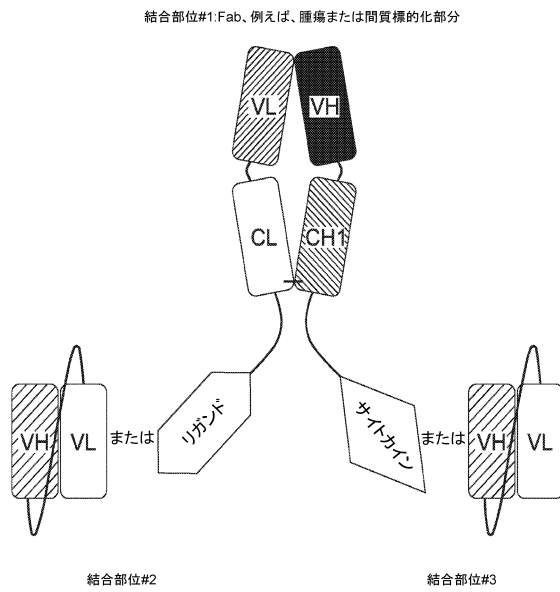


図8B

【図 8 C】

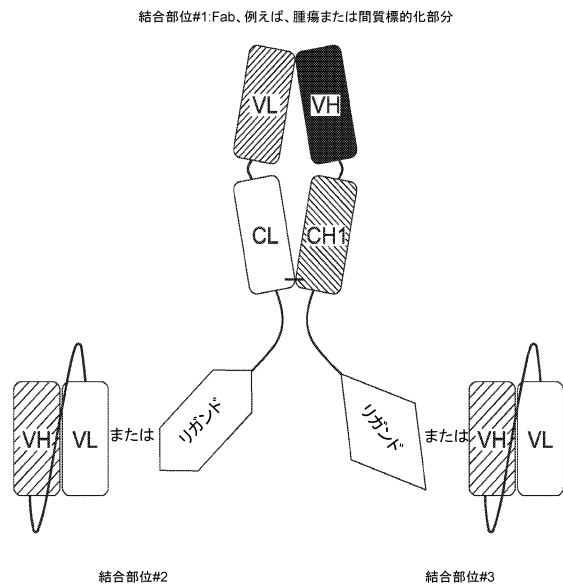


図8C

【図 9 A】

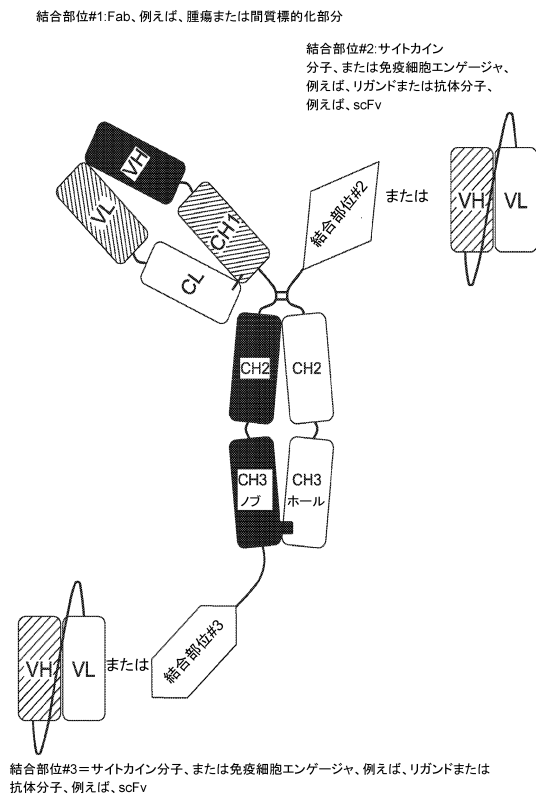


図9A

【図 9 B】

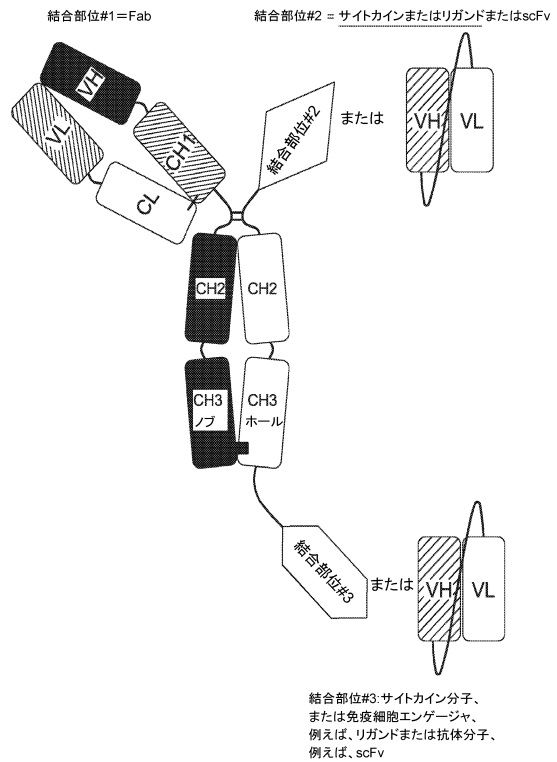


図9B

10

20

30

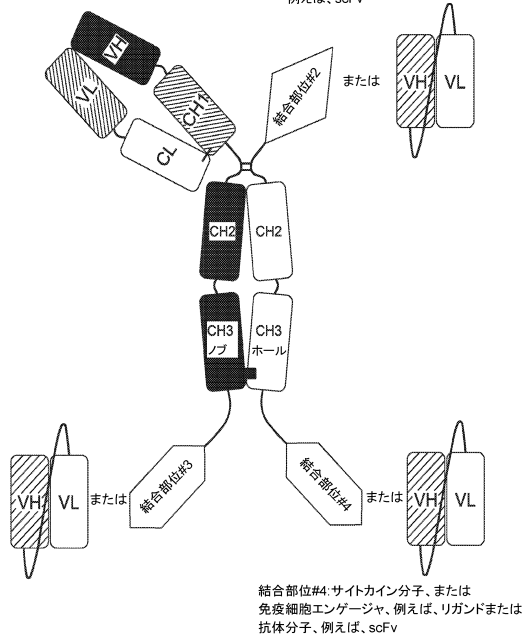
40

50

【図10A】

結合部位#1: Fab、例えば、腫瘍または間質標的の化部分

結合部位#2: サイトカイン分子、
または免疫細胞エンゲージ、例えば、
リガンドまたは抗体分子、
例えば、scFv



結合部位#3= サイトカイン分子、または免疫細胞エンゲージ、例えば、リガンド
または抗体分子、例えば、scFv

図10A

【図10B】

結合部位#1
腫瘍または
間質特異的標的

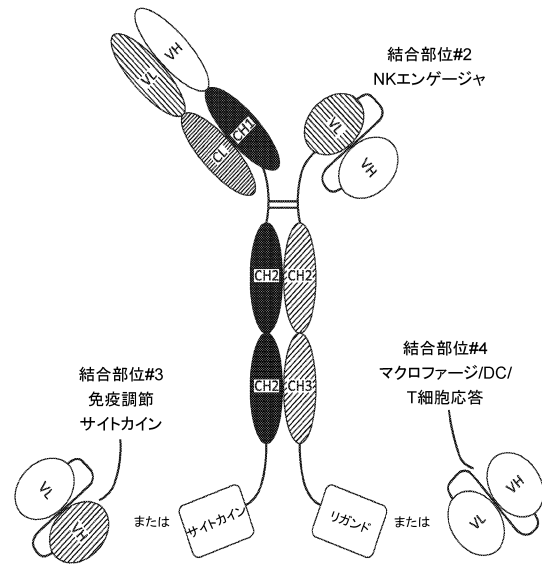


図10B

【図10C】

結合部位#1
腫瘍または
間質特異的標的

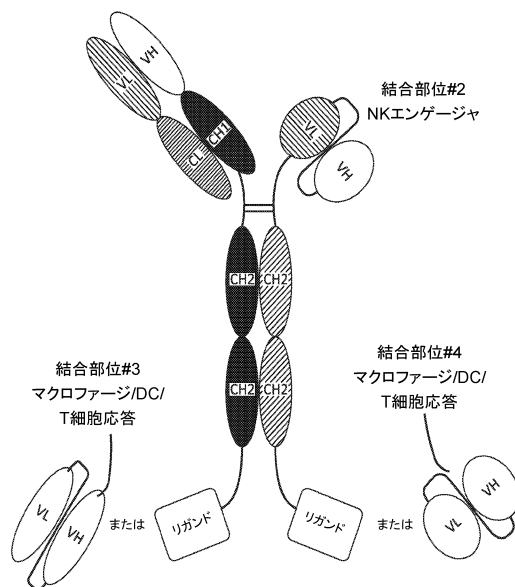
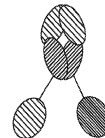


図10C

【図11A-11C】

A 三重特異的Fabベースの構築物



B >ヒト-Fab重鎖_mesoSS1_IL15

MEFGLSWVFLVALFRGVQCQVQLQQSGRELEKPGASVKISKASGYSFTGYTMNWWVKSHGKSLWIGLIT
PYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTITVTVSSASTK
GPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTYVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSLSL
GTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTGGGSGGGSGGGSGGNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDA
TLYTSDVHPSCKYATAMKCALLELQVISLESGLDASIHDTVENLILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEF
LQSFVHIVQMFINTS**

C >ヒトκ軽鎖_mesoSS1xCD40L

MKYLLPTAAAGLLLAAPAMA
DIELTQSPAIMASPGKVTMTCSASSSVSYMHVYQQSGTSPKRWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSNYSL
TISSVEAEDDATYYCQQWWSGYPLTFGAGTKLEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWIKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLST
LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
DVPSPGGGGGGSGGGSMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSLQWAEKGYYTMSNNLVLENGKQLTVK
RQGLYIYAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKCGQCSIHLGGVFLQPGASVVF
NVTDPQSVSHGTGFTSFLGLKL**

図11A-11C

10

20

30

40

50

【図 1 2 A - 1 2 D】

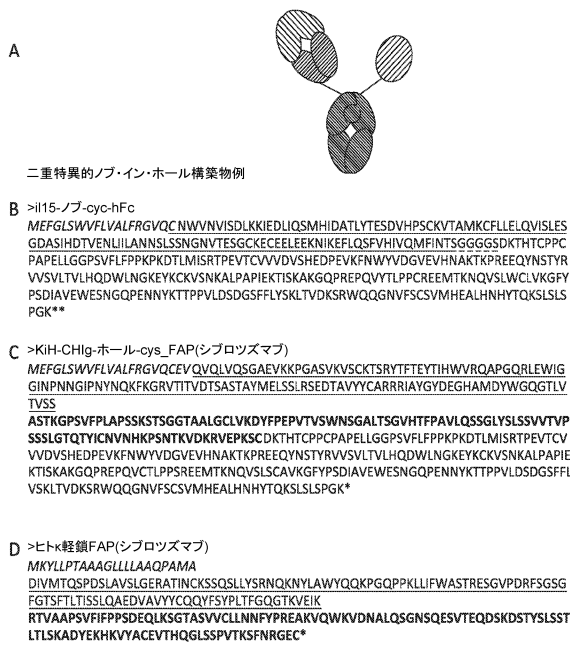


図12A-12D

【図 1 3 A - 1 3 D】

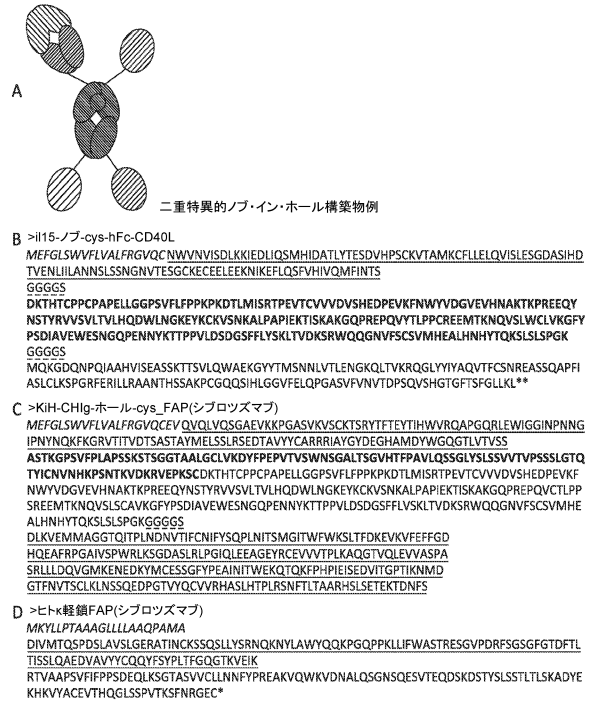
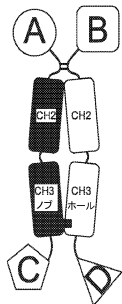


図13A-13D

【図 1 4 A】

タンパク質名: a_hMeso_SS1_Fab-hiL21hKiH_Fc_Cys-h41BBL-hCD40L

分子詳細



分子A: a_hMeso_SS1_Fab

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKSHGKSLIEWIGL
ITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDRSSSTAYMDLLSLTSDSDSAVYFCARGG
YDGRGFDYNGQGTTVTVSSDIELTQSPAIMASPGKEKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDT
SKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISVSEADATYYCQWNSGYPLTFGAG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL
SSPVTKSFNRGEC

分子B: hiL21

QSQDRHIMRMRLIDIVDQLKNYNDLVPEFLPAPEDEVETNCEWSAFSCF
QKAQLKSAANTGNERNI INVS IKKLKKKPPSTNAGRAQKRLTCPSCDSEY
KKPKPEFLERFKLLQRMHQHLSRTHGSEDS

分子B-KiH_Fcリンカー: GGGSGGGSGGGGS

KiH_Fc-分子Cリンカー: GGGSGGGSGGGSGGGGS

図14A

【図 1 4 B】

分子C: h41BBL

ACPWAYSGARASPGSAASPRLEGPESLPPDPAAGLLDLRQGMFAQLVAQN
VLLIDGPLESWSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYYVFFQLEL
RRVVAGESGSGVSLALHLQPLRSAGAAALATVDLPASSSEARNSAFGF
QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGA TVLGLFRVTPEIPAGLP
SPRSE

KiH_Fc-分子Dリンカー: GGGSGGGSGGGSGGGGS

分子D: hCD40L

HRRLDKIEDERNLHEDFVFMKTIQRNCTGERSLSLLNCEEIKSQFGEVVK
DIMLNKEETKKENSFEMQKGDQNPQIAAHVISEASSKTTSLQWAEKGY
TMSNNLVTLNKGKQLTVKRQGLYYIAQVTFCSNREASSQAPFIASLCLK
SPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPGASVFNVDPSQ
VSHGTGFTSFGLLKL

KiHノブ

KiHホール

図14B

10

20

30

40

50

【図15A-15D】

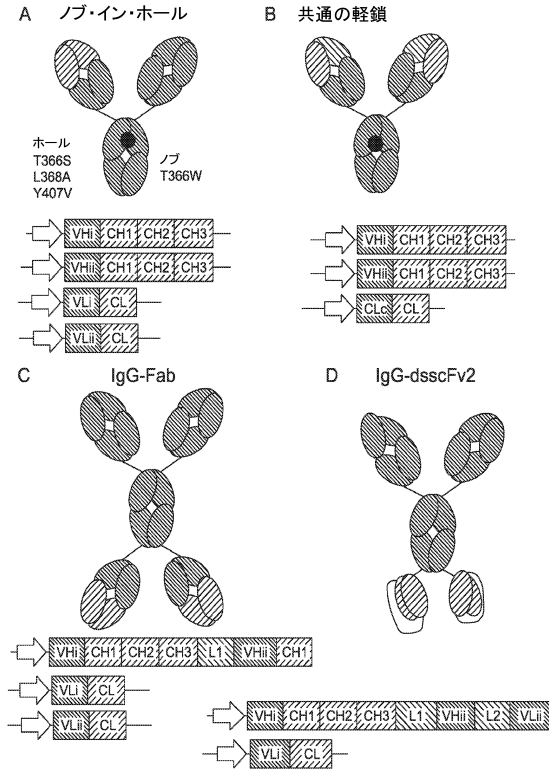


図15A-15D

【図15E-15H】

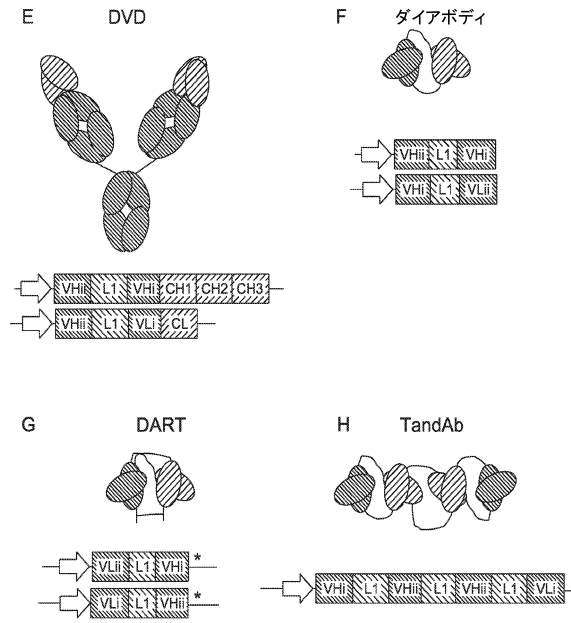


図15E-15H

【図15I-15J】

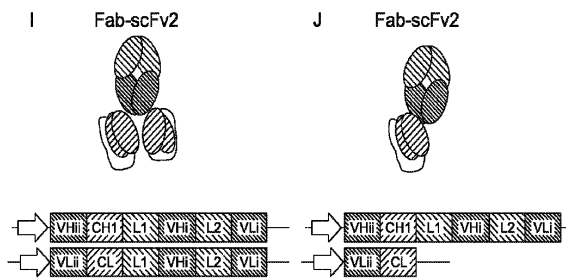
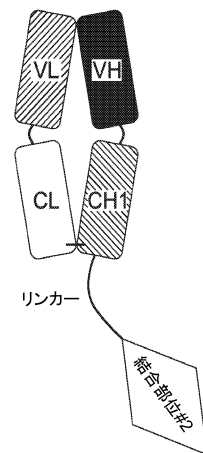


FIG. 15I-15J

【図16】

結合部位#1: Fab、例えば、腫瘍または間質標的化部分



結合部位#2: 間質調節分子

図16

10

20

30

40

50

【図 17】

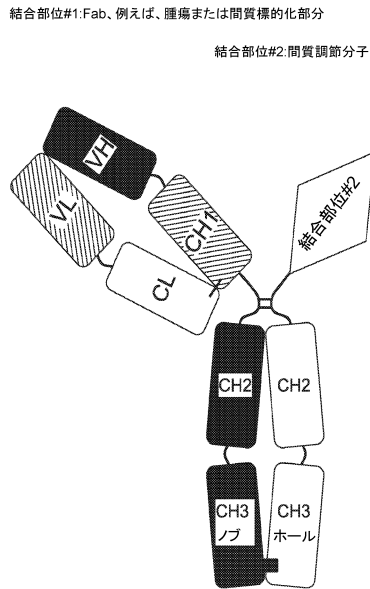


図17

【図 18】

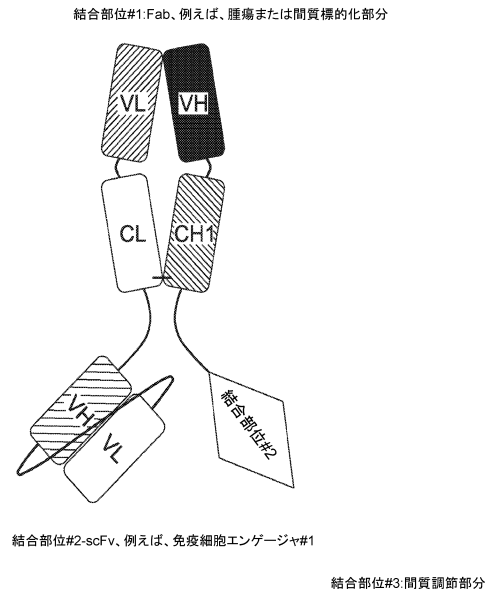


図18

【図 19 A】

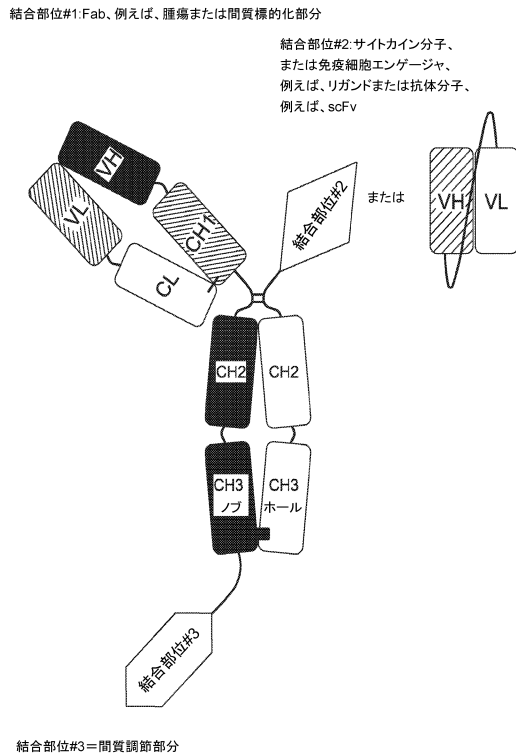


図19A

【図 19 B】

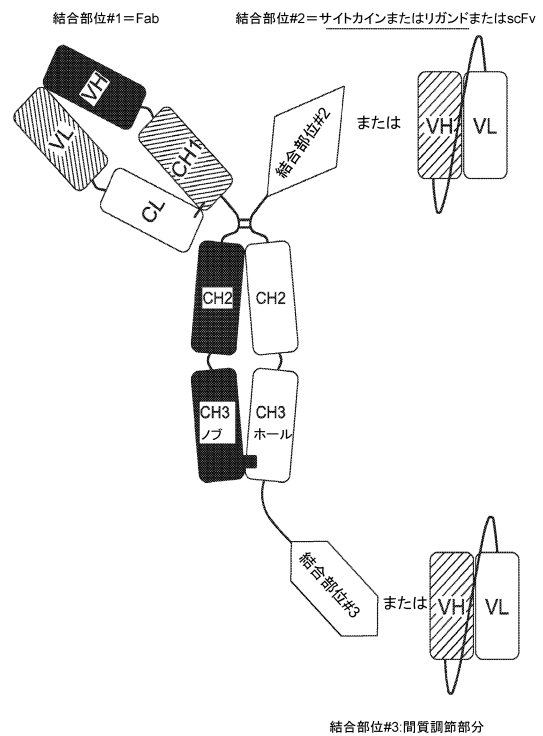


図19B

10

20

30

40

50

【図 2 0】

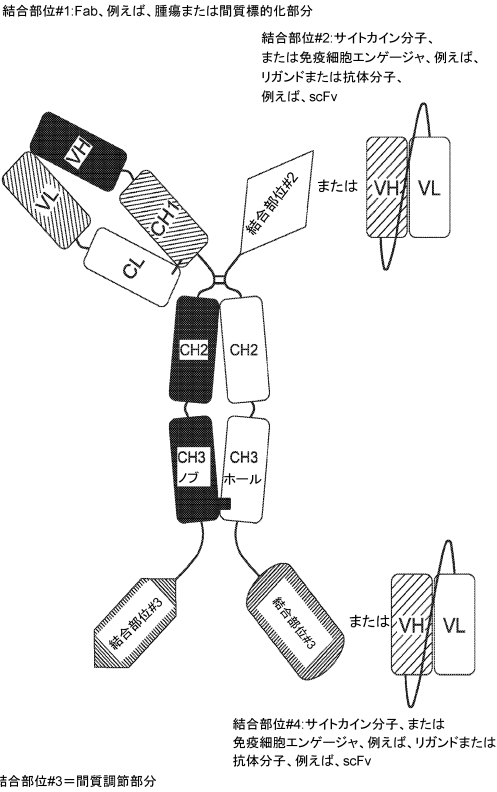


図 20

【図 2 1】

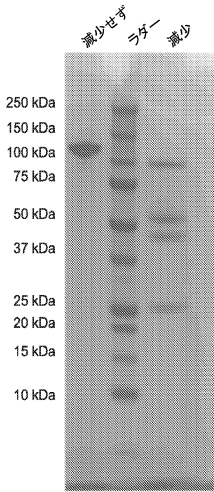


図 21

【図 2 2】

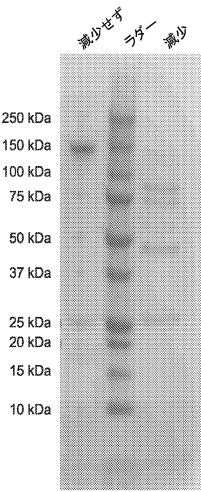


図 22

【図 2 3】

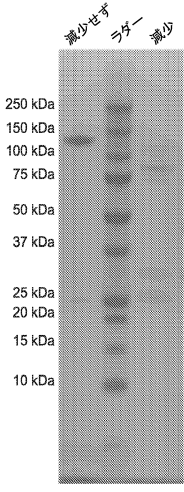


図 23

10

20

30

40

50

【図 2 4】

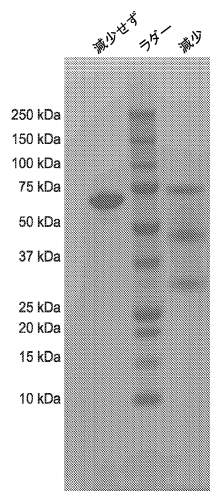


図 24

【図 2 5】

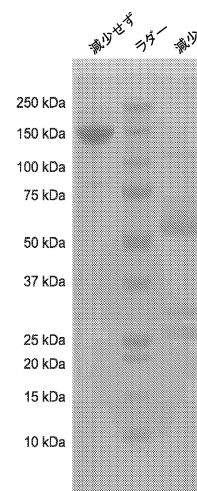


図 25

10

20

【図 2 6】

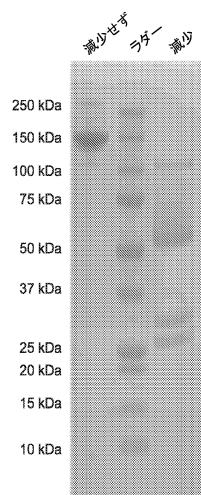


図 26

【図 2 7】

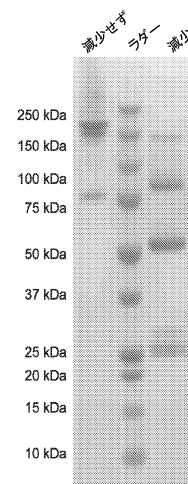


図 27

30

40

50

【図 2 8】

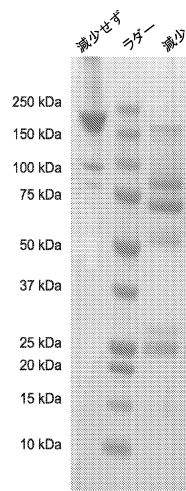


図 28

【図 2 9】

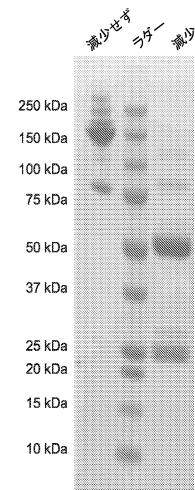


図 29

10

20

【図 3 0】

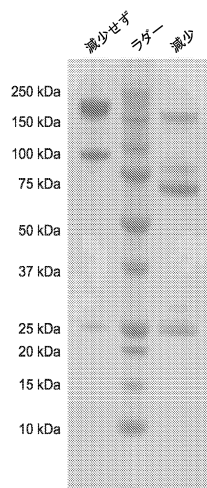


図 30

【図 3 1】

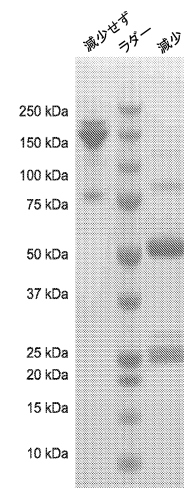


図 31

30

40

50

【図 3 2】

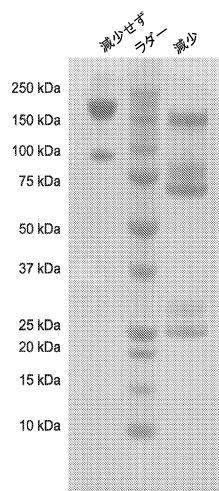


図 32

【図 3 3】

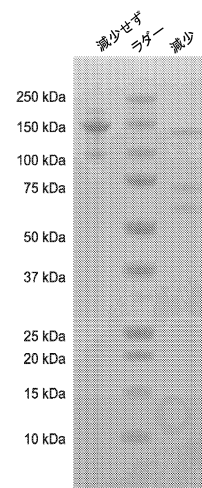


図 33

10

【図 3 4】

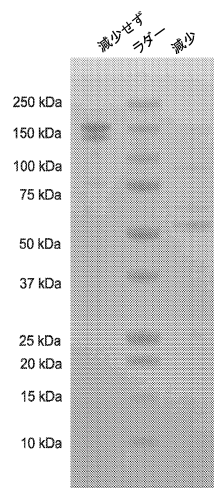


図 34

【図 3 5】

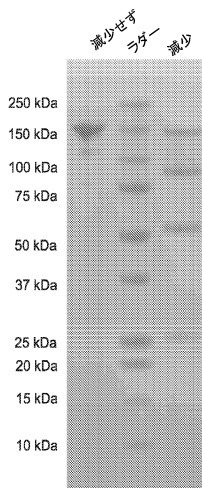


図 35

20

30

40

50

【図 3 6】

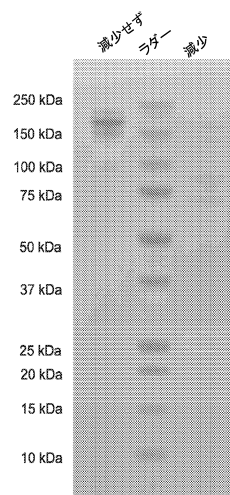


図 36

【図 3 7】

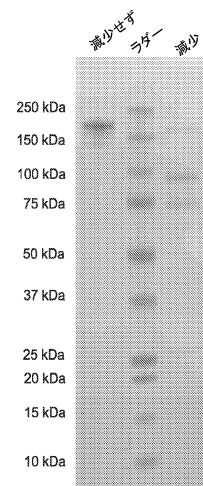


図 37

10

【図 3 8】

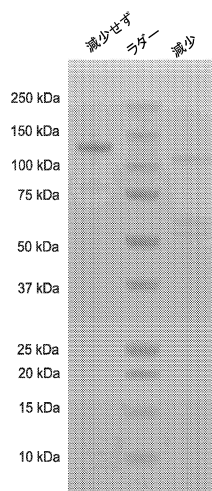


図 38

【図 3 9】

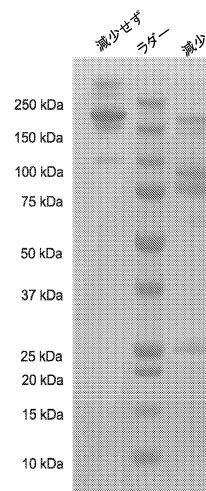


図 39

20

30

40

50

【図 4 0】

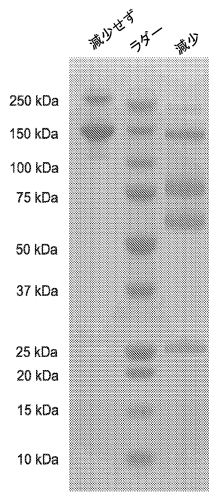


図 40

【図 4 1】

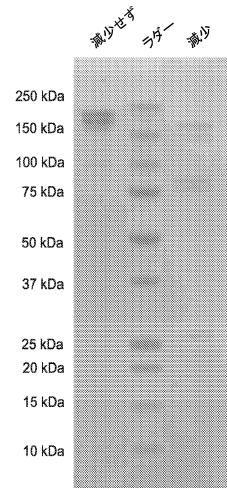


図 41

10

【図 4 2】

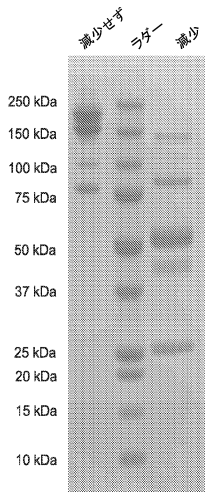


図 42

【図 4 3】

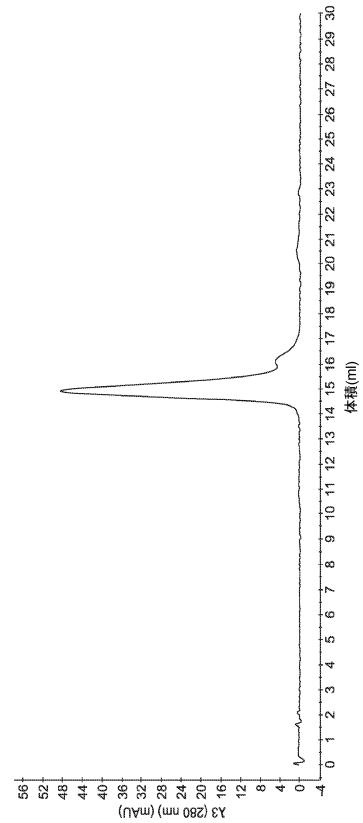


図 43

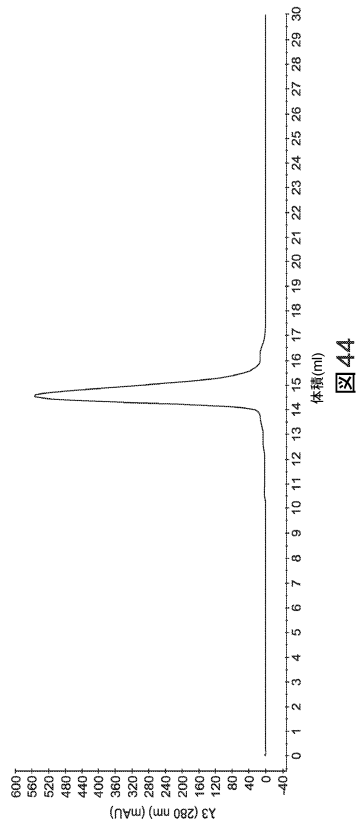
20

30

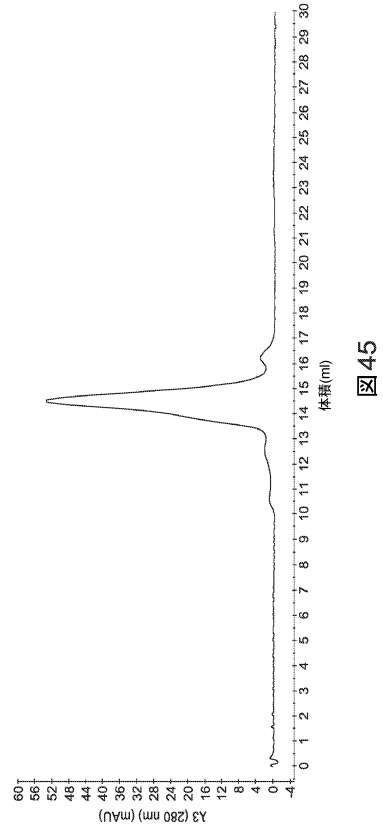
40

50

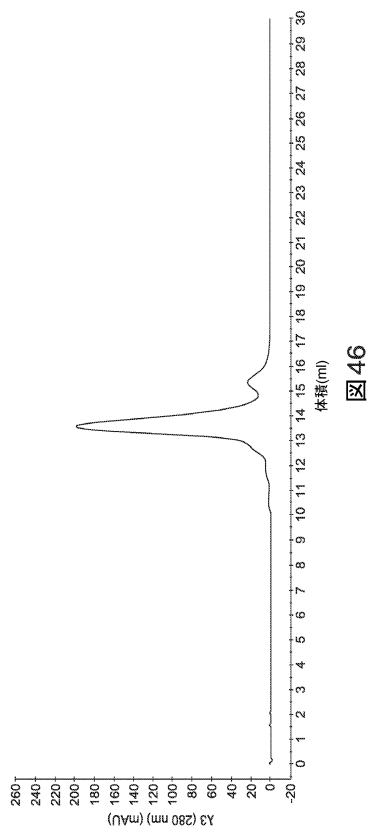
【図 4 4】



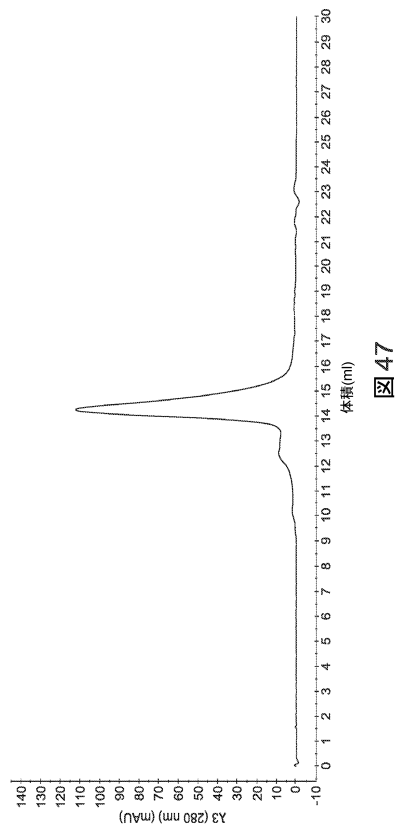
【図 4 5】



【図 4 6】



【図 4 7】



10

20

30

40

50

【図 48】

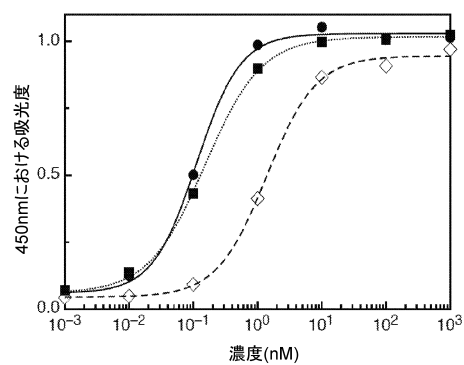


図 48

【図 49】

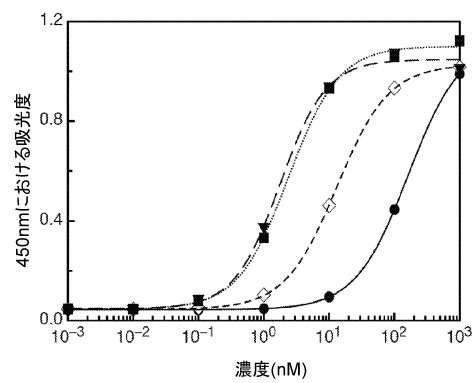


図 49

【図 50】

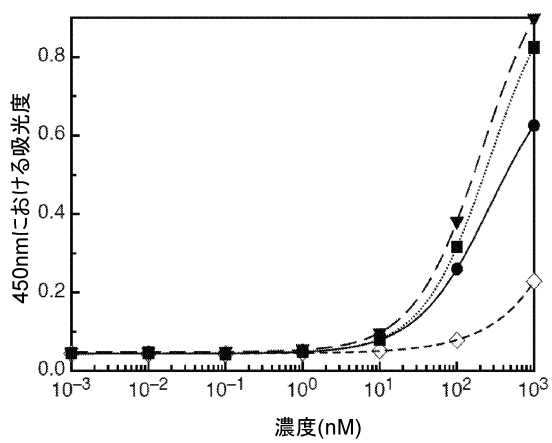


図 50

【図 51】

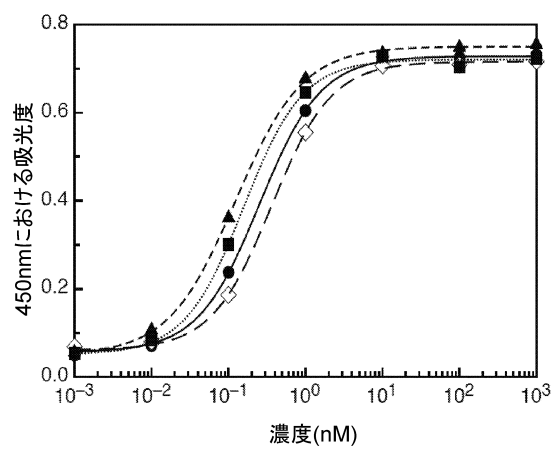


図 51

10

20

30

40

50

【図 5 2】

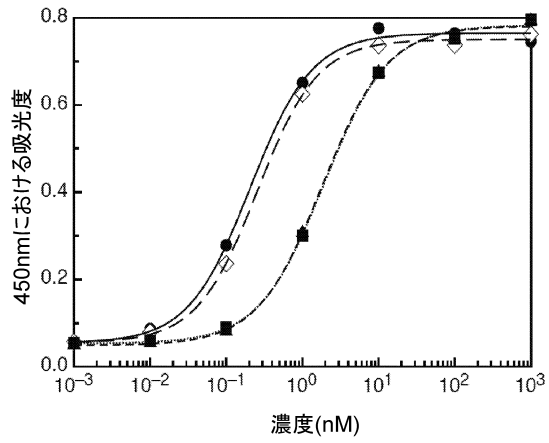


図 52

【図 5 3】

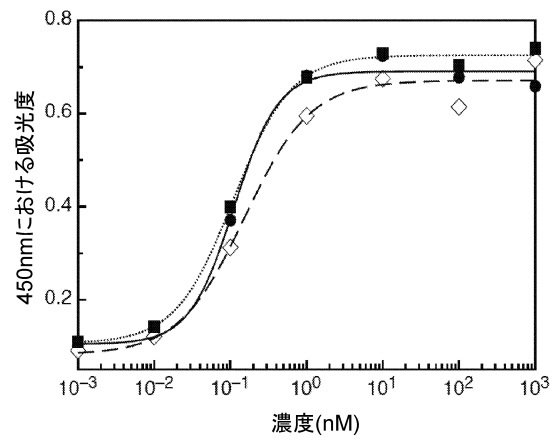


図 53

【図 5 4】

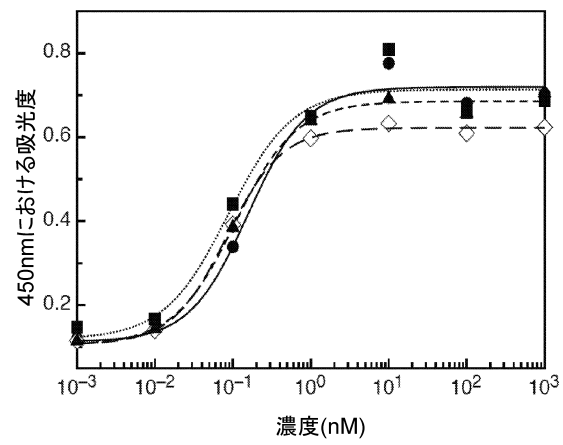


図 54

【図 5 5】

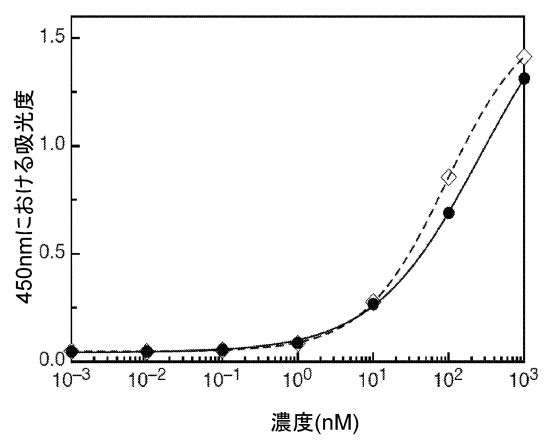


図 55

10

20

30

40

50

【図 5 6】

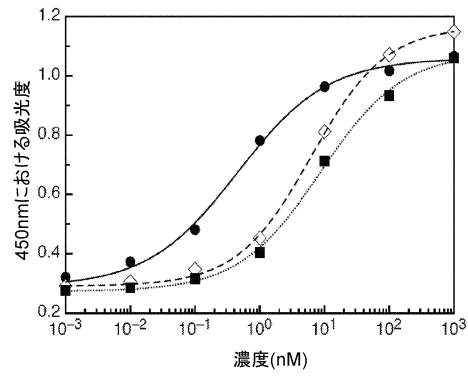


図 56

【図 5 7】

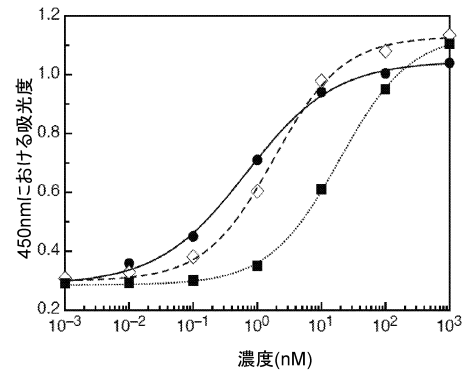


図 57

【図 5 8】

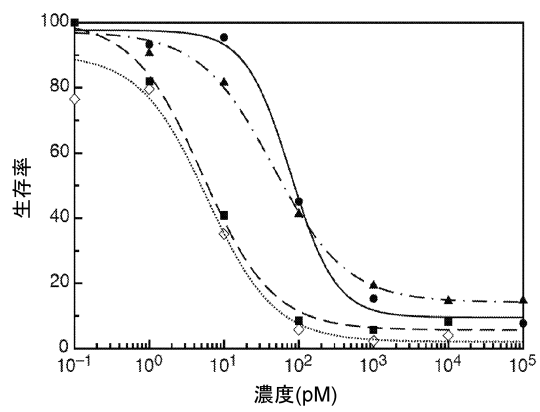


図 58

【図 5 9】

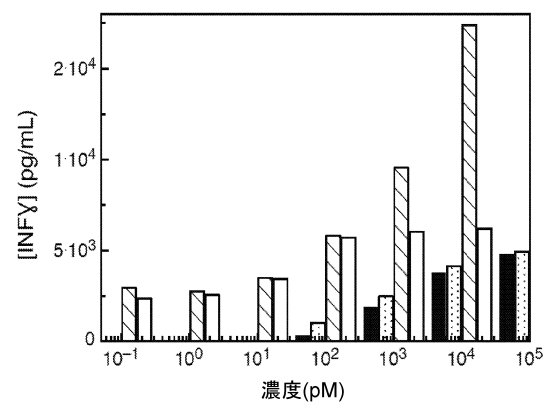


図 59

10

20

30

40

50

【図 6 0】

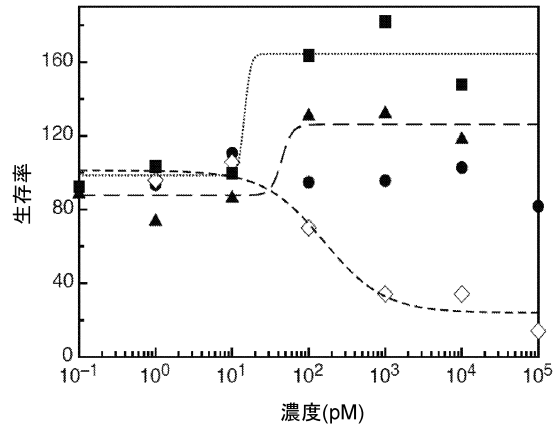


図60

【図 6 1】

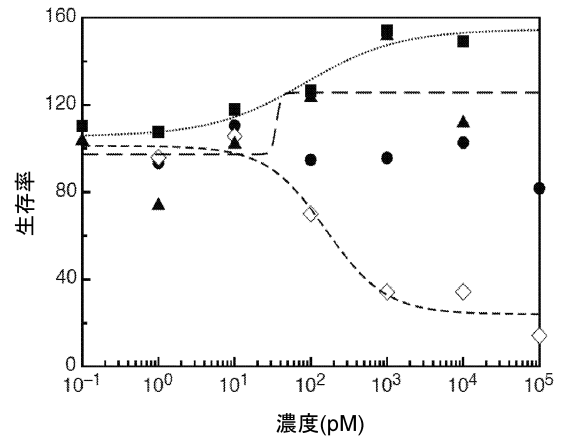


図61

【図 6 2】

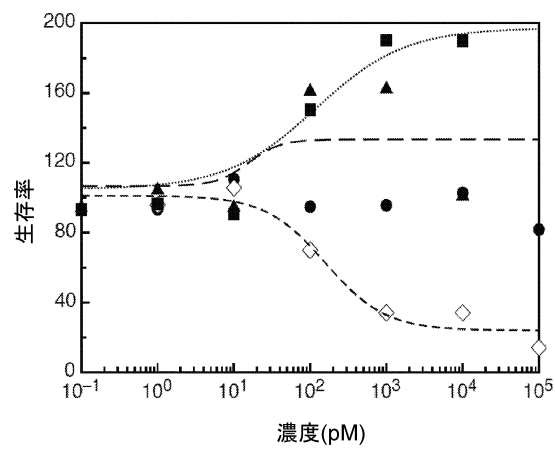


図62

【図 6 3】

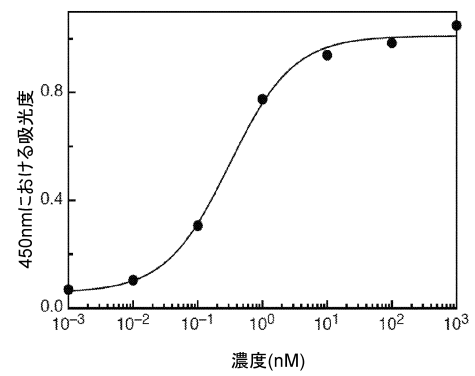


図63

10

20

30

40

50

【図 6 4】

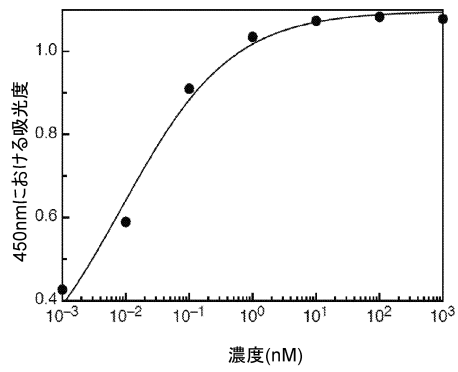


図 64

【図 6 5】

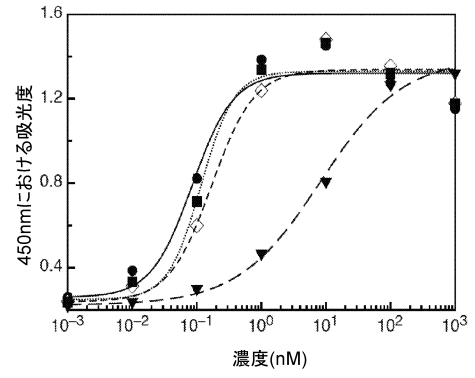


図 65

【図 6 6】

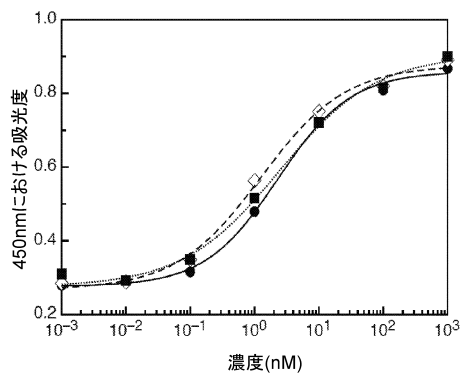


図 66

【図 6 7】

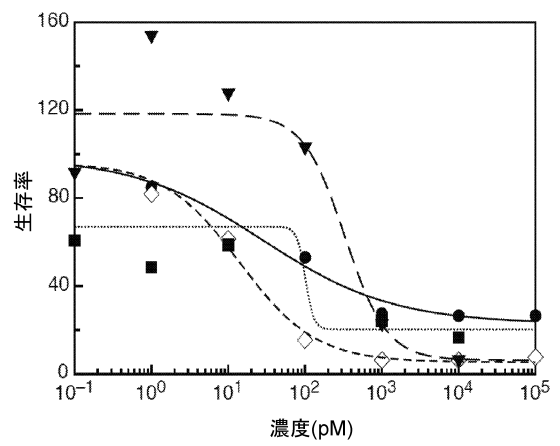


図 67

10

20

30

40

50

【図 6 8】

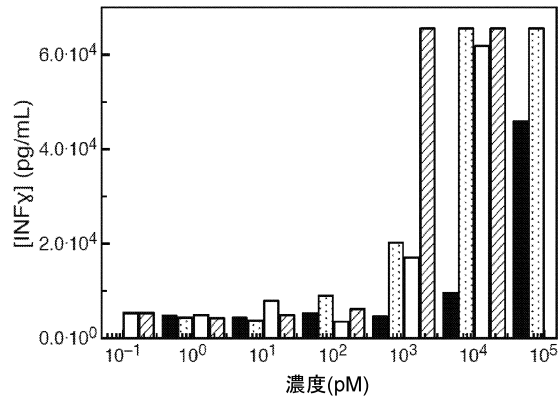


図68

【図 6 9】

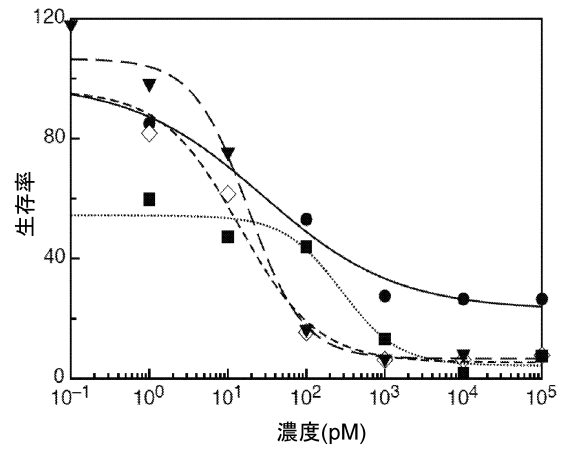


図69

【図 7 0】

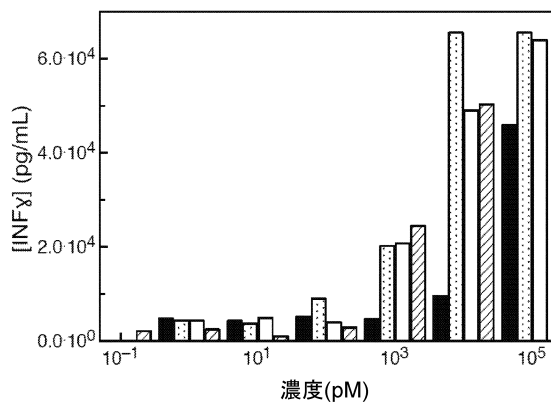


図70

【図 7 1】

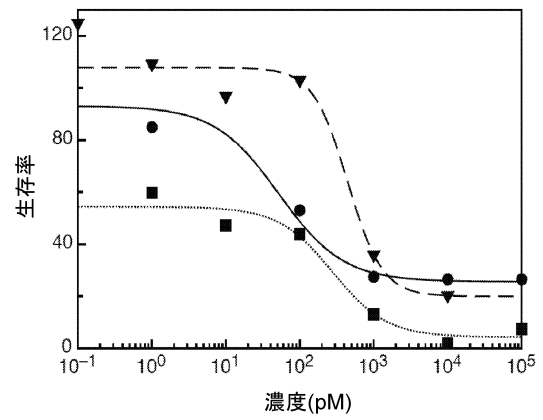


図71

【図 7 2】

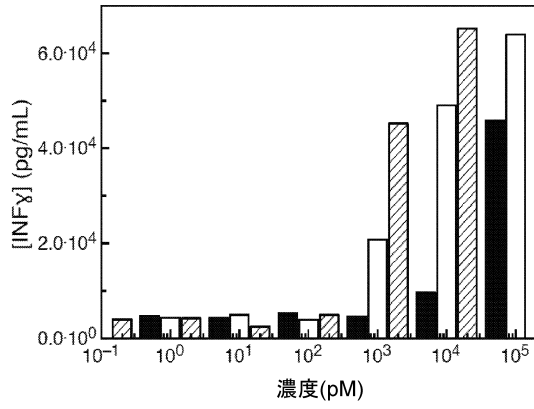


図72

【図 7 3】

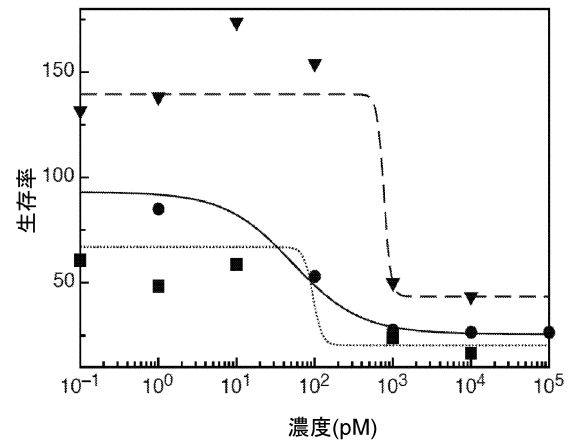


図73

【図 7 4】

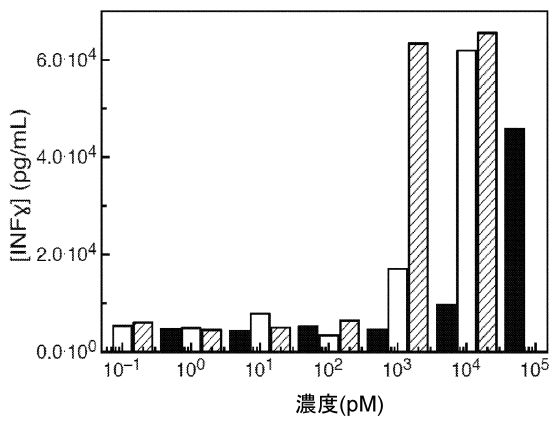


図74

【図 7 5】

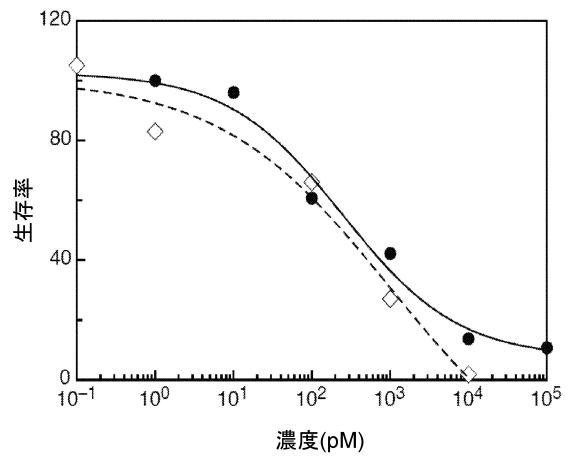


図75

10

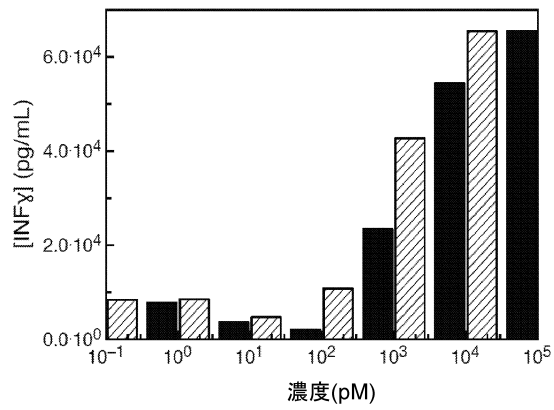
20

30

40

50

【図 7 6】



【図 7 7】

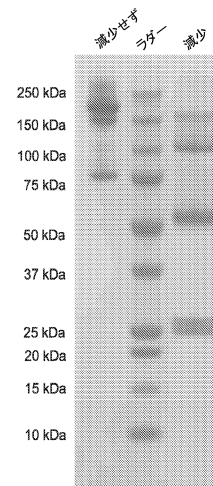


図77

10

20

図 76

【図 7 8】

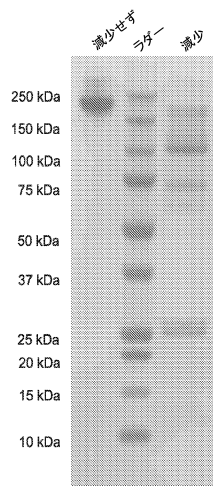


図78

【図 7 9】

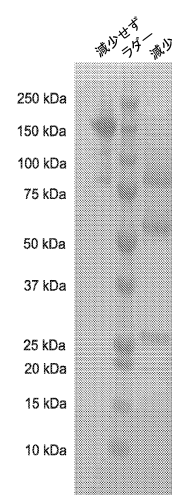


図79

30

40

50

【図 8 0】

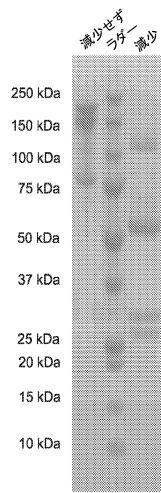


図 80

【図 8 1】

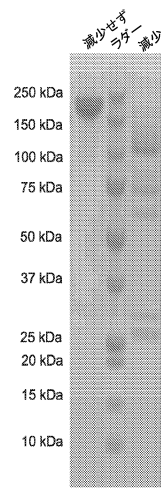


図 81

10

【図 8 2】

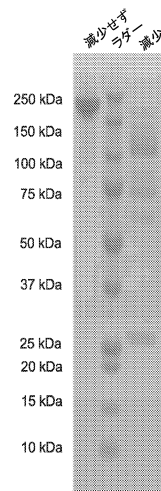


図 82

【図 8 3】

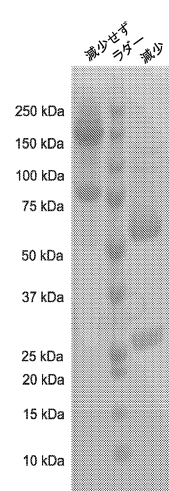


図 83

20

30

40

50

【図 8 4】

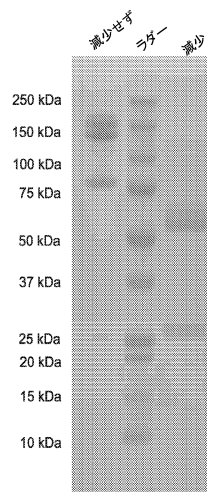


図 84

【図 8 5】

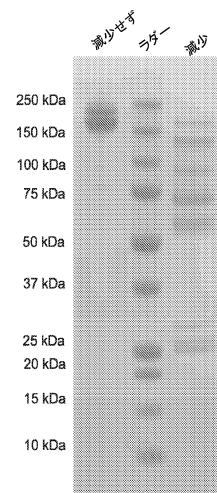


図 85

10

【図 8 6】

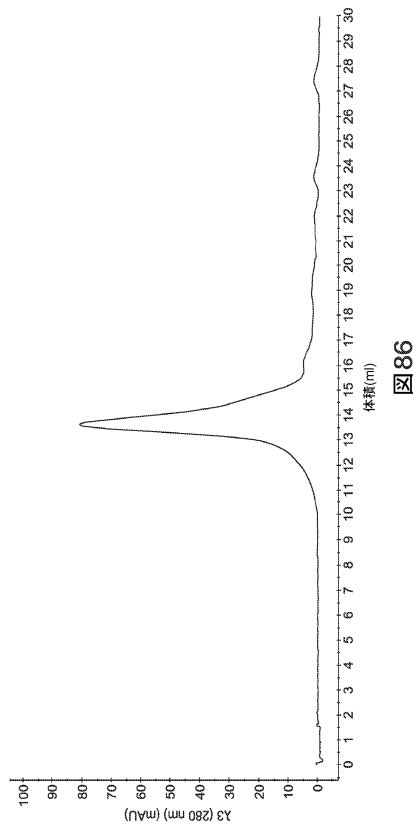


図 86

【図 8 7】

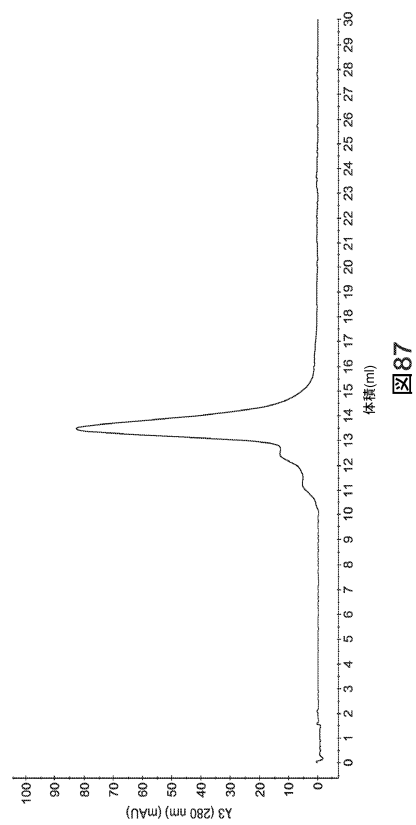


図 87

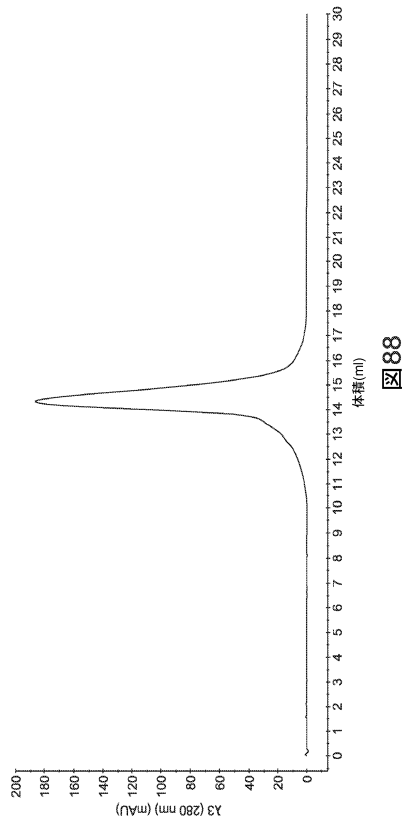
20

30

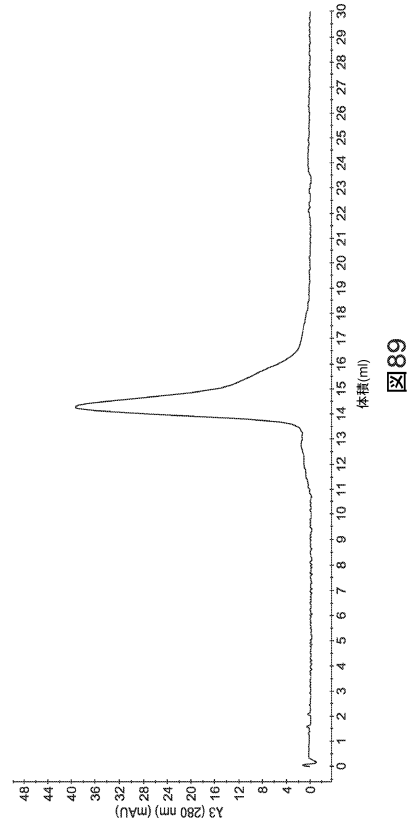
40

50

【図 8 8】



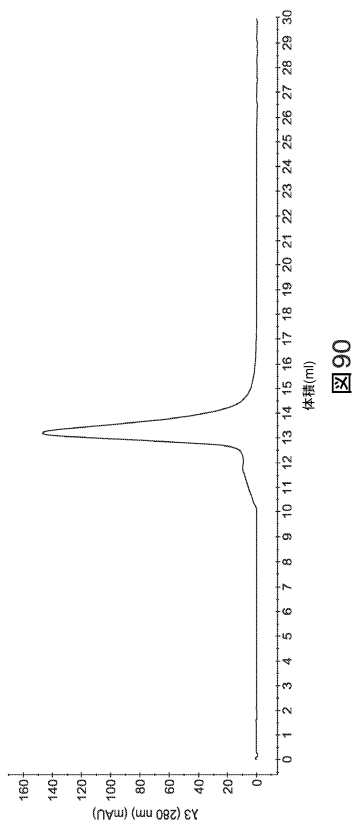
【図 8 9】



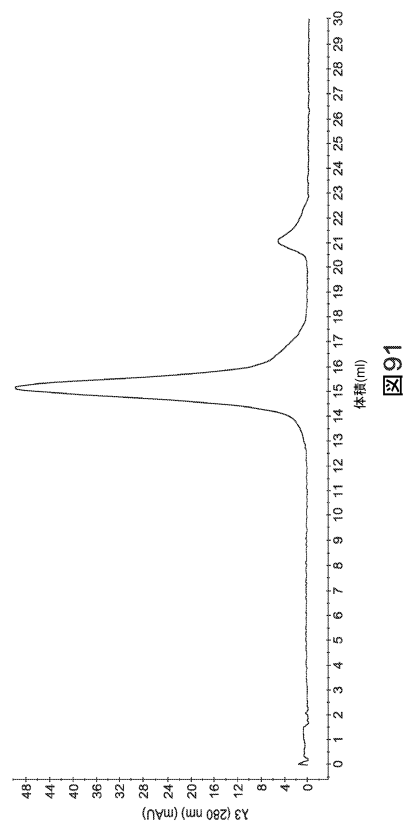
10

20

【図 9 0】



【図 9 1】

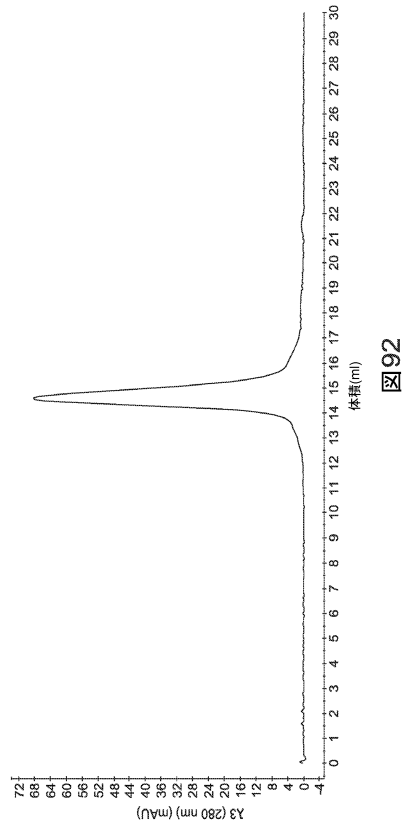


30

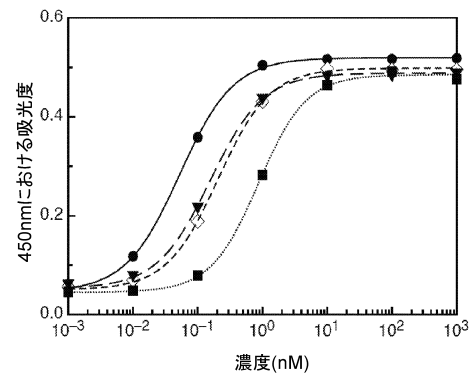
40

50

【図 9 2】



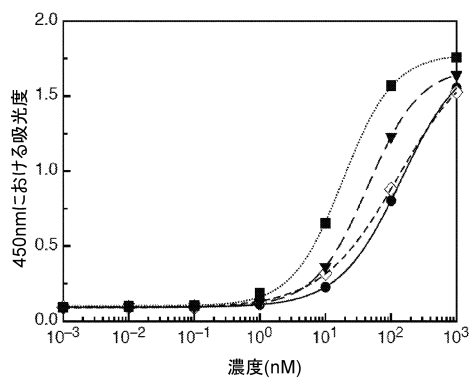
【図 9 3】



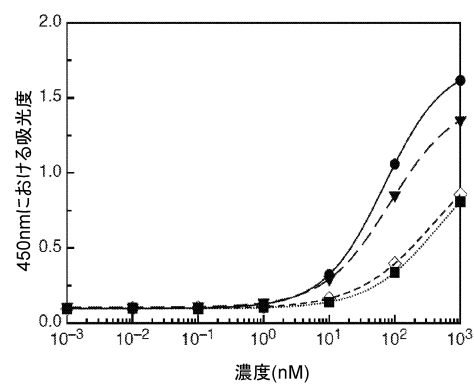
10

20

【図 9 4】



【図 9 5】

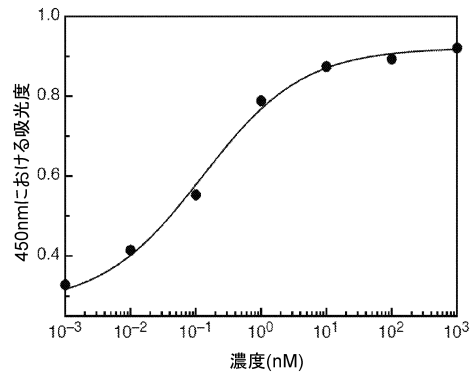


30

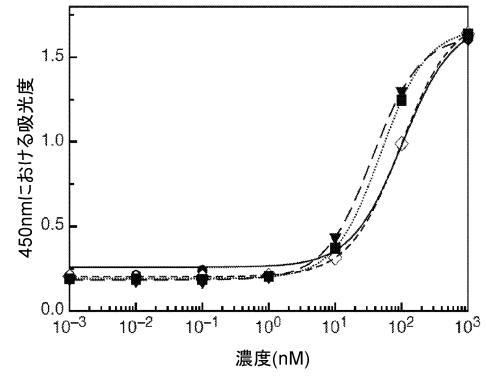
40

50

【図 9 6】



【図 9 7】



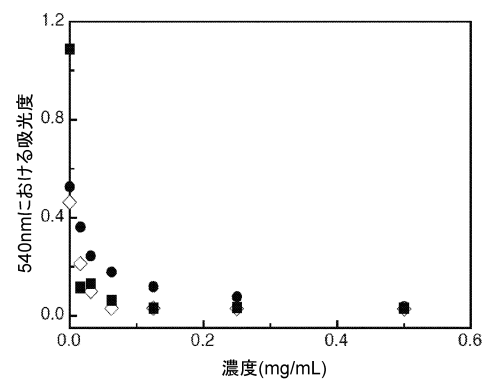
10

図 96

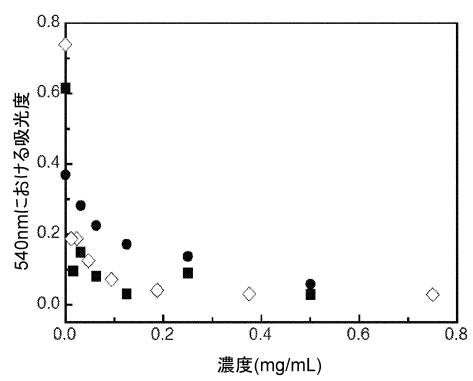
図 97

20

【図 9 8】



【図 9 9】



30

図 98

図 99

40

50

【図 1 0 0】

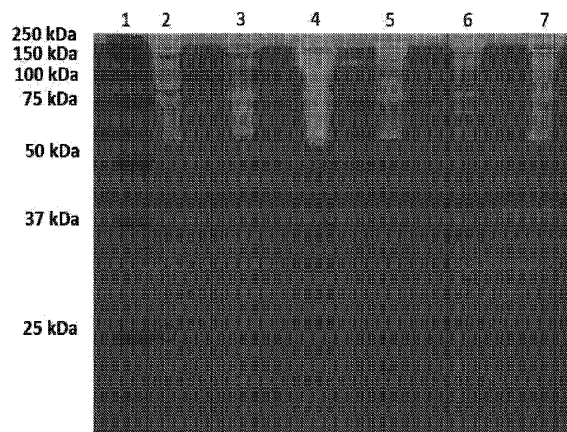


FIG. 100

【図 1 0 1】

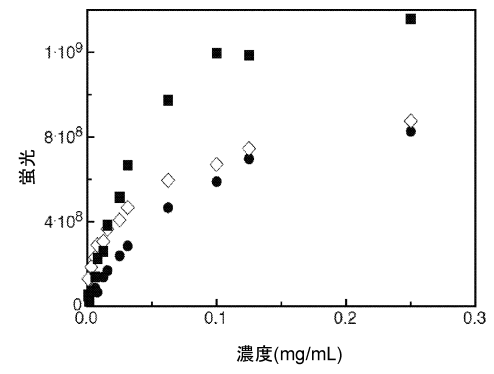


図101

【配列表】

0007082604000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	A 6 1 P	35/04	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	Z N A
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
		C 0 7 K	19/00	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 3, サマービル, ボウ ストリート 5 0, アパートメント 1 3

(72)発明者 ヴァシュ, ブライアン エドワード

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2, ケンブリッジ, 3アールディー ストリート 3 0 3 ユニット 7 1 7

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 国際公開第2 0 1 5 / 1 9 7 5 9 3 (WO, A 1)

Expert Opin Biol Ther, 2008, Vol.8, No.5, p.609-632

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N 1 5 / 6 2

A 6 1 K 3 8 / 1 9

A 6 1 K 3 8 / 2 0

A 6 1 K 3 8 / 2 1

A 6 1 K 3 8 / 4 8

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 2

A 6 1 P 3 5 / 0 4

C 0 7 K 1 6 / 2 8

C 0 7 K 1 6 / 3 0

C 0 7 K 1 6 / 4 6

C 0 7 K 1 9 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

A G R I C O L A (S T N)

B I O T E C H N O (S T N)

F S T A (S T N)

S C I S E A R C H (S T N)

T O X C E N T E R (S T N)

P u b M e d