(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-539650
(P2024-539650A)
(43)公表日　令和6年10月29日(2024.10.29)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C07K	16/28	ZNA	4B064	
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46		4B065	
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		4C085	
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4H045	
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15			

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全98頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-522466(P2024-522466)
(86)(22)出願日　令和4年10月14日(2022.10.14)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月17日(2024.5.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/078157
(87)国際公開番号　WO2023/064927
(87)国際公開日　令和5年4月20日(2023.4.20)
(31)優先権主張番号　63/256,410
(32)優先日　令和3年10月15日(2021.10.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/370,895
(32)優先日　令和4年8月9日(2022.8.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　520011599
シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サンフランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード
(71)出願人　500203709
アムジェン インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１３２０， サウザンド オークス， ワン アムジェン センター ドライブ
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡 亮一
(74)代理人　100121511
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　活性化可能なポリペプチド複合体

(57)【要約】
本開示は、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）ならびにその作製方法及び使用方法に関する。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）であって、
（ａ）（ｉ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、前記ＶＨ１及び前記ＶＬ１が一緒に、ＣＤ３ポリペプチドに特異的に結合するＴ細胞分化抗原群（ＣＤ３）標的化ドメインを形成する、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）、（ｉｉｉ）第１の切断可能な部分（ＣＭ１）、（ｉｖ）第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、ならびに（ｖ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）を含む、第１のポリペプチドと、
（ｂ）（ｉ）第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）であって、前記ＶＨ２及び前記ＶＬ２が一緒に、ＥＧＦＲに特異的に結合するＥＧＦＲ標的化ドメインを形成する、前記第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）、（ｉｉ）第２のマスキング部分（ＭＭ２）、ならびに（ｉｉｉ）第２の切断可能な部分（ＣＭ２）を含む、第２のポリペプチドと、
（ｃ）（ｉ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）を含み、（ｉｉ）免疫グロブリン可変ドメインを含まない、第３のポリペプチドと、を含む、前記活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）。
【請求項２】
前記ＣＤ３ポリペプチドが、ＣＤ３のイプシロン鎖である、請求項１に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３】
前記ＶＨ１が、
（ｉ）アミノ酸配列ＫＹＡＭＮ（配列番号３）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、
（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号４）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び
（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＩＳＹＷＡＹ（配列番号５）を含むＶＨ　ＣＤＲ３、を含み、前記ＶＬ１が、
（ｉ）アミノ酸配列ＧＳＳＴＧＡＶＴＳＧＮＹＰＮ（配列番号６）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、
（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＫＦＬＡＰ（配列番号７）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び
（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＶＬＷＹＳＮＲＷＶ（配列番号８）を含むＶＬ　ＣＤＲ３、を含む、請求項１に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項４】
前記ｓｃＦｖが、配列番号９と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を有するＶＨ１及び／または配列番号１０と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を有するＶＬ１を含む、請求項３に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項５】
前記ｓｃＦｖが、配列番号９のアミノ酸配列を有するＶＨ１及び配列番号１０のアミノ酸配列を有するＶＬ１を含む、請求項４に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項６】
前記ＶＨ２が、
（ｉ）アミノ酸配列ＮＹＧＶＨ（配列番号１５）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、
（ｉｉ）アミノ酸配列ＶＩＷＳＧＧＮＴＤＹＮＴＰＦＴＳ（配列番号１６）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び
（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＡＬＴＹＹＤＹＥＦＡＹ（配列番号１７）を含むＶＨ　ＣＤＲ３、を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項７】
前記ＶＬ２が、

（ｉ）ＲＡＳＱＳＩＧＴＮＩＨ（配列番号１８）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、
（ｉｉ）ＹＡＳＥＳＩＳ（配列番号１９）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び
（ｉｉｉ）ＱＱＮＮＮＷＰＴＴ（配列番号２０）を含むＶＬ　ＣＤＲ３、を含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項８】

前記ＶＨ２が、配列番号２１と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項６に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項９】

前記ＶＨ２が、配列番号２１のアミノ酸配列を含む、請求項６に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項１０】

前記Ｆｃ１が、配列番号２３と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１～９のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項１１】

Ｆｃ１が、配列番号２３のアミノ酸配列を含む、請求項１０に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項１２】

前記第１のポリペプチドが、前記ＶＨ２と前記Ｆｃ１との間に重鎖ＣＨ１ドメインをさらに含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項１３】

前記第１のポリペプチドが、前記ＶＨ２と前記Ｆｃ１との間に免疫グロブリンヒンジ領域をさらに含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項１４】

前記第１のポリペプチドが、アミノ末端からカルボキシ末端に、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ－ＶＨ２－ＣＨ１－ヒンジ領域－Ｆｃ１の構造配置を含み、構造中、各「－」が独立して、直接的連結または間接的連結である、請求項１～１３のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項１５】

前記第１のポリペプチドが、１つまたは複数のリンカーを含む、請求項１～１４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項１６】

前記リンカーが、約１～約２０個のアミノ酸を含む、請求項１５に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項１７】

前記ＶＬ２が、
（ｉ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＳＩＧＴＮＩＨ（配列番号１８）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、
（ｉｉ）アミノ酸配列ＹＡＳＥＳＩＳ（配列番号１９）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び
（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＱＱＮＮＮＷＰＴＴ（配列番号２０）を含むＶＬ　ＣＤＲ３、を含む、請求項１～１６のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項１８】

前記ＶＬ２が、配列番号２２と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１７に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項１９】

前記ＶＬ２が、配列番号２２のアミノ酸配列を含む、請求項１８に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項２０】

前記第２のポリペプチドが、アミノ末端からカルボキシ末端に、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ

２の構造配置を含み、構造中、各「－」が独立して、直接的連結または間接的連結である、請求項１～１９のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２１】
前記第２のポリペプチドが、１つまたは複数のリンカーを含む、請求項１～２０のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２２】
前記リンカーが、約１～約２０個のアミノ酸を含む、請求項２１に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２３】
前記Ｆｃ２が前記Ｆｃ１に結合する、請求項１～２２のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２４】
前記Ｆｃ２が、配列番号２８と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む、請求項１～２３のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２５】
前記Ｆｃ２が、配列番号２８のアミノ酸配列を含む、請求項２４に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２６】
前記第１のポリペプチド及び前記第３のポリペプチドのうちの少なくとも一方が、免疫グロブリンヒンジ領域をさらに含む、請求項１～２５のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２７】
前記第１のポリペプチド及び前記第３のポリペプチドの各々が、免疫グロブリンヒンジ領域を含む、請求項２６に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２８】
前記第１のポリペプチドの前記免疫グロブリンヒンジ領域及び前記第３のポリペプチドの前記免疫グロブリンヒンジ領域が、同じアミノ酸配列を含む、請求項２７に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２９】
前記第１のポリペプチドの前記免疫グロブリンヒンジ領域及び前記第３のポリペプチドの前記免疫グロブリンヒンジ領域が、異なるアミノ酸配列を含む、請求項２７に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３０】
前記第３のポリペプチドが、アミノ末端からカルボキシ末端に、ヒンジ領域－Ｆｃ２の構造配置で免疫グロブリンヒンジ領域を含む、請求項１～２９のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３１】
前記第１のポリペプチド、前記第２のポリペプチド、及び／または前記第３のポリペプチドが、１つまたは複数のリンカーを含む、請求項１～２９のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３２】
ＭＭ１が、リンカーＬ１を介してＣＭ１に連結されている、請求項１～３１のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３３】
ＭＭ２が、リンカーＬ２を介してＣＭ２に連結されている、請求項１～３２のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３４】
Ｌ１及びＬ２のアミノ酸配列が同じである、請求項１～３１のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３５】

Ｌ１及びＬ２のアミノ酸配列が異なる、請求項１～３１のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３６】
前記ＣＭ１及び前記ＣＭ２が各々、がんを有する対象の腫瘍微小環境に存在するプロテアーゼのための基質を含む、請求項１～３５のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３７】
前記ＣＭ１及び前記ＣＭ２が各々、同じプロテアーゼのための基質を含む、請求項１～３６のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３８】
前記ＣＭ１及び前記ＣＭ２が、異なるプロテアーゼのための基質を含む、請求項１～３６のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３９】
ＣＭ１及びＣＭ２が各々独立して、表２に示されるプロテアーゼの群から選択されるプロテアーゼのための基質を含む、請求項３２～３８のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項４０】
前記ＣＭ１及び前記ＣＭ２のうちの少なくとも一方が、セリンプロテアーゼまたはマトリックスメタロペプチダーゼ（ＭＭＰ）のための基質を含む、請求項１～３９のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項４１】
ＣＭ１が、配列番号２のアミノ酸配列を含み、及び／またはＣＭ２が、配列番号１４のアミノ酸配列を含む、請求項１～４０のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項４２】
ＣＭ１が、配列番号２のアミノ酸配列を含む、請求項４１に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項４３】
ＣＭ２が、配列番号１４のアミノ酸配列を含む、請求項４１または４２のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項４４】
ＣＭ１が、配列番号７３のアミノ酸配列を含み、及び／またはＣＭ２が、配列番号１４のアミノ酸配列を含む、請求項１～４０のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項４５】
ＣＭ１が、配列番号７３のアミノ酸配列を含む、請求項４４に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項４６】
ＣＭ２が、配列番号１４のアミノ酸配列を含む、請求項４４または４５のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項４７】
前記ＭＭ１及び／または前記ＭＭ２が、約５個のアミノ酸～約４０個のアミノ酸を含む、請求項１～４６のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項４８】
前記ＭＭ１が、配列番号１、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、または配列番号７２からなる群から選択される、請求項１～４６のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項４９】
ＭＭ２が、配列番号１３のアミノ酸配列を含む、請求項１～４８のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項５０】
ＭＭ１が、配列番号１のアミノ酸配列を含む、請求項１～４９のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項５１】
前記１つまたは複数のリンカーのうちの少なくとも１つが、
（ｉ）$(GS)_n$（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）、$(GGS)_n$（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）（例えば、約１～約２０、または約１～約１０の整数）、$(GGGS)_n$（配列番号４０）（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）（例えば、約１～約２０、または約１～約１０の整数）、（ＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号１２６）（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）（例えば、約１～約２０、または約１～約１０の整数）、（ＧＳＧＧＳ）ｎ（配列番号４１）（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）（例えば、約１～約２０、または約１～約１０の整数）、ＧＳＳＧＧＳＧＧＧＳＧ（配列番号１２）、ＧＧＳＧ（配列番号４２）、ＧＧＳＧＧ（配列番号４３）、ＧＳＧＳＧ（配列番号４４）、ＧＳＧＧＧ（配列番号４５）、ＧＧＧＳＧ（配列番号４６）、及びＧＳＳＳＧ（配列番号４７）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号４８）、ＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号４９）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５０）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５１）、ＧＧＧＧＳ（配列番号５２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５３）、ＧＧＧＳ（配列番号５４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号５５）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号５６）、ＧＳＳＧＧＳＧＧＳＧＧ（配列番号５７）、ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５８）、ＧＧＧＳＳＧＧＳ（配列番号１２７）、及びＧＳからなる群から選択される、グリシン－セリンベースのリンカー、ならびに
（ｉｉ）ＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＳＥＧＳＴ（配列番号５９）、ＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣＰＡＰＥＦＬＧ（配列番号６０）、ＧＧＳＬＤＰＫＧＧＧＧＳ（配列番号６１）、ＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ（配列番号６２）、ＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＳ（配列番号６３）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＫＧ（配列番号６４）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＳＧＳＴＫＧ（配列番号６５）、及びＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＧＥＧＳＴＫＧ（配列番号６６）からなる群から選択される、グリシンとセリン、及びリジン、トレオニン、またはプロリンのうちの少なくとも１つを含むリンカー、からなる群から選択される、請求項１５～５０のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項５２】
（１）前記第１のポリペプチドが、配列番号３０のアミノ酸配列を含み、（２）前記第２のポリペプチドが、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、（３）前記第３のポリペプチドが、配列番号３２のアミノ酸配列を含む、請求項１～５１のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項５３】
（１）前記第１のポリペプチドが、配列番号１２０のアミノ酸配列を含み、（２）前記第２のポリペプチドが、配列番号３７のアミノ酸配列を含み、（３）前記第３のポリペプチドが、配列番号３２のアミノ酸配列を含む、請求項１～５１のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項５４】
（１）前記第１のポリペプチドが、配列番号１４４のアミノ酸配列を含み、（２）前記第２のポリペプチドが、配列番号３７のアミノ酸配列を含み、（３）前記第３のポリペプチドが、配列番号３２のアミノ酸配列を含む、請求項１～５１のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項５５】
請求項１～５４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。
【請求項５６】
請求項５５に記載の薬学的組成物を含むキット。

【請求項５７】
請求項１～５４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチドの前記第１のポリペプチド、前記第２のポリペプチド、及び前記第３のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸。
【請求項５８】
請求項５７に記載の核酸を含むベクター。
【請求項５９】
請求項５８に記載のベクターを含む宿主細胞。
【請求項６０】
活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）を生産する方法であって、
（ａ）請求項５９に記載の宿主細胞を液体培地中、前記ＨＢＰＣを生産するのに十分な条件下で培養することと、
（ｂ）前記ＨＢＰＣを回収することと、を含む、前記方法。
【請求項６１】
対象における疾患を処置する方法であって、治療上有効量の請求項１～５４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体または請求項５５に記載の薬学的組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。
【請求項６２】
前記対象が、ヒトである、請求項６１に記載の方法。
【請求項６３】
前記疾患が、がんである、請求項６１または６２に記載の方法。
【請求項６４】
腫瘍増殖の阻害を必要とする対象において前記腫瘍増殖を阻害する際に使用するための、請求項１～５４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチドまたは請求項５５に記載の薬学的組成物。
【請求項６５】
がんを処置するための医薬の製造における、請求項１～５４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体または請求項５５に記載の薬学的組成物の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本願は、２０２１年１０月１５日に出願された米国仮出願第６３／２５６，４１０号、及び２０２２年８月９日に出願された同第６３／３７０，８９５号の優先権の利益を主張するものであり、同文献は参照によりそれらの全体が本明細書に援用される。
【０００２】
ＥＦＳ　ＷＥＢを介して電子的に提出された配列表への参照
本願で提出された、電子的に提出された配列表（４６８１＿００１ＰＣ０２＿Ｓｅｑｌｉｓｔｉｎｇ＿ＳＴ２６．ｘｍｌ、サイズ：１７９，４４４バイト、及び作成日：２０２２年１０月１３日）の内容は、参照によりその全体が本明細書に援用される。
【０００３】
本開示は、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）ならびにその作製方法及び使用方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の発生及び活性化は、発達及び抗腫瘍活性の免疫介在性制御に関与する。これには、複数のＴ細胞共刺激受容体及びＴ細胞の負のレギュレーター、すなわち共抑制受容体が共同して作用して、Ｔ細胞の活性化、増殖、及びエフェクター機能の獲

得または喪失を制御することが必要とされる。腫瘍特異的Ｔ細胞の応答は、腫瘍細胞の免疫回避機構に起因して、がん患者において発動及び維持することが困難である。しかしながら、がん療法にＴ細胞を利用する試みがなされている。かかるアプローチは、がん細胞上の表面標的抗原及びＴ細胞上のＣＤ３等のＴ細胞表面抗原の両方に結合する、Ｔ細胞誘導二重特異性抗体を使用することを含む。一般に、各標的に結合することによって、Ｔ細胞誘導二重特異性物質は、Ｔ細胞をがん細胞に物理的に近接して保ち、Ｔ細胞タンパク質及び酵素が腫瘍細胞を攻撃してアポトーシスを引き起こすことを可能にし、それによってがん細胞を殺傷する。

【０００５】

内因性のチロシンキナーゼ活性を示す受容体・膜貫通型糖タンパク質である、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）は、細胞増殖、分化、細胞生存、アポトーシス、血管新生、有糸分裂、及び転移を制御するシグナル伝達経路の活性化を含むがこれらに限定されない、多数の細胞プロセスを調節する（Ａｔａｌａｙ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ １４：１３４６－１３６３（２００３）、Ｔｓａｏ ａｎｄ Ｈｅｒｂｓｔ，Ｓｉｇｎａｌ ４：４－９（２００３）、Ｈｅｒｂｓｔ ａｎｄ Ｓｈｉｎ，Ｃａｎｃｅｒ ９４：１５９３－１６１１（２００２）、Ｍｏｄｊｔａｈｅｄｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ７３：２２８－２３５（１９９６））。ＥＧＦＲの過剰発現は、膀胱、脳、頭頸部、膵臓、肺、乳房、卵巣、結腸、前立腺、及び腎臓の癌を含めた、多数のヒトがんに関連する。ＥＧＦＲは、悪性細胞に発現するよりも低いレベルで正常組織の細胞にも発現する。

【０００６】

ＥＧＦＲ及びＣＤ３に結合する二重特異性抗体は、Ｔ細胞媒介性毒性（すなわち、サイトカイン放出）及び腫瘍外（ｏｆｆ－ｔｕｍｏｒ）結合に起因するＥＧＦＲ関連毒性を含めた欠点に悩まされる。さらに、二重特異性抗体の複雑な構造ならびに製造及びスケールアップ中の凝集レベルの高さに起因して、製造上の課題が生じる。したがって、改善された安全性プロファイルと同時に、改善された製造性を有する免疫療法の選択肢に対する必要性が存在する。

【発明の概要】

【０００７】

本開示は、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）を提供し、該活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）は、（ａ）（ｉ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、該ＶＨ１及び該ＶＬ１が一緒に、ＣＤ３ポリペプチドに特異的に結合するＴ細胞分化抗原群（ＣＤ３）標的化ドメインを形成する、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）、（ｉｉｉ）第１の切断可能な部分（ＣＭ１）、（ｉｖ）第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、ならびに（ｖ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）を含む、第１のポリペプチドと、（ｂ）（ｉ）第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）であって、該ＶＨ２及び該ＶＬ２が一緒に、ＥＧＦＲに特異的に結合するＥＧＦＲ標的化ドメインを形成する、該第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）、（ｉｉ）第２のマスキング部分（ＭＭ２）、ならびに（ｉｉｉ）第２の切断可能な部分（ＣＭ２）を含む、第２のポリペプチドと、（ｃ）（ｉ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）を含み、（ｉｉ）免疫グロブリン可変ドメインを含まない、第３のポリペプチドと、を含む。一部の態様では、ＣＤ３ポリペプチドは、ＣＤ３のイプシロン鎖である。

【０００８】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、ＶＨ１は、（ｉ）アミノ酸配列ＫＹＡＭＮ（配列番号３）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号４）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＩＳＹＷＡＹ（配列番号５）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含み、ＶＬ１は、（ｉ）アミノ酸配列Ｇ

ＳＳＴＧＡＶＴＳＧＮＹＰＮ（配列番号６）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＫＦＬＡＰ（配列番号７）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＶＬＷＹＳＮＲＷＶ（配列番号８）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む。

【０００９】

一部の態様では、ｓｃＦｖは、配列番号９と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を有するＶＨ１及び／または配列番号１０と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を有するＶＬ１を含む。一部の態様では、ｓｃＦｖは、配列番号９のアミノ酸配列を有するＶＨ１及び配列番号１０のアミノ酸配列を有するＶＬ１を含む。

【００１０】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、ＶＨ２は、（ｉ）アミノ酸配列ＮＹＧＶＨ（配列番号１５）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＶＩＷＳＧＧＮＴＤＹＮＴＰＦＴＳ（配列番号１６）を含むＶＨＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＡＬＴＹＹＤＹＥＦＡＹ（配列番号１７）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む。一部の態様では、ＶＨ２は、配列番号２１と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ＶＨ２は、配列番号２１のアミノ酸配列を含む。

【００１１】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、Ｆｃ１は、配列番号２３と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の態様では、Ｆｃ１は、配列番号２３のアミノ酸配列を含む。

【００１２】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、第１のポリペプチドは、ＶＨ２とＦｃ１との間に重鎖ＣＨ１ドメインをさらに含む。一部の態様では、第１のポリペプチドは、ＶＨ２とＦｃ１との間に免疫グロブリンヒンジ領域をさらに含む。一部の態様では、第１のポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシ末端に、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ－ＶＨ２－ＣＨ１－ヒンジ領域－Ｆｃ１の構造配置を含み、構造中、各「－」は独立して、直接的連結または間接的連結である。

【００１３】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、第１のポリペプチドは、１つまたは複数のリンカーを含む。一部の態様では、リンカーは、約１～約２０個のアミノ酸を含む。

【００１４】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、ＶＬ２は、（ｉ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＳＩＧＴＮＩＨ（配列番号１８）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＹＡＳＥＳＩＳ（配列番号１９）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＱＱＮＮＮＷＰＴＴ（配列番号２０）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む。一部の態様では、ＶＬ２は、配列番号２２と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ＶＬ２は、配列番号２２のアミノ酸配列を含む。

【００１５】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、第２のポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシ末端に、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２の構造配置を含み、構造中、各「－」は独立して、直接的連結または間接的連結である。一部の態様では、第２のポリペプチドは、１つまたは複数のリンカーを含む。一部の態様では、リンカーは、約１～約２０個のアミノ酸を含む。

【００１６】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、Ｆｃ２は、Ｆｃ１に結合する。一部の態様では、Ｆｃ２は、配列番号２８と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の態様では、Ｆｃ

２は、配列番号２８のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、Ｆｃ２は、配列番号２９のアミノ酸配列を含む。

【００１７】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、第１のポリペプチド及び第３のポリペプチドのうちの少なくとも一方は、免疫グロブリンヒンジ領域をさらに含む。一部の態様では、第１のポリペプチド及び第３のポリペプチドは、免疫グロブリンヒンジ領域を含む。一部の態様では、第１のポリペプチドの免疫グロブリンヒンジ領域及び第３のポリペプチドの免疫グロブリンヒンジ領域は、同じアミノ酸配列を含む。一部の態様では、第１のポリペプチドの免疫グロブリンヒンジ領域及び第３のポリペプチドの免疫グロブリンヒンジ領域は、異なるアミノ酸配列を含む。

【００１８】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、第３のポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシ末端に、ヒンジ領域－Ｆｃ２の構造配置で免疫グロブリンヒンジ領域を含む。

【００１９】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び／または第３のポリペプチドは、１つまたは複数のリンカーを含む。一部の態様では、ＭＭ１は、リンカーＬ１を介してＣＭ１に連結されている。一部の態様では、ＭＭ２は、リンカーＬ２を介してＣＭ２に連結されている。一部の態様では、Ｌ１及びＬ２のアミノ酸配列は同じである。一部の態様では、Ｌ１及びＬ２のアミノ酸配列は異なる。

【００２０】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、ＣＭ１及びＣＭ２は各々、がんを有する対象の腫瘍微小環境に存在するプロテアーゼのための基質を含む。一部の態様では、ＣＭ１及びＣＭ２は各々、同じプロテアーゼのための基質を含む。一部の態様では、ＣＭ１及びＣＭ２は、異なるプロテアーゼのための基質を含む。一部の態様では、ＣＭ１及びＣＭ２は各々独立して、表２に示されるプロテアーゼの群から選択されるプロテアーゼのための基質を含む。一部の態様では、ＣＭ１及びＣＭ２のうちの少なくとも一方は、セリンプロテアーゼまたはマトリックスメタロペプチダーゼ（ＭＭＰ）のための基質を含む。一部の態様では、ＣＭ１は、配列番号２のアミノ酸配列を含み、及び／またはＣＭ２は、配列番号１４のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ＣＭ１は、配列番号２のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ＣＭ２は、配列番号１４のアミノ酸配列を含む。

【００２１】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、ＭＭ１及び／またはＭＭ２は、約５個のアミノ酸～約４０個のアミノ酸を含む。一部の態様では、ＭＭ１は、配列番号１、配列番号６７、配列番号６８、配列番号６９、配列番号７０、配列番号７１、または配列番号７２からなる群から選択される。一部の態様では、ＭＭ２は、配列番号１３のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ここで、ＭＭ１は、配列番号１のアミノ酸配列を含む。

【００２２】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、１つまたは複数のリンカーのうちの少なくとも１つは、（ｉ）（ＧＳ）ｎ（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）、（ＧＧＳ）ｎ（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）（例えば、約１～約２０、または約１～約１０の整数）、（ＧＧＧＳ）ｎ（配列番号４０）（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）（例えば、約１～約２０、または約１～約１０の整数）、（ＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号１２６）（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）（例えば、約１～約２０、または約１～約１０の整数）、（ＧＳＧＧＳ）ｎ（配列番号４１）（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）（

例えば、約１～約２０、または約１～約１０の整数）、ＧＳＳＧＧＳＧＧＳＧ（配列番号１２）、ＧＧＳＧ（配列番号４２）、ＧＧＳＧＧ（配列番号４３）、ＧＳＧＳＧ（配列番号４４）、ＧＳＧＧＧ（配列番号４５）、ＧＧＧＳＧ（配列番号４６）、及びＧＳＳＳＧ（配列番号４７）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号４８）、ＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号４９）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５０）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５１）、ＧＧＧＧＳ（配列番号５２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５３）、ＧＧＧＳ（配列番号５４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号５５）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号５６）、ＧＳＳＧＧＳＧＧＳＧＧ（配列番号５７）、ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５８）、ＧＧＧＳＳＧＧＳ（配列番号１２７）、及びＧＳからなる群から選択される、グリシン－セリンベースのリンカー、ならびに（ｉｉ）ＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＳＥＧＳＴ（配列番号５９）、ＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣＰＡＰＥＦＬＧ（配列番号６０）、ＧＧＳＬＤＰＫＧＧＧＳ（配列番号６１）、ＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ（配列番号６２）、ＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＳ（配列番号６３）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＫＧ（配列番号６４）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＳＧＳＴＫＧ（配列番号６５）、及びＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＧＥＧＳＴＫＧ（配列番号６６）からなる群から選択される、グリシンとセリン、及びリジン、トレオニン、またはプロリンのうちの少なくとも１つを含むリンカーからなる群から選択される。

【００２３】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、（１）第１のポリペプチドは、配列番号３０のアミノ酸配列を含み、（２）第２のポリペプチドは、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、（３）第３のポリペプチドは、配列番号３２のアミノ酸配列を含む。

【００２４】

本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、（１）第１のポリペプチドは、配列番号１２０のアミノ酸配列を含み、（２）第２のポリペプチドは、配列番号３７のアミノ酸配列を含み、（３）第３のポリペプチドは、配列番号３２のアミノ酸配列を含む。

【００２５】

本明細書では、本明細書に開示の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物が開示される。

【００２６】

本明細書ではまた、本明細書に開示の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体と、薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を含む、キットも開示される。

【００２７】

本明細書ではまた、本明細書に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチドの第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び第３のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸も開示される。本明細書ではさらに、記載される核酸を含むベクター及び該ベクターを含む宿主細胞が提供される。

【００２８】

本明細書ではまた、活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体を生産する方法も開示され、該方法は、（ａ）宿主細胞を液体培地中、活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体を生産するのに十分な条件下で培養することと、（ｂ）活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体を回収することと、を含む。

【００２９】

本明細書ではまた、対象における疾患を処置する方法も開示され、該方法は、治療上有効量の本明細書に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体または本明細書に記載の薬学的組成物を対象に投与することを含む。一部の態様では、対象は、ヒトである。一部の態様では、疾患は、がんである。一部の態様では、活性化可能な二重特異性ポリペプチドまたは薬学的組成物は、腫瘍増殖の阻害を必要とする対象において腫瘍増殖を阻害

する際に使用するためのものである。
【００３０】
本明細書ではまた、がんを処置するための医薬の製造における、本明細書に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体または本明細書に記載の薬学的組成物の使用も開示される。
【図面の簡単な説明】
【００３１】
【図１】本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）の概略図である。
【図２Ａ】ＣＩ１０６（活性化可能なダブルアーム二価抗ＣＤ３、抗ＥＧＦＲ二重特異性抗体対照）、複合体－５７（活性化可能なＨＢＰＣ）、及び複合体－６７（活性化可能なＨＢＰＣ）、ならびに活性化ＣＩ１０６、活性化複合体－５７、及び活性化複合体－６７によるＥＧＦＲへの結合を示す。
【図２Ｂ】ＣＩ１０６（対照）、複合体－５７（活性化可能なＨＢＰＣ）、複合体－６７（活性化可能なＨＢＰＣ）、ならびに活性化ＣＩ１０６、活性化複合体－５７、及び活性化複合体－６７によるＣＤ３への結合を示す。
【図３Ａ】活性化ＣＩ１０６（対照）、活性化複合体－５７、及び活性化複合体－６７、ならびにＣＩ１０６（ダブルアーム二価二重特異性対照構築物）及び複合体－５７での処理に次ぐＨＴ２９細胞に対する細胞傷害作用を示す。
【図３Ｂ】ＣＩ１０６（対照）、複合体－６７、活性化ＣＩ１０６（対照）、及び活性化複合体－６７での処理に次ぐＨＴ２９細胞に対する細胞傷害作用を示す。
【図４】ビヒクル、１．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０６（対照）、ならびに０．２、０．６、及び１．８ｍｇ／ｋｇの複合体－６７での処置に次ぐ時間の関数としてのＨＴ２９－ｌｕｃ２異種移植腫瘍モデルにおける腫瘍体積を示す。
【図５】ビヒクル、０．３ｍｇ／ｋｇ及び１ｍｇ／ｋｇの活性化複合体－６７及び複合体－６７での処置に次ぐ時間の関数としてのＨＣＴ１１６異種移植腫瘍モデルにおける腫瘍体積を示す。
【図６】ＣＩ１０６（対照）、複合体－５７、及び複合体－６７についての単量体パーセンテージ（％）対濃度を示す。
【図７】Ａ～Ｃは、ＨＴ２９細胞（Ａ）、ＨＣＴ１１６細胞（Ｂ）、またはＪｕｒｋａｔ細胞（Ｃ）の表面上に発現したＥＧＦＲ及びＣＤ３へのＣＩ１０７の結合のフローサイトメトリーによる評定を示す。見かけ上のＫｄは、ＨＴ２９細胞における二連の実験及びＪｕｒｋａｔ細胞における三連の実験から算出した。
【図８Ａ】ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞におけるＣＩ１０７によって媒介される細胞傷害作用パーセントを示す。４８時間の培養後、ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２の細胞生存率及び細胞傷害作用を未処理の対照と比べて測定した。
【図８Ｂ】ＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞におけるＣＩ１０７によって媒介される細胞傷害作用パーセントを示す。４８時間の培養後、ＨＴ２９－Ｌｕｃ２の細胞生存率及び細胞傷害作用を未処理の対照と比べて測定した。
【図８Ｃ】ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞におけるＣＩ１０７によって媒介される細胞傷害作用パーセントを示す。１６時間の培養後、ＣＤ６９発現をフローサイトメトリーによって測定した。ＭＦＩ、平均蛍光強度。
【図８Ｄ】ＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞におけるＣＩ１０７によって媒介される細胞傷害作用パーセントを示す。１６時間の培養後、ＣＤ６９発現をフローサイトメトリーによって測定した。ＭＦＩ、平均蛍光強度。
【図９Ａ】１６時間の培養後に測定した、ＣＩ１０７での処理に次ぐサイトカイン放出を示す（ＩＦＮ－γ）。
【図９Ｂ】１６時間の培養後に測定した、ＣＩ１０７での処理に次ぐサイトカイン放出を示す（ＩＬ－２）。
【図９Ｃ】１６時間の培養後に測定した、ＣＩ１０７での処理に次ぐサイトカイン放出を

示す（ＩＬ－６）。
【図９Ｄ】１６時間の培養後に測定した、ＣＩ１０７での処理に次ぐサイトカイン放出を示す（ＭＣＰ－１）。
【図９Ｅ】１６時間の培養後に測定した、ＣＩ１０７での処理に次ぐサイトカイン放出を示す（ＴＮＦ－α）。
【図１０】Ａ～Ｂは、ＨＴ２９－Ｌｕｃ２腫瘍を保有し、ヒトＰＢＭＣを移植されたマウスにおける試験ＴＣＢでの処置後の腫瘍体積を示す。（Ａ）マウスをビヒクル（ＰＢＳ）または０．３ｍｇ／ｋｇのＣＩ０２０、ＣＩ０１１、ＣＩ０４０、もしくはＣＩ０４８（１群当たりｎ＝８）で週１回、３週間にわたって処置した。腫瘍体積を週２回測定した。（Ｂ）ＨＴ２９－Ｌｕｃ２腫瘍を保有し、ヒトＰＢＭＣを移植されたＮＳＧマウスをビヒクルまたは１ｍｇ／ｋｇのＣＩ０２０、ＣＩ０１１、ＣＩ０４０、もしくはＣＩ０４８で処置した。投与から７日後に腫瘍を採取し、ＣＤ３に対する免疫組織化学的検査を実施した。濃い染色はＣＤ３＋細胞を示す。
【図１１】Ａ～Ｂは、ＨＴ２９（Ａ）及びＨＣＴ１１６（Ｂ）異種移植腫瘍におけるＣＩ１０７での週１回、３週間の処置に次ぐ腫瘍体積を示す。腫瘍体積を週２回測定した。＊ｐ＜０．５、＊＊ｐ＜０．０１、＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。
【図１２Ａ】ＣＩ１０７の投与から８時間後に測定したＩＬ－６のレベルを示す。
【図１２Ｂ】ＣＩ１０７の投与から８時間後に測定したＩＦＮ－γのレベルを示す。
【図１２Ｃ】ＣＩ１０７の投与から４８時間後に血清生化学分析によって測定したアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）のレベルを示す。
【図１２Ｄ】抗イディオタイプのキャプチャー及び抗ヒトＦｃの検出を使用したＥＬＩＳＡによって測定したＡｃｔ－ＣＩ１０７及びＣＩ１０７の血漿中濃度を示す。ＣＩ１０７の線は、２．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７を投与した３匹の個々の動物からのデータを表し、Ａｃｔ－ＴＣＢの線は、０．０６ｍｇ／ｋｇまたは０．１８ｍｇ／ｋｇのＡｃｔ－ＴＣＢを投与した単一の動物を表す。
【発明を実施するための形態】
【００３２】
本開示がより容易に理解され得るように、ある特定の用語を最初に定義する。本願で使用されるとき、本明細書で別途明示的に規定される場合を除き、以下の用語の各々は、下記に定められる意味を有するものとする。追加の定義は、本願全体を通して定められる。
【００３３】
定義
本明細書で使用されるとき、「ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体」及び「ＨＢＰＣ」という用語は、２つの異なる生物学的標的に結合することができる結合ドメインを有する複合体を一緒に形成する一組のポリペプチドを指して本明細書で互換的に使用される。
【００３４】
「ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体」または「ＨＢＰＣ」という用語に関連して使用される場合の「活性化可能な」という用語は、本明細書で、ＨＢＰＣの構造に付加されたマスキング部分の存在によって結合活性が損なわれているＨＢＰＣを指す。「活性化」及び「ａｃｔ－」という用語は各々、活性化ＨＢＰＣを指して使用され得る。「活性化」及び「マスクされていない」という用語は、本明細書で互換的に使用される。
【００３５】
本明細書で使用されるとき、「ＥＧＦＲ」という用語は、受容体・膜貫通型糖タンパク質及びタンパク質キナーゼスーパーファミリーのメンバーを指す。ヒト上皮成長因子受容体は、ｃ－ｅｒｂ　Ｂ－１がん原遺伝子によってコードされる１７０ｋＤａの膜貫通型受容体であり、内因性のチロシンキナーゼ活性を示す（Ｍｏｄｊｔａｈｅｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　７３：２２８－２３５（１９９６）、Ｈｅｒｂｓｔ　ａｎｄ　Ｓｈｉｎ，Ｃａｎｃｅｒ　９４：１５９３－１６１１（２００２））。ＥＧＦＲの既知のアイソフォーム及びバリアント（例えば、選択的ＲＮＡ転写物、切り詰めバージョン

、多型等）もまた存在し、これらは本明細書における使用に企図される。ＥＧＦＲは、細胞増殖、分化、細胞生存、アポトーシス、血管新生、有糸分裂、及び転移を制御するシグナル伝達経路の活性化を含むがこれらに限定されないチロシンキナーゼ媒介性シグナル伝達経路を介して、多数の細胞プロセスを調節する（Ａｔａｌａｙ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｏｎｃｏｌｏｇｙ １４：１３４６－１３６３（２００３）、Ｔｓａｏ ａｎｄ Ｈｅｒｂｓｔ，Ｓｉｇｎａｌ ４：４－９（２００３）、Ｈｅｒｂｓｔ ａｎｄ Ｓｈｉｎ，Ｃａｎｃｅｒ ９４：１５９３－１６１１（２００２）、Ｍｏｄｊｔａｈｅｄｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ７３：２２８－２３５（１９９６））。ＥＧＦＲの過剰発現は、膀胱、脳、頭頸部、膵臓、肺、乳房、卵巣、結腸、前立腺、及び腎臓の癌を含めた、多数のヒトがんに関連する。ＥＧＦＲは、悪性細胞に発現するよりも低いレベルで正常組織の細胞にも発現する。例となる抗ＥＧＦＲ抗原結合タンパク質には、ヒト野生型ＥＧＦＲ（ＮＣＢＩ受託番号ＮＧ＿００７７２６．Ｅ）、ヒト野生型ＥＧＦＲ転写物バリアント１（ＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿００５２１９．２）、ヒト野生型ＥＧＦＲ転写物バリアント２（ＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿９５８４３９．１）、ヒト野生型ＥＧＦＲ転写物バリアント３（ＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿９５８４４０．１）、ヒト野生型ＥＧＦＲ転写物バリアント４（ＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿９５８４４１．１）、ヒト野生型ＥＧＦＲ転写物バリアント５（ＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿００１３３３８２６．１）、ヒト野生型ＥＧＦＲ転写物バリアント６（ＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿００１３３３８２７．１）、ヒト野生型ＥＧＦＲ転写物バリアント７（ＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿００１３３３８２８．１）、ヒト野生型ＥＧＦＲ転写物バリアント８（ＮＣＢＩ受託番号ＮＭ＿００１３４６９４１．２）、ヒト野生型ＥＧＦＲ転写物バリアントＥＧＦＲｖＩＩＩ（ＮＣＢＩ受託番号ＮＰ＿００１３３３８７０．１）等が含まれるが、これらに限定されない。

【００３６】

本明細書で使用される「ＣＤ３」または「分化抗原群３」という用語は、Ｔ細胞受容体複合体のサブユニットである６本の鎖でできたタンパク質複合体を指す（Ｊａｎｅｗａｙ ｅｔ ａｌ．，ｐ．１６６，９^{ｔｈ} ｅｄ．）。ＴＣＲ α：βヘテロ二量体は、ＣＤ３サブユニットと会合して、ＴＣＲ細胞表面抗原受容体を完成させる。２本のＣＤ３ε鎖、ＣＤ３γ鎖、及びＣＤ３δ鎖、ならびにＣＤ３ζ鎖のホモ二量体がＴ細胞受容体複合体を完成させ、これが主要組織適合性複合体クラスＩ及びＩＩに結合したペプチドの認識に関与し、Ｔ細胞活性化に影響を及ぼす。ＣＤ３抗原は、成熟Ｔリンパ球及び胸腺細胞のサブセットに発現する。本明細書に開示されるＣＤ３ポリペプチドに特異的に結合するＣＤ３標的化ドメインは、霊長類（例えば、ヒト）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含めた任意の脊椎動物源からものであり得る。この用語は、「完全長」のプロセシングされていないＣＤ３（例えば、プロセシングされていないまたは未修飾のＣＤ３εまたはＣＤ３γ）、ならびに細胞におけるプロセシングからもたらされる任意の形態のＣＤ３を包含する。この用語はまた、ＣＤ３の天然に存在するバリアント、例えば、スプライスバリアントまたはアレルバリアントも包含する。本明細書に記載の抗ＣＤ３標的化ドメインは、ヒト野生型ＣＤ３Ｅ（ＮＣＢＩ受託番号ＮＭ＿０００７３３．３）に特異的に結合することができる。

【００３７】

本明細書で使用される「Ｔ細胞」という用語は、様々な細胞媒介性免疫反応に関与する胸腺由来のリンパ球として定義される。本明細書で使用される「制御性Ｔ細胞」という用語は、
ＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ＦｏｘＰ３$^{+}$ Ｔ細胞を指す。「Ｔｒｅｇ」は、制御性Ｔ細胞に対する本明細書で使用される略号である。

【００３８】

本明細書で使用される「ヘルパーＴ細胞」という用語は、ＣＤ４$^{+}$ Ｔ細胞を指す。ヘルパーＴ細胞は、ＭＨＣクラスＩＩ分子に結合した抗原を認識する。Ｔｈ１及びＴｈ２の少なくとも２種類のヘルパーＴ細胞が存在し、これらは異なるサイトカインを産生する。ヘルパーＴ細胞は、活性化されるとＣＤ２５$^{+}$となるが、ＦｏｘＰ３$^{+}$となるのは一過性

にすぎない。
【００３９】
本明細書で使用される「細胞傷害性Ｔ細胞」という用語は、ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞を指す。細胞傷害性Ｔ細胞は、ＭＨＣクラスＩ分子に結合した抗原を認識する。
【００４０】
「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗原結合タンパク質（例えば、抗体）を抗原に結合させることに関与する、抗原結合タンパク質（例えば、抗体）の重鎖または軽鎖のドメインを指す。抗体等の抗原結合タンパク質の重鎖及び軽鎖（それぞれＶＨ及びＶＬ）の可変領域または可変ドメインは、フレームワーク領域（ＦＲ）と称されるより保存された領域が散在する、超可変領域（ＨＶＲ）または相補性決定領域（ＣＤＲ）等の、超可変領域（ｒｅｇｉｏｎｓ　ｏｆ　ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｉｌｉｔｙ）（または超可変領域（ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ　ｒｅｇｉｏｎｓ）（これは構造的に規定されたループの配列及び／または形態が高度に可変であり得る））にさらに細分され得る。一般に、各重鎖可変領域において３つのＨＶＲ（ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、ＨＶＲ－Ｈ３）またはＣＤＲ（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３）、及び各軽鎖可変領域において３つのＨＶＲ（ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３）またはＣＤＲ（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３）が存在する。「フレームワーク領域」及び「ＦＲ」は、当該技術分野において重鎖及び軽鎖の可変領域の非ＨＶＲまたは非ＣＤＲ部分を指すことが知られている。一般に、各完全長重鎖可変領域において４つのＦＲ（ＦＲ－Ｈ１、ＦＲ－Ｈ２、ＦＲ－Ｈ３、及びＦＲ－Ｈ４）、及び各完全長軽鎖可変領域において４つのＦＲ（ＦＲ－Ｌ１、ＦＲ－Ｌ２、ＦＲ－Ｌ３、及びＦＲ－Ｌ４）が存在する。各ＶＨ及びＶＬ内で、３つのＨＶＲまたはＣＤＲ及び４つのＦＲは、典型的に、アミノ末端からカルボキシ末端に、以下の順序で配置される：ＨＶＲの場合はＦＲ１、ＨＶＲ１、ＦＲ２、ＨＶＲ２、ＦＲ３、ＨＶＲ３、ＦＲ４、またはＣＤＲの場合はＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４（Ｃｈｏｔｈｉａ　ａｎｄ　Ｌｅｓｋ　Ｊ．Ｍｏｔ．Ｂｉｏｌ．，１９５，９０１－９１７（１９８７）も参照されたい）。抗原結合特異性を付与するには単一のＶＨまたはＶＬドメインで十分であり得る。加えて、特定の抗原に結合する抗体を、その抗原に結合する抗体からのＶＨまたはＶＬドメインを使用して単離して、相補的ＶＬまたはＶＨドメインのライブラリーをそれぞれスクリーニングすることができる。例えば、Ｐｏｒｔｏｌａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：８８０－８８７（１９９３）、Ｃｌａｒｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３５２：６２４－６２８（１９９１）を参照されたい。
【００４１】
本明細書で使用される「重鎖可変領域」（ＶＨ）という用語は、重鎖ＨＶＲ－Ｈ１、ＦＲ－Ｈ２、ＨＶＲ－Ｈ２、ＦＲ－Ｈ３、及びＨＶＲ－Ｈ３を含む領域を指す。例えば、重鎖可変領域は、重鎖ＣＤＲ－Ｈ１、ＦＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ２、ＦＲ－Ｈ３、及びＣＤＲ－Ｈ３を含んでもよい。一部の態様では、重鎖可変領域はまた、ＦＲ－Ｈ１の少なくとも一部分及び／またはＦＲ－Ｈ４の少なくとも一部分も含む。
【００４２】
本明細書で使用される「重鎖定常領域」という用語は、少なくとも３つの重鎖定常ドメイン、すなわち$C_{H}1$、$C_{H}2$、及び$C_{H}3$を含む領域を指す。非限定的な例となる重鎖定常領域には、γ、δ、及びαが含まれる。非限定的な例となる重鎖定常領域にはまた、ε及びμも含まれる。
【００４３】
本明細書で使用される「軽鎖可変領域」（ＶＬ）という用語は、軽鎖ＨＶＲ－Ｌ１、ＦＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ２、ＦＲ－Ｌ３、及びＨＶＲ－Ｌ３を含む領域を指す。一部の態様では、軽鎖可変領域は、軽鎖ＣＤＲ－Ｌ１、ＦＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ２、ＦＲ－Ｌ３、及びＣＤＲ－Ｌ３を含む。一部の態様では、軽鎖可変領域はまた、ＦＲ－Ｌ１及び／またはＦＲ－Ｌ４も含む。
【００４４】

本明細書で使用される「軽鎖定常領域」という用語は、軽鎖定常ドメイン、すなわちC_Lを含む領域を指す。非限定的な例となる軽鎖定常領域には、λ及びκが含まれる。

【００４５】

本明細書で使用される「軽鎖」（ＬＣ）という用語は、リーダー配列の有無にかかわらず、少なくとも軽鎖可変領域を含むポリペプチドを指す。一部の態様では、軽鎖は、軽鎖定常領域の少なくとも一部分を含む。本明細書で使用される「完全長軽鎖」という用語は、リーダー配列の有無にかかわらず、軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含むポリペプチドを指す。

【００４６】

「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子、または免疫グロブリン（Ｉｇ）分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に特異的に結合する（それと免疫反応を起こす）抗原結合部位を含有する分子を指す。抗体またはポリペプチドの「抗原結合部分」（別称「抗原結合断片」）とは、標的抗原に特異的に結合する抗体またはポリペプチドの１つまたは複数の部分を指す。抗体及び抗原結合部分には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ドメイン抗体、一本鎖抗体、Ｆａｂ、及び$F(ab')_2$断片、ｓｃＦｖ、Ｆｄ断片、Ｆｖ断片、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）断片、二重親和性標的変更（ｄｕａｌ－ａｆｆｉｎｉｔｙ ｒｅ－ｔａｒｇｅｔｉｎｇ）抗体（ＤＡＲＴ）、二重可変ドメイン免疫グロブリン；単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）、及び２つ以上の単離されたＣＤＲの組み合わせ（これらは任意選択で合成リンカーによって連結され得る）、ならびにＦａｂ発現ライブラリーが含まれるが、これらに限定されない。非ヒト抗体、例えば、ラクダ科動物抗体が、ヒトにおけるその免疫原性を低減するために組換え法によってヒト化されてもよい。

【００４７】

本明細書で指定されるＣＤＲ配列は、Ａｂｈｉｎａｎｄａｎ，Ｋ．Ｒ．ａｎｄ Ｍａｒｔｉｎ，Ａ．Ｃ．Ｒ．（２００８）“Ａｎａｌｙｓｉｓ ａｎｄ ｉｍｐｒｏｖｅｍｅｎｔｓ ｔｏ Ｋａｂａｔ ａｎｄ ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌｌｙ ｃｏｒｒｅｃｔ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ ｏｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎｓ”，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４５，３８３２－３８３９（同文献は参照によりその全体が本明細書に援用される）に記載されるようなＫａｂａｔ番号付けシステムに従って決定される（すなわち、「Ｋａｂａｔ ＣＤＲ」）。Ｋａｂａｔ ＣＤＲは、ＣＤＲ－Ｌ１：残基Ｌ２４～Ｌ３４；ＣＤＲ－Ｌ２：残基Ｌ５０～Ｌ５６；ＣＤＲ－Ｌ３：残基Ｌ８９～Ｌ９７；ＣＤＲ－Ｈ１：残基Ｈ３１～Ｈ３５；ＣＤＲ－Ｈ２：残基Ｈ５０～Ｈ６５；及びＣＤＲ－Ｈ３：残基Ｈ９５～Ｈ１０２として定義され、ここで、「Ｌ」は軽鎖可変ドメインを指し、「Ｈ」は重鎖可変ドメインを指す。

【００４８】

「特異的に結合する」または「免疫特異的に（ｉｍｍｕｎｏｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ）結合する」とは、標的化ドメイン、抗体または抗原結合断片が、所望の抗原の１つまたは複数の抗原決定基と反応し、かつ他のポリペプチドとは反応しないか、またはそれよりはるかに低い親和性（$K_d > 10^{-6}$）（Ｋｄが小さいほど親和性がより高いことを表す）で結合することを意味する。選択のポリペプチドの免疫学的結合特性は、当該技術分野で周知の方法を使用して定量することができる。１つのかかる方法は、抗原結合部位／抗原複合体の形成及び解離の速度を測定することを伴い、ここで、それらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、及び両方向の速度に等しく影響を及ぼす幾何学的パラメータに依存する。故に、「オン速度定数」（k_{on}）及び「オフ速度定数」（k_{off}）のいずれも、濃度ならびに会合及び解離の実際の速度の計算によって決定することができる（Ｎａｔｕｒｅ ３６１：１８６－８７（１９９３）を参照されたい）。k_{off}/k_{on}の比は、親和性に関連しない全てのパラメータの解除を可能にし、解離定数Ｋｄに等しい（全般的に、Ｄａｖｉｅｓ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ ５９：４３９－４７３を参照されたい）。一部の態様では、対応する抗原に特異的に結合する抗原標的化ドメイン、抗体、または抗原結合断片は、標的抗原に対

して約１０μＭ未満、一部の態様では約１００μＭ未満のＫｄを示す。
【００４９】
免疫グロブリンは、ＩｇＡ、分泌型ＩｇＡ、ＩｇＧ、及びＩｇＭを含むがこれらに限定されない公知のアイソタイプのうちのいずれかに由来し得る。ＩｇＧサブクラスもまた当業者に周知されており、これにはヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４が含まれるが、これらに限定されない。「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域の遺伝子によってコードされる抗体クラスまたはサブクラス（例えば、ＩｇＭまたはＩｇＧ１）を指す。
【００５０】
「抗抗原（ａｎｔｉ－ａｎｔｉｇｅｎ）」抗体またはポリペプチドとは、当該抗原に特異的に結合する抗体またはポリペプチドを指す。例えば、抗ＣＤ３ポリペプチドは、ＣＤ３に特異的に結合する。
【００５１】
本明細書で使用されるとき、「ＭＭ」及び「マスキング部分」という用語は、標的化ドメインがその対応する抗原に結合することを妨害するペプチドを指して本明細書で互換的に使用される。例えば、ＭＭ１は、第１の標的化ドメインが第１の標的に結合することを妨害するペプチドであり、ＭＭ２は、第２の標的化ドメインが第２の標的に結合することを妨害するペプチドである。マスキング部分が、標的化ドメインがその対応する標的に結合することを妨害する程度は、その「マスキング効率」によって定量される。「マスキング効率」及び「ＭＥ」という用語は、以下のように決定される比率を指して本明細書で互換的に使用される：
ＭＥ＝ＥＣ５０、活性化可能なＨＢＰＣ（すなわち、プロテアーゼによって切断されない）

ＥＣ５０、活性化ＨＢＰＣ
【００５２】
本明細書で使用されるとき、「ＣＭ」及び「切断可能な部分」という用語は、腫瘍細胞において上方制御されるプロテアーゼによる切断に感受性があるペプチド基質を指して互換的に使用される。ＣＭのプロテアーゼ媒介性切断は、活性化可能なＨＢＰＣの構造からのＭＭの解放をもたらし、それによって、各々対応する「活性化された」（すなわち、マスクされていない）第１の標的化ドメイン及び／または第２の標的化ドメインがそれぞれの標的に自由に結合する、「活性化された」（すなわち、マスクされていない）生成物が生成される。
【００５３】
本明細書で使用される「単離されたポリヌクレオチド」という用語は、組換えポリヌクレオチドまたは合成由来のポリヌクレオチドであって、その起源に基づいて、「単離されたポリヌクレオチド」が、（１）「単離されたポリヌクレオチド」が自然界で見られる、ポリヌクレオチドの全てまたは一部分に関連しないか、（２）自然界では連結されないポリヌクレオチドに作動可能に連結されているか、または（３）より大きな配列の一部として自然界に存在しないものを指す。本開示によるポリヌクレオチドには、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び第３のポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。
【００５４】
本明細書で使用される「作動可能に連結された」という用語は、そのように説明される構成要素の位置が、それらの意図される様態でそれらが機能することを可能にする関係にあることを指す。コード配列に「作動可能に連結された」制御配列は、制御配列と適合性の条件下でコード配列の発現が達成されるような方式でライゲーションされている。
【００５５】
本明細書で考察されるとき、本明細書に記載のアミノ酸配列（すなわち、各参照配列）における軽微な変化は、結果として生じる類似配列が参照配列と少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、９０％、９５％、最も好ましくは９９％の配列同一性を維

持する限り、本開示により包含されることが企図される。特に、保存的アミノ酸置換が企図される。保存的置換は、アミノ酸の側鎖の性質に関して関連するアミノ酸のファミリー内で起こるものである。アミノ酸は、下記のファミリーに分類され得る：（１）酸性アミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸であり、（２）塩基性アミノ酸は、リジン、アルギニン、ヒスチジンであり、（３）非極性アミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンであり、（４）極性非荷電アミノ酸は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシンである。親水性アミノ酸には、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、セリン、及びトレオニンが含まれる。疎水性アミノ酸には、アラニン、システイン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、及びバリンが含まれる。アミノ酸の他のファミリーには、（ｉ）脂肪族ヒドロキシファミリーである、セリン及びトレオニン、（ｉｉ）アミド含有ファミリーである、アスパラギン及びグルタミン、（ｉｉｉ）脂肪族ファミリーである、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン、ならびに（ｉｖ）芳香族ファミリーである、フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンが含まれる。例えば、本明細書に記載のＨＢＰＣポリペプチド及びポリペプチド複合体内で、ロイシンとイソロイシンまたはバリンとの、アスパラギン酸とグルタミン酸との、トレオニンとセリンとの単独の置換、またはあるアミノ酸と構造的に関連するアミノ酸との類似の置換は、とりわけ置換がＣＤＲまたはフレームワーク領域内のアミノ酸を伴わない場合、結果として生じる分子の結合または特性に大きな影響を有することはないと予想するのが妥当である。アミノ酸変化が機能的ポリペプチド複合体をもたらすかどうかは、結果として生じる分子、すなわち、結果として生じる類似配列の比活性をアッセイすることによって容易に決定することができる。アッセイは、本明細書に詳述される。類似体の好ましいアミノ末端及びカルボキシ末端は、機能的ドメインの境界付近に存在する。構造的ドメイン及び機能的ドメインは、公開または専有配列データベースとのヌクレオチド及び／またはアミノ酸配列データの比較によって同定することができる。好ましくは、コンピュータによる比較方法を使用して、構造及び／または機能が知られている他のタンパク質に存在する配列モチーフまたは予測されるタンパク質立体構造ドメインが同定される。既知の３次元構造へと折り畳まれるタンパク質配列を同定するための方法が知られている（Ｂｏｗｉｅ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５３：１６４（１９９１））。故に、上述の例は、本開示による構造的ドメイン及び機能的ドメインを画定するために使用され得る配列モチーフ及び構造的立体構造を当業者が認識できることを示す。

【００５６】

保存的アミノ酸置換は、参照配列の構造特性を実質的に変化させるべきではない（例えば、代替のアミノ酸は、参照配列に存在するヘリックスを切断する、または参照配列を特徴付ける他の種類の二次構造を破壊する傾向があるべきではない）。当該技術分野で認識されるポリペプチド二次構造及び三次構造の例は、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ（Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８４））、Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ（Ｃ．Ｂｒａｎｄｅｎ ａｎｄ Ｊ．Ｔｏｏｚｅ，ｅｄｓ．，Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９９１））、及びＴｈｏｒｎｔｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ３５４：１０５（１９９１）に記載される。

【００５７】

例となるアミノ酸置換にはまた、（１）ＣＭを含む切断可能なリンカー以外における、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの領域におけるタンパク質分解に対する感受性を低減する、（２）酸化に対する感受性を低減する、（３）タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変化させる、（４）抗原に対する結合親和性を変化させる、及び（４）かかる類似体の他の物理化学的特性または機能的特性を付与するかまたは改変するものが含まれる。かかるアミノ酸置換は、本明細書に記載のア

ッセイを使用した既知の変異誘発法及び／または指向性分子進化法を使用して同定されてもよい。例えば、国際公開第ＷＯ２００１／０３２７１２号、米国特許第７，４３２，０８３号、米国公開第２００４／０１８０３４０号、及び米国特許第６，２９７，０５３号を参照されたく、同文献の各々は参照により本明細書に援用される。類似体は、活性化可能なＨＢＰＣ内の参照配列に１つまたは複数の変異を導入することによって調製されてもよい。例えば、参照配列において（好ましくは、分子間接触を形成するドメイン（複数可）の外側にあるポリペプチドの部分において）単一または複数のアミノ酸置換を行ってもよい。

【００５８】

本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される」または「薬理学的に適合性の」とは、生物学的にまたは別様に望ましくないことのない材料を意味し、例えば、その材料は、いずれの顕著な望ましくない生物学的作用を引き起こすことも、組成物中に含まれる組成物の他の構成成分のいずれとも有害な様態で相互作用することもなく、個体または対象に投与される薬学的組成物に組み込まれてもよい。薬学的に許容される担体または賦形剤は、例えば、毒性試験及び製造試験の所要の基準を満たしたものであり、及び／または米国食品医薬品局によって作成される不活性成分ガイドに含まれている。

【００５９】

本明細書で使用される「患者」には、がんに罹患したいずれの患者も含まれる。「対象」及び「患者」という用語は、本明細書で互換的に使用される。

【００６０】

「がん」、「がん性」、または「悪性」という用語は、典型的には無制御な細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理的状態を指すか、または説明する。がんの例としては、例えば、切除不能または転移性黒色腫等の黒色腫、白血病、リンパ腫、芽細胞腫、癌腫、及び肉腫が挙げられる。かかるがんのより具体的な例としては、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、フィラデルフィア染色体陽性の急性リンパ芽球性白血病（Ｐｈ＋ＡＬＬ）、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、消化管癌、腎臓癌、卵巣癌、肝臓癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、前立腺癌、甲状腺癌、神経芽細胞腫、膵臓癌、多形膠芽腫、子宮頸癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、及び頭頸部癌、胃癌、胚細胞腫瘍、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、及び慢性リンパ性白血病（ＣＭＬ）が挙げられる。

【００６１】

本明細書で使用される「腫瘍」という用語は、良性（非がん性）または前がん性病変を含めた悪性（がん性）のいずれであれ、過剰な細胞成長または増殖からもたらされる任意の組織塊を指す。

【００６２】

「投与する」とは、当業者に既知の種々の方法及び送達系のうちのいずれかを使用した、治療剤を含む組成物の対象への物理的導入を指す。本明細書に開示される製剤の投与経路には、例えば注射または注入による、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、脊髄、または他の非経口投与経路が含まれる。本明細書で使用される「非経口投与」という語句は、通常は注射による、経腸及び局所投与以外の投与様式を意味し、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、リンパ内、病巣内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、及び胸骨内（ｉｎｔｒａｓｔｅｒｎａｌ）注射及び注入、ならびにインビボエレクトロポレーションを含む。一部の態様では、製剤は、非経口経路を介して投与され、一部の態様では経口で投与される。他の非経口経路には、例えば、鼻腔内、膣、直腸内、舌下、または局所への、局所、上皮、または粘膜投与経路が含まれる。投与はまた、例えば、１回、複数回、及び／または１つもしくは複数の長期間にわたって実施することができる。

【００６３】

対象の「処置」または「療法」は、疾患に関連する症状、合併症もしくは病態、または生化学的兆候を好転させる、緩和する、改善させる、阻害する、その進行、発症、重症度

、もしくは再発を減速させることを目的とした、対象に対して実施される任意の種類の介入もしくは過程、または対象への活性薬剤の投与を指す。

【００６４】

本明細書で使用されるとき、「有効な処置」とは、有益な効果、例えば、疾患または障害の少なくとも１つの症状の改善をもたらす処置を指す。有益な効果は、ベースラインを上回る改善、すなわち、本方法による療法の開始前に行われた測定または観察を上回る改善の形態をとることができる。有益な効果はまた、腫瘍のマーカーの有害な進行の停止、減速、遅延、または安定化の形態をとることもできる。有効な処置は、がんに関連する少なくとも１つの症状の緩和を指す場合がある。かかる有効な処置は、例えば、患者の疼痛を低減し得る、病変のサイズ及び／または数を低減し得る、腫瘍の転移を低減もしくは予防し得る、及び／または腫瘍増殖を減速させ得る。

【００６５】

「有効量」という用語は、所望の生物学的結果、治療結果、及び／または予防結果をもたら薬剤の量を指す。その結果は、疾患の徴候、症状、もしくは原因のうちの１つもしくは複数の低減、改善、一時的緩和、軽減、遅延、及び／または緩和、または生体系の任意の他の所望の変化であり得る。固形腫瘍に関して、有効量は、腫瘍の縮小及び／または腫瘍の増殖速度の減少（腫瘍増殖の抑制等）を引き起こすか、または他の望まれない細胞増殖を遅延させるのに十分な量を含む。一部の態様では、有効量は、腫瘍再発を予防または遅延させるのに十分な量である。有効量は、１回または複数回の投与で投与され得る。有効量の薬物または組成物は、（ｉ）がん細胞の数を低減し得る、（ｉｉ）腫瘍サイズを低減し得る、（ｉｉｉ）周囲の臓器へのがん細胞の浸潤をある程度阻害、遅延、減速し得、停止させ得る、（ｉｖ）腫瘍転移をある程度阻害、減速させ得、停止させ得る、（ｖ）腫瘍増殖を阻害し得る、（ｖｉ）腫瘍の発生及び／または再発を予防もしくは遅延させ得る、及び／または（ｖｉｉ）がんに関連する症状のうちの１つもしくは複数をある程度緩和し得る。

【００６６】

「免疫応答」とは、免疫系の細胞（例えば、Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、樹状細胞、及び好中球）、ならびにこれらの細胞のうちのいずれかまたは肝臓、脾臓、及び／または骨髄によって産生される可溶性高分子（抗体、サイトカイン、及び補体を含む）による、侵入病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、がん性もしくは他の異常な細胞、または、自己免疫状態もしくは病的炎症の場合には、正常なヒト細胞もしくは組織の選択的標的化、それへの結合、それへの損傷、その破壊、及び／または脊椎動物の身体からのその排除をもたらす作用を指す。

【００６７】

選択肢（例えば、「または」）の使用は、選択肢のうちの１つ、両方、またはそれらの任意の組み合わせのいずれかを意味するように理解されるべきである。本明細書で使用されるとき、不定冠詞「ａ」または「ａｎ」は、任意の列挙されるまたは挙げられる構成要素のうちの「１つまたは複数」を指すように理解されるべきである。

【００６８】

本明細書で使用される場合の「及び／または」という用語は、２つの明記される特徴または構成要素の各々が、他方の有無にかかわらず明確に開示されていると解釈されるべきである。故に、本明細書で「Ａ及び／またはＢ」等の語句において使用される「及び／または」という用語は、「Ａ及びＢ」、「ＡまたはＢ」、「Ａ」（単独）、及び「Ｂ」（単独）を含むことが意図される。同様に、「Ａ、Ｂ、及び／またはＣ」等の語句において使用される「及び／または」という用語は、以下の態様の各々、すなわち、Ａ、Ｂ、及びＣ；Ａ、Ｂ、またはＣ；ＡまたはＣ；ＡまたはＢ；ＢまたはＣ；Ａ及びＣ；Ａ及びＢ；Ｂ及びＣ；Ａ（単独）；Ｂ（単独）；ならびにＣ（単独）を包含することが意図される。

【００６９】

態様が「～を含む」という言い回しとともに本明細書に記載される場合はいずれも、「

～からなる」及び／または「～から本質的になる」という用語で記載される、その他の点では類似した態様もまた提供されることが理解される。

【００７０】

「約」という用語は、当業者によって決定される特定の値または組成物に対して許容される誤差範囲内である値または組成物を指し、これは値または組成物がどのように測定または決定されるか、すなわち、測定システムの限界に部分的に依存する。例えば、「約」または「～から本質的になる」とは、当該技術分野における慣習に従って、１標準偏差以内または１標準偏差超を意味し得る。代替として、「約」または「～から本質的になる」とは、最大１０％または２０％の範囲（すなわち、±１０％または±２０％）を意味し得る。例えば、約３ｍｇは、２．７ｍｇ～３．３ｍｇの間（１０％の場合）または２．４ｍｇ～３．６ｍｇの間（２０％の場合）の任意の数を含み得る。さらに、特に生物系またはプロセスに関して、この用語は、値の最大で一桁、または最大５倍を意味し得る。本明細書及び特許請求の範囲において特定の値または組成物が提供される場合、別途定めのない限り、「約」の意味は、その特定の値または組成物に対して許容される誤差範囲内であることが想定されるべきである。

【００７１】

本明細書に記載されるとき、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比率範囲、または整数範囲は、別途指示されない限り、列挙される範囲内の任意の整数の値、及び適切な場合、その分数（整数の１０分の１及び１００分の１等）を含むことが理解されるべきである。

【００７２】

別途規定されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が関連する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology，Juo，Pei－Show，2nd ed.，２００２，ＣＲＣ Press、The Dictionary of Cell and Molecular Biology，5th ed.，２０１３，Academic Press、及びthe Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology，２００６，Oxford University Pressは、本開示で使用される用語の多くについての一般辞書を当業者に提供する。

【００７３】

単位、接頭辞、及び記号は、それらの国際単位系（ＳＩ）により承認される形態で表される。数値範囲は、その範囲を画定する数を含む。本明細書で提供される見出しは、本明細書を全体として参照することによって得ることができる、本開示の種々の態様の限定ではない。したがって、上記で定義された用語は、本明細書を全体的に参照することによってより十分に定義される。

【００７４】

本開示の活性化可能なポリペプチドの概略図（例えば、図１）は、排他的であることは意図されない。リンカー、スペーサー、及びシグナル配列等の他の配列要素が、かかる概略図において列挙される配列要素の前、後、またはそれらの間に存在してもよい。ＭＭ及びＣＭは、抗体またはポリペプチドのＶＬの代わりに抗体またはポリペプチドのＶＨに連結され得、逆も成立することもまた理解されるべきである。

【００７５】

本開示の種々の態様は、以下の小節にさらに詳細に記載される。

【００７６】

活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体

本開示は、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド（ＨＢＰＣ）を提供し、該活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド（ＨＢＰＣ）は、（ａ）（ｉ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽

鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、該ＶＨ１及び該ＶＬ１が一緒に、ＣＤ３ポリペプチドに特異的に結合するＴ細胞分化抗原群（ＣＤ３）標的化ドメインを形成する、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）、（ｉｉｉ）第１の切断可能な部分（ＣＭ１）、（ｉｖ）第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、ならびに（ｖ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）を含む、第１のポリペプチドと、（ｂ）（ｉ）第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）であって、該ＶＨ２及び該ＶＬ２が一緒に、ＥＧＦＲに特異的に結合するＥＧＦＲ標的化ドメインを形成する、該第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）、（ｉｉ）第２のマスキング部分（ＭＭ２）、ならびに（ｉｉｉ）第２の切断可能な部分（ＣＭ２）を含む、第２のポリペプチドと、（ｃ）（ｉ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）を含み、（ｉｉ）免疫グロブリン可変ドメインを含まない、第３のポリペプチドと、を含み、ここで、ＭＭ１は、ＣＤ３標的化ドメインがＣＤ３ポリペプチドに結合することを妨害するペプチドであり、ＭＭ２は、ＥＧＦＲ標的化ドメインがＥＧＦＲに結合することを妨害するペプチドである。本明細書の実施例で実証されるように、本開示の活性化可能なＨＢＰＣは、耐凝集性、濃度依存的凝集レベルの低さ（これは、比較的高濃度の活性化可能なＨＢＰＣ生成物が生成され得る精製中に特に有益である）、活性化されたときの効力の高さ、及び改善された抗腫瘍活性（活性化されたとき）を含めて、当該技術分野で既知の活性化可能なまたはマスクされた分子に勝る利点を提供する。

【００７７】

本明細書の上記に記載されるとき、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの第１のポリペプチドに存在する構成要素の中には、ＣＤ３ポリペプチドに特異的に結合する一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）を含む、Ｔ細胞ＣＤ３標的化ドメインがある。一部の態様では、ＣＤ３ポリペプチドは、ＣＤ３のイプシロン鎖である。一部の態様では、本明細書で用いられるｓｃＦｖ（抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ）は、重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含む。

【００７８】

ＶＨ１は、可変重鎖ＣＤＲ１（ＶＨ　ＣＤＲ１、本明細書でＣＤＲＨ１とも称される）、可変重鎖ＣＤＲ２（ＶＨ　ＣＤＲ２、本明細書でＣＤＲＨ２とも称される）、及び可変重鎖ＣＤＲ３（ＶＨ　ＣＤＲ３、本明細書でＣＤＲＨ３とも称される）を含み、ＶＬ１は、可変軽鎖ＣＤＲ１（ＶＬ　ＣＤＲ１、本明細書でＣＤＲＬ１とも称される）、可変軽鎖ＣＤＲ２（ＶＬ　ＣＤＲ２、本明細書でＣＤＲＬ２とも称される）、及び可変軽鎖ＣＤＲ３（ＶＬ　ＣＤＲ３、本明細書でＣＤＲＬ３とも称される）を含む。

【００７９】

本明細書で提供される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣは、マスキング部分（ＭＭ）を含む。本明細書で使用されるとき、「マスキング部分」及び「ＭＭ」という用語は、標的化ドメインの近位に位置付けられるときに、標的化ドメインがその標的に結合することを妨害するペプチドを指して本明細書で互換的に使用される。一部の態様では、ＭＭは、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣに連結、または別様に結合させられるアミノ酸配列であり、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣに結合させられることにより、各ＭＭが、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣがその標的に特異的に結合する能力を低減するようになる。一部の態様では、ＭＭ１は、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣがＣＤ３に特異的に結合することを阻止するか、またはその能力を減少させる。一部の態様では、ＭＭ２は、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣがＥＧＦＲに特異的に結合することを阻止するか、またはその能力を減少させる。一部の態様では、ＭＭは、抗原標的化ドメイン（複数可）に特異的に結合する。好適なＭＭは、様々な既知の技法のうちのいずれかを使用して特定することができる。

【００８０】

例えば、様々な抗体結合ドメインに関連して本開示の実施において使用するのに好適である抗ＥＧＦＲマスキング部分には、例えば、ＰＣＴ公開第ＷＯ２０１３／１６３６３１号、同第ＷＯ２０１５／０１３６７１号、同第ＷＯ２０１６／０１４９７４号、同第ＷＯ２０１９／０７５４０５号、及び同第ＷＯ２０１９／２１３４４４号に記載されるものを

含めて、当該技術分野で知られているいずれも含まれ、同文献の各々は参照によりそれらの全体が本明細書に援用される。本開示の実施において使用するのに好適である抗ＣＤ３マスキング部分には、ＷＯ２０１３／１６３６３１、ＷＯ２０１５／０１３６７１、ＷＯ２０１６／０１４９７４、ＷＯ２０１９／０７５４０５、及びＷＯ２０１９／２１３４４４に記載されるものを含めて、当該技術分野で知られているもののいずれも含まれ、同文献の各々は参照によりそれらの全体が本明細書に援用される。

【００８１】

本明細書で提供される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの一部の態様では、ＭＭ１及び／またはＭＭ２は、５個のアミノ酸～約４０個のアミノ酸、またはそれらの間ならびに５個のアミノ酸及び４０個のアミノ酸の両方を含む任意の範囲を含む。本明細書で使用されるとき、「ＭＭ１」という用語は、ＣＤ３標的化ドメインに対するマスキング部分を表す。本明細書で使用されるとき、「ＭＭ２」という用語は、ＥＧＦＲ標的化ドメイン上のマスキング部分を表す。

【００８２】

本明細書で提供される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの一部の態様では、ＭＭＩは、配列番号１、６７、６８、６９、７０、７１、及び７２からなる群から選択される。一部の態様では、ＭＭ１は、配列番号１のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ＭＭ２は、配列番号１３のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ＭＭ１は、配列番号１を含み、ＭＭ２は、配列番号１３である。一部の態様では、ＭＭ１は、配列番号７２を含み、ＭＭ２は、配列番号１３を含む。

【００８３】

本開示の一部の態様では、一本鎖可変断片は、（ｉ）アミノ酸配列ＫＹＡＭＮ（配列番号３）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号４）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＩＳＹＷＡＹ（配列番号５）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）、ならびに（ｉ）アミノ酸配列ＧＳＳＴＧＡＶＴＳＧＮＹＰＮ（配列番号６）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＫＦＬＡＰ（配列番号７）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＶＬＷＹＳＮＲＷＶ（配列番号８）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含む。

【００８４】

本開示の一部の態様では、ＶＨ１は、配列番号９のアミノ酸配列を含む。本開示の一部の態様では、ＶＬ１は、配列番号１０のアミノ酸配列を含む。本開示の具体的な態様では、ｓｃＦｖは、配列番号１１（これは配列番号９及び１０を含む）のアミノ酸配列を含む。

【００８５】

本開示の一部の態様では、ＶＨ１は、配列番号９と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。本開示の一部の態様では、ＶＬ１は、配列番号１０と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００８６】

本開示の一部の態様では、第１のポリペプチド一本鎖可変断片は、（ｉ）アミノ酸配列ＫＹＡＭＮ（配列番号３）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号４）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＩＳＹＷＡＹ（配列番号５）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）を含み、配列番号９と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の重鎖可変

ドメインを含む。
【００８７】
本開示の一部の態様では、ＶＬ１は、（ｉ）アミノ酸配列ＧＳＳＴＧＡＶＴＳＧＮＹＰＮ（配列番号６）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＫＦＬＡＰ（配列番号７）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＶＬＷＹＳＮＲＷＶ（配列番号８）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む、アミノ酸配列を含み、ここで、ＶＬ１のアミノ酸配列は、配列番号１０と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である。
【００８８】
一部の態様では、ＶＨ１が、（ｉ）アミノ酸配列ＫＹＡＭＮ（配列番号３）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号４）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＩＳＹＷＡＹ（配列番号５）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含み、ＶＬ１が、（ｉ）アミノ酸配列ＧＳＳＴＧＡＶＴＳＧＮＹＰＮ（配列番号６）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＫＦＬＡＰ（配列番号７）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＶＬＷＹＳＮＲＷＶ（配列番号８）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む場合、ＭＭ１は、配列番号１のアミノ酸配列を含む。
【００８９】
代替の態様では、一本鎖可変断片は、（ｉ）アミノ酸配列ＴＹＡＭＮ（配列番号１２８）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号１２９）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＶＳＷＦＡＹ（配列番号１３０）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）、ならびに（ｉ）アミノ酸配列ＲＳＳＴＧＡＶＴＴＳＮＹＡＮ（配列番号１３１）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＮＫＲＡＰ（配列番号１３２）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＡＬＷＹＳＮＬＷＶ（配列番号１３３）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含む。
【００９０】
本開示のこれらの態様のうちの一部において、ＶＨ１は、配列番号１３４のアミノ酸配列を含む。本開示のある特定の態様では、ＶＬ１は、配列番号１３５のアミノ酸配列を含む。本開示の具体的な態様では、ｓｃＦｖは、配列番号１２２（これは配列番号１３４及び１３５を含む）のアミノ酸配列を含む。
【００９１】
本開示の一部の態様では、ＶＨ１は、配列番号１３４と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。本開示の一部の態様では、ＶＬ１は、配列番号１３５と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。
【００９２】
本開示の一部の態様では、第１のポリペプチド一本鎖可変断片は、（ｉ）アミノ酸配列ＴＹＡＭＮ（配列番号１２８）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号１２９）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＶＳＷＦＡＹ（配列番号１３０）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）を含み、配列番号１３５と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一の重鎖可変ドメインを含む。
【００９３】

本開示の一部の態様では、ＶＬ１は、（ｉ）アミノ酸配列ＲＳＳＴＧＡＶＴＴＳＮＹＡＮ（配列番号１３１）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＮＫＲＡＰ（配列番号１３２）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＡＬＷＹＳＮＬＷＶ（配列番号１３３）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む、アミノ酸配列を含み、ここで、ＶＬ１のアミノ酸配列は、配列番号１３５と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である。

【００９４】

これらの態様のうちの一部において、ＶＨ１が、（ｉ）アミノ酸配列ＴＹＡＭＮ（配列番号１２８）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号１２９）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＶＳＷＦＡＹ（配列番号１３０）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含み、ＶＬ１が、（ｉ）アミノ酸配列ＲＳＳＴＧＡＶＴＴＳＮＹＡＮ（配列番号１３１）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＮＫＲＡＰ（配列番号１３２）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＡＬＷＹＳＮＬＷＶ（配列番号１３３）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む場合、ＭＭ１は、配列番号７２のアミノ酸配列を含む。

【００９５】

ＥＧＦＲ標的化ドメインは、ＶＨ２（第１のポリペプチド内に配置される）及びＶＨ１（第２のポリペプチド内に配置される）を含む。ＶＨ２は、可変重鎖ＣＤＲ１（ＶＨ　ＣＤＲ１、本明細書でＣＤＲＨ１とも称される）、可変重鎖ＣＤＲ２（ＶＨ　ＣＤＲ２、本明細書でＣＤＲＨ２とも称される）、及び可変重鎖ＣＤＲ３（ＶＨ　ＣＤＲ３、本明細書でＣＤＲＨ３とも称される）を含み、ＶＬ２は、可変軽鎖ＣＤＲ１（ＶＬ　ＣＤＲ１、本明細書でＣＤＲＬ１とも称される）、可変軽鎖ＣＤＲ２（ＶＬ　ＣＤＲ２、本明細書でＣＤＲＬ２とも称される）、及び可変軽鎖ＣＤＲ３（ＶＬ　ＣＤＲ３、本明細書でＣＤＲＬ３とも称される）を含む。

【００９６】

本開示の一部の態様では、ＥＧＦＲ標的化重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）は、（ｉ）アミノ酸配列ＮＹＧＶＨ（配列番号１５）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＶＩＷＳＧＧＮＴＤＹＮＴＰＦＴＳ（配列番号１６）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＡＬＴＹＹＤＹＥＦＡＹ（配列番号１７）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む。

【００９７】

本開示の一部の態様では、ＶＨ２は、（ｉ）アミノ酸配列ＮＹＧＶＨ（配列番号１５）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＶＩＷＳＧＧＮＴＤＹＮＴＰＦＴＳ（配列番号１６）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＡＬＴＹＹＤＹＥＦＡＹ（配列番号１７）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含み、ここで、ＶＨ２のアミノ酸配列は、配列番号２１と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である。

【００９８】

本開示の一部の態様では、ＶＨ２は、配列番号２１のアミノ酸配列を含む。

【００９９】

本開示のある特定の具体的な態様では、活性化可能なＨＢＰＣは、配列番号１のアミノ酸配列を有するＭＭ１；配列番号３のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号４のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び配列番号５のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３を有するＶＨ１；配列番号６のアミノ酸配列を有するＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号８のアミノ酸配列を有するＶＬ　ＣＤＲ３を有するＶＬ１；ならびに配列番号１５のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号１７のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含むＶＨ２を含む、第１のポリペプチドを含む。これらの活性化可能なＨＢＰＣのうちの一部において、第２のポリペプチドは、配列番号１３のアミノ酸配列を有する

ＭＭ２、ならびに配列番号１８のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含むＶＬ２を含む。

【０１００】

本開示の別の具体的な態様では、活性化可能なＨＢＰＣは、配列番号７２のアミノ酸配列を有するＭＭ１；配列番号１２８のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号１２９のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び配列番号１３０のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３を有するＶＨ１；配列番号１３１のアミノ酸配列を有するＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号１３２のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号１３３のアミノ酸配列を有するＶＬ　ＣＤＲ３を有するＶＬ１；ならびに配列番号１５のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号１７のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含むＶＨ２を含む、第１のポリペプチドを含む。これらの活性化可能なＨＢＰＣのうちの一部において、第２のポリペプチドは、配列番号１３のアミノ酸配列を有するＭＭ２、ならびに配列番号１８のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含むＶＬ２を含む。

【０１０１】

上述したように、第１のポリペプチドは、単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）をさらに含む。当該技術分野で既知のＦｃドメインが、本開示の活性化可能なＨＢＰＣにおいて使用するのに好適であり、本明細書の下記により詳細に記載される。

【０１０２】

本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、Ｆｃ１は、配列番号２３と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の態様では、Ｆｃ１は、配列番号２３のアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、Ｆｃ１は、配列番号２４のアミノ酸配列を含む。

【０１０３】

本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの一部の態様では、第１のポリペプチドは、ＶＨ２とＦｃ１との間に配置された重鎖ＣＨ１ドメインをさらに含む。

【０１０４】

本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの一部の態様では、第１のポリペプチドは、ＶＨ２とＦｃ１との間に配置された免疫グロブリンヒンジ領域をさらに含む。ＣＨ１ドメインが存在する、一部の態様では、免疫グロブリンヒンジ領域は、ＣＨ１ドメインとＦｃ１ドメインとの間に配置される。

【０１０５】

本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの一部の態様では、第１のポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシ末端に、
ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ－ＶＨ２－ＣＨ１－ヒンジ領域－Ｆｃ１の構造配置を含み、構造中、各「－」は独立して、直接的連結または間接的（例えば、リンカーを介した）連結である。

【０１０６】

本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの一部の態様では、第１のポリペプチドは、本明細書の下記により詳細に記載される、１つまたは複数の任意選択的なリンカーをさらに含む。

【０１０７】

本開示の一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣは、配列番号２３または配列番号２４に定められるアミノ酸配列を有するＦｃ１を含む、第１のポリペプチドを含む。本開示の一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣ

は、ヒンジ－１（配列番号３４）またはヒンジ－２（配列番号３５）の配列を有するヒンジ領域を含む、第１のポリペプチドを含む。

【０１０８】

本開示の一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドは、ＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含むＥＧＦＲ標的化軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）を含む、第２のポリペプチドを含む。

【０１０９】

一部の態様では、本開示は、（ｉ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＳＩＧＴＮＩＨ（配列番号１８）を含むＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＹＡＳＥＳＩＳ（配列番号１９）を含むＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＱＱＮＮＮＷＰＴＴ（配列番号２０）を含むＣＤＲ３を含む、ＥＧＦＲ標的化軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）を含む、第２のポリペプチドを含む、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣを提供する。

【０１１０】

本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、第２のポリペプチドは、配列番号２２のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を有するＶＬ２を含む。

【０１１１】

本開示の一部の態様では、ＶＬ２は、配列番号２２に定められるアミノ酸配列を含む。

【０１１２】

本開示の上述の態様のうちのある特定のものにおいて、ＭＭ２は、配列番号１３のアミノ酸配列を含む。

【０１１３】

本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、第２のポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシ末端に、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２の構造配置を含み得、構造中、各「－」は独立して、直接的連結または間接的（例えば、リンカーを介した）連結である。

【０１１４】

本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの一部の態様では、第２のポリペプチドは、１つまたは複数のリンカーを含む。一部の態様では、ＭＭ２は、リンカーを介してＣＭ２に連結される。

【０１１５】

一部の態様では、本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの第２のポリペプチドは、約１～約２０個のアミノ酸を含むリンカーをさらに含む。本開示において使用するのに好適なリンカーは、下記でより詳細に考察される。

【０１１６】

一部の態様では、第２のポリペプチドは、定常軽鎖ドメイン（ＣＬ）をさらに含む。例となるＣＬには、当該技術分野で知られているもののうちのいずれも含まれる。一部の態様では、第２のポリペプチドは、配列番号２５のアミノ酸配列を有するＣＬを含む。これらの態様のうちのある特定のものにおいて、第２のポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシ末端に、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２－ＣＬの構造配置を含み、構造中、各「－」は独立して、直接的連結または間接的（例えば、リンカーを介した）連結である。

【０１１７】

一部の態様では、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣの第３のポリペプチドは、単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）を含み、免疫グロブリン可変ドメインを含まない。

【０１１８】

一部の態様では、本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣは、アミノ末端からカルボキシ末端に、ヒンジ領域－Ｆｃ２の構造配置を含む、第３のポリペプチドを含み、構造中、各「－」は独立して、直接的連結または間接的（例えば、リ

ンカーを介した）連結である。一部の態様では、第３のポリペプチドは、配列番号２８（任意選択でＣ末端リジンを有する、すなわち配列番号２９）を含むアミノ酸配列を有するＦｃ２を含む。一態様では、第３のポリペプチドは、配列番号３５のアミノ酸配列を含むヒンジ及び配列番号２８（任意選択でＣ末端リジンを有する、すなわち配列番号２９）のアミノ酸配列を含むＦｃ２を含む。ある特定の態様では、第１のポリペプチドは、配列番号３４のアミノ酸配列を含むヒンジ及び配列番号２３（任意選択でＣ末端リジンを有する、すなわち配列番号２４）のアミノ酸配列を含むＦｃ１を含む。

【０１１９】

上記に規定されるように、一部の態様では、第３のポリペプチドは、例えば、ヒンジ領域と第２のＦｃドメインとの間に、リンカーを含み得る。リンカーは、本明細書で考察されるリンカーのうちのいずれも含み得る。

【０１２０】

本開示の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣは、切断可能な部分がプロテアーゼによって切断されるときに活性化され、それによって、ＥＧＦＲ及びＣＤ３に結合することができる活性化された（すなわち、マスクされていない）抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）が生成される。比較すると、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣは、活性化可能なＨＢＰＣが腫瘍環境におけるプロテアーゼによって活性化されるまでマスクされたままであるため、活性化されたヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドと比較してＥＧＦＲ及びＣＤ３への結合の大幅な低減を示す。理論または機構に拘束されることを望むものではないが、健常組織における典型的なプロテアーゼ活性レベルは、内在性インヒビターの存在及び／またはプロテアーゼに不利なｐＨ条件に起因して低減されている可能性が高い一方で、腫瘍環境内ではプロテアーゼ活性は、プロテアーゼ発現の上方制御、チモーゲンの活性化、インヒビター発現の下方調節、またはこれらの効果の組み合わせを介して一般に上方制御される（Ｄｅｓｎｏｙｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＳｃｉｅｎｃｅＴｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌＭｅｄｉｃｉｎｅ．ｏｒｇ，ｖｏｌ．５，Ｉｓｓｕｅ　２０７（Ｏｃｔｏｂｅｒ　２０１３）（参照により本明細書に援用される）を参照されたい）。

【０１２１】

したがって、これらの活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣは、腫瘍微小環境におけるタンパク質分解活性が正常組織と比べて上方制御され、正常組織においては制御される、がんを有する対象の処置において有用であり得る。正常組織における活性化可能なＨＢＰＣによるＥＧＦＲ及びＣＤ３への結合の大幅な低減は、腫瘍の外側での抗ＥＧＦＲ及び抗ＣＤ３への結合に関連する副作用の低減を可能にし得る。一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣは、第１のＣＭ及び第２のＣＭ（それぞれＣＭ１及びＣＭ２）を含む。

【０１２２】

一部の態様では、ＣＭは、腫瘍細胞において上方制御されるプロテアーゼのための基質を含む。本明細書に開示されるＨＢＰＣの一部の態様では、ＣＭは、腫瘍細胞において上方制御される２つ以上のプロテアーゼ（すなわち、第１のプロテアーゼ、第２のプロテアーゼ、第３のプロテアーゼ等）のための基質を含んでもよい。いくつかのがん、例えば、液状腫瘍または固形腫瘍においてプロテアーゼのレベルが増加しているという文献の報告が存在する。例えば、Ｌａ　Ｒｏｃｃａ　ｅｔ　ａｌ，（２００４）Ｂｒｉｔｉｓｈ　Ｊ．ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ　９０（７）：１４１４－１４２１を参照されたい。多数の研究が、固形腫瘍における異常なプロテアーゼレベル、例えば、ｕＰＡ、レグマイン、ＭＴ－ＳＰ１、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）の相関関係を実証している（例えば、Ｍｕｒｔｈｙ　Ｒ　Ｖ，ｅｔ　ａｌ．“Ｌｅｇｕｍａｉｎ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｉｎ　ｒｅｌａｔｉｏｎ　ｔｏ　ｃｌｉｎｉｃｏｐａｔｈｏｌｏｇｉｃ　ａｎｄ　ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｖａｒｉａｂｌｅｓ　ｉｎ　ｃｏｌｏｒｅｃｔａｌ　ｃａｎｃｅｒ，”Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１１（２００５）：２２９３－２２９９、Ｎｉｅｌｓｅｎ　Ｂ　Ｓ，ｅｔ　ａｌ．“Ｕｒｏｋｉｎａｓｅ　ｐｌａｓｍｉｎｏｇｅｎ　ａｃｔｉｖａｔｏｒ

ｉｓ ｌｏｃａｌｉｚｅｄ ｉｎ ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｄｕｃｔａｌ ｂｒｅａｓｔ ｃａｎｃｅｒ，”Ｌａｂ Ｉｎｖｅｓｔ ８１（２００１）：１４８５－１５０１、Ｌｏｏｋ Ｏ Ｒ，ｅｔ ａｌ．“Ｉｎ ｓｉｔｕ ｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｇｅｌａｔｉｎｏｌｙｔｉｃ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｉｎ ｔｈｅ ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｍａｔｒｉｘ ｏｆ ｍｅｔａｓｔａｓｅｓ ｏｆ ｃｏｌｏｎ ｃａｎｃｅｒ ｉｎ ｒａｔ ｌｉｖｅｒ ｕｓｉｎｇ ｑｕｅｎｃｈｅｄ ｆｌｕｏｒｏｇｅｎｉｃ ＤＱ－ｇｅｌａｔｉｎ，”Ｊ Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．５１（２００３）：８２１－８２９を参照されたい）。ＣＭは、複数のプロテアーゼのための基質、例えば、セリンプロテアーゼ及び第２の異なるプロテアーゼ、例えば、ＭＭＰのための基質を含んでもよい。一部の態様では、ＣＭは、１つよりも多くのセリンプロテアーゼ、例えば、マトリプターゼ及び／またはｕＰＡのための基質を含んでもよい。一部の態様では、ＣＭは、１つよりも多くのＭＭＰ、例えば、ＭＭＰ９及びＭＭＰ１４のための基質を含んでもよい。

【０１２３】

ある特定の実施形態では、ＣＭ１及びＣＭ２は各々独立して、下記の表１に定められるプロテアーゼのための基質であるアミノ酸配列を含む。

【表１】

表１．例となるプロテアーゼ

ADAMS、ADAMTS、例えば、	システインプロテイナーゼ、例えば、	セリンプロテアーゼ、例えば、
ADAM8	クルジパイン	活性化プロテイン C
ADAM9	レグマイン	カテプシン A
ADAM10	オツバイン-2	カテプシン G
ADAM12		キマーゼ
ADAM15	KLK、例えば、	凝固因子プロテアーゼ
ADAM17/TACE	KLK4	(例えば、FVIIa、FIXa、FXa、
ADAMDEC1	KLK5	FXIa、FXIIa)
ADAMTS1	KLK6	エラスターゼ
ADAMTS4	KLK7	グランザイム B
ADAMTS5	KLK8	グアニジノベンゾアターゼ
	KLK10	HtrA1
アスパラギン酸プロテアーゼ、例えば、	KLK11	ヒト好中球エラスターゼ
BACE	KLK13	ラクトフェリン
レニム	KLK14	マラプシン
		NS3/4A
アスパラギン酸カテプシン、例えば、	メタロプロテイナーゼ、例えば、	PACE4
カテプシン D	メプリン	プラスミン
カテプシン E	ネプリライシン	PSA
	PSMA	tPA
カスパーゼ、例えば、	BMP-1	トロンビン
カスパーゼ 1		トリプターゼ
カスパーゼ 2	MMP、例えば、	uPA
カスパーゼ 3	MMP1	
カスパーゼ 4	MMP2	II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ(TTSP)、例えば、
カスパーゼ 5	MMP3	
カスパーゼ 6	MMP7	DESC1
カスパーゼ 7	MMP8	DPP-4
カスパーゼ 8	MMP9	FAP
カスパーゼ 9	MMP10	ヘプシン
カスパーゼ 10	MMP11	マトリプターゼ-2
カスパーゼ 14	MMP12	MT-SP1/マトリプターゼ
	MMP13	TMPRSS2
システィンカテプシン、例えば、	MMP14	TMPRSS3
カテプシン B	MMP15	TMPRSS4
カテプシン C	MMP16	
カテプシン K	MMP17	
カテプシン L	MMP20	
カテプシン S	MMP23	
カテプシン V/L2	MMP24	
カテプシン X/Z/P	MMP26	
	MMP27	

【０１２４】

本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの一部の態様では、ＣＭ１及び／またはＣＭ２は、約３個のアミノ酸～約１５個のアミノ酸を含む。一部の態様では、ＣＭ１及び／またはＣＭ２は、２つ以上の切断部位を含んでもよい。一部の態様では、ＣＭ１上の２つ以上の切断部位は、１つのプロテアーゼのための基質を含んでもよい。一部の態様では、ＣＭ２上の２つ以上の切断部位は、２つ以上のプロテアーゼのための基質を含んでもよい。一部の態様では、第１のプロテアーゼ及び第２のプロテアーゼは、同じプロテアーゼである。一部の態様では、ＣＭ１及びＣＭ２は、同じプロテアーゼのための異なる基質を含む。一部の態様では、ＣＭ１及びＣＭ２は、同じアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ＣＭ１及びＣＭ２は、異なるアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ＣＭ１は、配列番号７３のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ＣＭ１は、配列番号２のアミノ酸配列を含む。一部の態様では、ＣＭ２は、配列番号１４のアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣは、配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＭ１及び配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＭ２を含む。一部の態様では、本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体は、配列番号７３のアミノ酸配列を含むＣＭ１及び配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＭ２を含む。

【０１２５】

本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣにおいて使用するのに好適である例となるＣＭには、当該技術分野で既知のＣＭが含まれる。例となるＣＭには、例えば、表２、ならびに国際公開第ＷＯ２００９／０２５８４６号、同第ＷＯ２０１０／０８１１７３号、同第ＷＯ２０１５／０１３６７１号、同第ＷＯ２０１５／０４８３２９号、同第ＷＯ２０１５／１１６９３３号、同第ＷＯ２０１６／０１４９７４号、及び同第ＷＯ２０１６／１１８６２９号（同文献の各々は参照によりその全体が本明細書に援用される）に記載されるものが含まれるが、これらに限定されない。

【０１２６】

一部の態様では、ＣＭ１及び／またはＣＭ２は、下記の表２に定められるアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、ＣＭ１及びＣＭ２は各々独立して、下記の表２に定められるアミノ酸配列を含む。

【表２】

表２．切断可能な部分

CM配列番号	CM配列
2	GLSGRSDDH
14	ISSGLLSGRSDQH
73	LSGRSDDH
74	ISSGLLSGRSDQH
75	LSGRSDNH
76	TSTSGRSANPRG
77	VHMPLGFLGP
78	AVGLLAPP
79	QNQALRMA
80	ISSGLLSS
81	ISSGLLSGRSDNH
82	LSGRSGNH
83	LSGRSDIH
84	LSGRSDQH
85	LSGRSDTH
86	LSGRSDYH
87	LSGRSDNP
88	LSGRSANP
89	LSGRSANI
90	LSGRSDNI
91	ISSGLLSGRSANPRG
92	AVGLLAPPTSGRSANPRG
93	AVGLLAPPSGRSANPRG
94	ISSGLLSGRSDDH
95	ISSGLLSGRSDIH
96	ISSGLLSGRSDTH
97	ISSGLLSGRSDYH
98	ISSGLLSGRSDNP
99	ISSGLLSGRSANP
100	ISSGLLSGRSANI
101	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
102	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
103	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
104	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
105	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
106	AVGLLAPPGGLSGRSDNP

107	AVGLLAPPGGLSGRSANP
108	AVGLLAPPGGLSGRSANI
109	ISSGLLSGRSDNI
110	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
111	ISSGLLSGRSGNH
146	ALAHGLF
147	APRSALAHGLF
148	ISSGLLSGRSNI
149	LSGRSNI

【０１２７】
本開示の一部の態様では、活性化可能なＨＢＰＣが、（ｉ）アミノ酸配列ＫＹＡＭＮ（配列番号３）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号４）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及びアミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＩＳＹＷＡＹ（配列番号５）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）、ならびにアミノ酸配列ＧＳＳＴＧＡＶＴＳＧＮＹＰＮ（配列番号６）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、アミノ酸配列ＧＴＫＦＬＡＰ（配列番号７）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及びアミノ酸配列ＶＬＷＹＳＮＲＷＶ（配列番号８）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む、ＶＬ１を含む場合、ＣＭ１は、配列番号２のアミノ酸配列を含む。これらの活性化可能なＨＢＰＣのうちのある特定のものにおいて、ＭＭ１は、配列番号１のアミノ酸配列を含む。
【０１２８】
本開示の一部の態様では、活性化可能なＨＢＰＣが、（ｉ）アミノ酸配列ＫＹＡＭＮ（配列番号３）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号４）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及びアミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＩＳＹＷＡＹ（配列番号５）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む、重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）、ならびにアミノ酸配列ＧＳＳＴＧＡＶＴＳＧＮＹＰＮ（配列番号６）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、アミノ酸配列ＧＴＫＦＬＡＰ（配列番号７）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及びアミノ酸配列ＶＬＷＹＳＮＲＷＶ（配列番号８）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む、ＶＬ１を含む場合、ＣＭ１は、配列番号７３のアミノ酸配列を含む。これらの活性化可能なＨＢＰＣのうちのある特定のものにおいて、ＭＭ１は、配列番号１のアミノ酸配列を含む。これらの活性化可能なＨＢＰＣのうちの一部において、ＭＭ１は、配列番号１のアミノ酸配列を含み、ＣＭ１は、配列番号７３のアミノ酸配列を含む。
【０１２９】
本開示の具体的な態様では、活性化可能なＨＢＰＣは、
（ａ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）、第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）、及び第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、第１のマスキング部分（ＭＭ１）、第１の切断可能な部分（ＣＭ１）、ならびに第１のＦｃドメイン（Ｆｃ１）を含む、第１のポリペプチドであって、
該ＶＨ１が、
（ｉ）アミノ酸配列ＫＹＡＭＮ（配列番号３）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、
（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号４）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び
（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＩＳＹＷＡＹ（配列番号５）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含み、
該ＶＬ１が、
（ｉ）アミノ酸配列ＧＳＳＴＧＡＶＴＳＧＮＹＰＮ（配列番号６）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、

（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＫＦＬＡＰ（配列番号７）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び
（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＶＬＷＹＳＮＲＷＶ（配列番号８）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含み、
該ＶＨ２が、
（ｉ）アミノ酸配列ＮＹＧＶＨ（配列番号１５）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、
（ｉｉ）アミノ酸配列ＶＩＷＳＧＧＮＴＤＹＮＴＰＦＴＳ（配列番号１６）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び
（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＡＬＴＹＹＤＹＥＦＡＹ（配列番号１７）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む、該第１のポリペプチドと、
（ｂ）第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）及び第２のマスキング部分（ＭＭ２）及び第２の切断可能な部分（ＣＭ２）を含む、第２のポリペプチドであって、
該ＶＬ２が、
（ｉ）ＲＡＳＱＳＩＧＴＮＩＨ（配列番号１８）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、
（ｉｉ）ＹＡＳＥＳＩＳ（配列番号１９）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び
（ｉｉｉ）ＱＱＮＮＮＷＰＴＴ（配列番号２０）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む、該第２のポリペプチドと、
（ｃ）第２のＦｃドメイン（Ｆｃ２）を含む第３のポリペプチドと、を含み、
該Ｆｃ１は、Ｆｃ２に結合し、
該ＶＨ１及び該ＶＬ１は一緒に、ＣＤ３ポリペプチドに特異的に結合する標的化ドメインを形成し、
該ＶＨ２及び該ＶＬ２は一緒に、ＥＧＦＲに特異的に結合する標的化ドメインを形成し、
該第３のポリペプチドは、免疫グロブリン可変ドメインを含まず、
該ＭＭ１は、第１の標的化ドメインが第１の標的に結合することを妨害するペプチドであり、
該ＭＭ２は、第２の標的化ドメインが第２の標的に結合することを妨害するペプチドであり、
該ＣＭ１及び該ＣＭ２は各々独立して、プロテアーゼのための基質を含み、該第３のポリペプチドは、免疫グロブリン可変ドメインを含まない。本開示のある特定の態様では、ＶＨ１及びＶＬ１は、ｓｃＦｖ内に配置される。これらの態様のうちの一部において、ＭＭ１は、配列番号１を含み、ＣＭ１は、配列番号７３を含み、ＭＭ２は、配列番号１３を含み、ＣＭ２は、配列番号１４を含む。これらの態様のうちの一部において、第２のポリペプチドは、定常軽鎖ドメイン（ＣＬ）をさらに含み、第３のポリペプチドは、ヒンジ（ＨＲ）をさらに含む。

【０１３０】

本開示の一部の態様では、活性化可能なＨＢＰＣが、（ｉ）アミノ酸配列ＴＹＡＭＮ（配列番号１２８）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号１２９）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及びアミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＶＳＷＦＡＹ（配列番号１３０）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む、ＶＨ１、ならびに（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＳＳＴＧＡＶＴＴＳＮＹＡＮ（配列番号１３１）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、アミノ酸配列ＧＴＮＫＲＡＰ（配列番号１３２）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、ＡＬＷＹＳＮＬＷＶ（配列番号１３３）のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む、ＶＬ１を含む場合、ＣＭ１は、配列番号７３のアミノ酸配列を含む。これらの活性化可能なＨＢＰＣのうちの一部において、ＭＭ１は、配列番号７２のアミノ酸配列を含む。

【０１３１】

上述の活性化可能なＨＢＰＣのうちの一部において、第１のポリペプチドは、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ１、配列番号１６のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ２、配列番号１７のアミノ酸配列を含むＶＨ　ＣＤＲ３を有する、ＶＨ２をさらに含む。これらの活性化可能なＨＢＰＣのうちのある特定のものにおいて、第２のポリペプチドは、配列番号１８のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ１、配列番号１９のアミノ酸配列

を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む、ＶＬ２を含む。これらのＨＢＰＣのうちの一部において、第３のポリペプチドは、配列番号２８のアミノ酸配列を含む（かつ免疫グロブリン可変ドメインを含まない）。

【０１３２】

本開示の具体的な態様では、活性化可能なＨＢＰＣは、

（ｉ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）、第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）、及び第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、第１のマスキング部分（ＭＭ１）、第１の切断可能な部分（ＣＭ１）、ならびに第１のＦｃドメイン（Ｆｃ１）を含む、第１のポリペプチドであって、

該ＶＨ１が、

（ｉ）アミノ酸配列ＴＹＡＭＮ（配列番号１２８）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、

（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号１２９）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、

（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＶＳＷＦＡＹ（配列番号１３０）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含み、

該ＶＬ１が、

（ｉ）アミノ酸配列ＲＳＳＴＧＡＶＴＴＳＮＹＡＮ（配列番号１３１）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、

（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＮＫＲＡＰ（配列番号１３２）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び

（ｉｉｉ）ＡＬＷＹＳＮＬＷＶ（配列番号１３３）のアミノ酸配列を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含み、

該ＶＨ２が、

（ｉｉ）アミノ酸配列ＮＹＧＶＨ（配列番号１５）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、

（ｉｉ）アミノ酸配列ＶＩＷＳＧＧＮＴＤＹＮＴＰＦＴＳ（配列番号１６）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び

（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＡＬＴＹＹＤＹＥＦＡＹ（配列番号１７）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む、該第１のポリペプチドと、

（ｂ）第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）及び第２のマスキング部分（ＭＭ２）及び第２の切断可能な部分（ＣＭ２）を含む、第２のポリペプチドであって、該ＶＬ２が、

（ｉ）ＲＡＳＱＳＩＧＴＮＩＨ（配列番号１８）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、

（ｉｉ）ＹＡＳＥＳＩＳ（配列番号１９）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び

（ｉｉｉ）ＱＱＮＮＮＷＰＴＴ（配列番号２０）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む、該第２のポリペプチドと、

（ｃ）第２のＦｃドメイン（Ｆｃ２）を含む第３のポリペプチドと、を含み、該Ｆｃ１は、Ｆｃ２に結合し、

該ＶＨ１及び該ＶＬ１は一緒に、ＣＤ３ポリペプチドに特異的に結合する標的化ドメインを形成し、

該ＶＨ２及び該ＶＬ２は一緒に、ＥＧＦＲに特異的に結合する標的化ドメインを形成し、

該第３のポリペプチドは、免疫グロブリン可変ドメインを含まず、

該ＭＭ１は、第１の標的化ドメインが第１の標的に結合することを妨害するペプチドであり、

該ＭＭ２は、第２の標的化ドメインが第２の標的に結合することを妨害するペプチドであり、

該ＣＭ１及び該ＣＭ２は各々独立して、プロテアーゼのための基質を含み、

該第３のポリペプチドは、免疫グロブリン可変ドメインを含まない。本開示のある特定の態様では、ＶＨ１及びＶＬ１は、ｓｃＦｖ内に配置される。これらの態様のうちの一部において、ＭＭ１は、配列番号７２を含み、ＣＭ１は、配列番号７３を含み、ＭＭ２は、配列番号１３を含み、ＣＭ２は、配列番号２２を含む。これらの態様のうちの一部において、第２のポリペプチドは、定常軽鎖ドメイン（ＣＬ）をさらに含み、第３のポリペプ

チドは、ヒンジ（ＨＲ）をさらに含む。
【０１３３】
本開示の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの一部の態様では、第１のポリペプチドは、ＭＭとＣＭとの間に１つまたは複数のリンカーを含む。一部の態様では、ＭＭ１は、リンカーを介してＣＭ１に連結される。一部の態様では、第１のポリペプチドは、ＣＭ１とＶＨ２との間にリンカーを含む。ある特定の態様では、第１のポリペプチドは、ＶＨ２とＦｃ１との間にリンカーを含む。一部の態様では、第１のポリペプチドは、ＭＭ１とＣＭ１、ＣＭ１とｓｃＦｖ、ｓｃＦｖとＶＨ２、及びＶＨ２とＦｃ１からなる群から選択される一対の要素間に配置された少なくとも１つのリンカーを含む。本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣにおいて使用するのに好適なリンカーは一般に、活性化可能なポリペプチドが標的に結合することを阻害するのを容易にするために、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの柔軟性を提供するものである。かかるリンカーは、柔軟なリンカーと総称される。好適なリンカーは、容易に選択することができ、４アミノ酸～１０アミノ酸、５個のアミノ酸～９アミノ酸、６アミノ酸～８アミノ酸、または７アミノ酸～８アミノ酸を含めた、１アミノ酸（例えば、Ｇｌｙ）～２０アミノ酸、２アミノ酸～１５アミノ酸、３アミノ酸～１２アミノ酸等の、異なる長さのものであり得、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０アミノ酸長であってもよい。
【０１３４】
例となる柔軟なリンカーには、グリシンポリマー（Ｇ）ｎ、グリシン－セリンポリマー（例えば、（ＧＳ）ｎ、（ＧＳＧＧＳ）ｎ及び（ＧＧＧＳ）ｎ（それぞれ配列番号４１及び配列番号４０）（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）を含む）、グリシン－アラニンポリマー、アラニン－セリンポリマー、及び当該技術分野で既知の他の柔軟なリンカーが含まれる。グリシン及びグリシンセリンポリマーは、比較的構造不定であり、したがって構成要素間の中立のテザーとして機能することが可能であり得る。グリシンは、アラニンよりもさらに顕著に多くのｐｈｉ－ｐｓｉ空間にアクセスし、より長い側鎖を有する残基よりもはるかに制限が低い（Ｓｃｈｅｒａｇａ，Ｒｅｖ．Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ　Ｃｈｅｍ．１１１７３－１４２（１９９２）を参照されたい）。当業者であれば、ＨＢＰＣのポリペプチドが、所望の構造を可能にするためにリンカーが柔軟なリンカーと同時に柔軟性の低い構造を付与する１つまたは複数の部分を含み得るように、全体的または部分的に柔軟であるリンカーを含むように設計され得ることを認識しよう。
【０１３５】
一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣは、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び／または第３のポリペプチドに配置された１つまたは複数のリンカー配列を含む。例えば、第１のポリペプチドにおいて、リンカーは、ＭＭ１とＣＭ１との間、重鎖可変ドメインとＣＨ１ドメインとの間、ＣＨ１ドメインとヒンジ領域との間（両方とも存在する場合）、及び／またはヒンジ領域（存在する場合）と第１のＦｃドメインとの間に配置される。第２のポリペプチド（本明細書の他の箇所に記載される）において、リンカーは、例えば、ＭＭ２とＣＭ２との間、ＣＭ２と軽鎖可変ドメインとの間、及び／または軽鎖可変ドメインとＣＬとの間に存在し得る。第３のポリペプチド（本明細書の他の箇所に記載される）において、リンカーは、例えば、ＣＨ１ドメインと第２のＦｃドメインとの間、ＣＨ１ドメインとヒンジ領域との間、及びまたはヒンジ領域と第２のＦｃドメインとの間に存在し得る。
【０１３６】
本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの一部の態様では、ＭＭ１は、リンカーＬ１を介してＣＭ１に連結されている。一部の態様では、ＭＭ２は、リンカーＬ２を介してＣＭ２に連結されている。一部の態様では、Ｌ１及びＬ２のアミノ酸配列は同じである。一部の態様では、リンカーは、（ｉ）（ＧＳ）ｎ（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）、（ＧＧＳ）ｎ（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）（例えば、約１～約２０、または約１～約１０の整数）、（ＧＧＧＳ）ｎ（配列番号４０）（

配列中、ｎは少なくとも１の整数である）（例えば、約１～約２０、または約１～約１０の整数）、（ＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号１２６）（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）（例えば、約１～約２０、または約１～約１０の整数）、（ＧＳＧＧＳ）ｎ（配列番号４１）（配列中、ｎは少なくとも１の整数である）（例えば、約１～約２０、または約１～約１０の整数）、ＧＳＳＧＧＳＧＧＳＧ（配列番号１２）、ＧＧＳＧ（配列番号４２）、ＧＧＳＧＧ（配列番号４３）、ＧＳＧＳＧ（配列番号４４）、ＧＳＧＧＧ（配列番号４５）、ＧＧＧＳＧ（配列番号４６）、及びＧＳＳＳＧ（配列番号４７）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号４８）、ＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号４９）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５０）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５１）、ＧＧＧＧＳ（配列番号５２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５３）、ＧＧＧＳ（配列番号５４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号５５）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号５６）、ＧＳＳＧＧＳＧＧＳＧＧ（配列番号５７）、ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５８）、ＧＧＧＳＳＧＧＳ（配列番号１２７）、及びＧＳからなる群から選択される、グリシン－セリンベースのリンカー、ならびに（ｉｉ）ＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＳＥＧＳＴ（配列番号５９）、ＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣＰＡＰＥＦＬＧ（配列番号６０）、ＧＧＳＬＤＰＫＧＧＧＧＳ（配列番号６１）、ＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ（配列番号６２）、ＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＳ（配列番号６３）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＫＧ（配列番号６４）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＳＧＳＴＫＧ（配列番号６５）、及びＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＧＥＧＳＴＫＧ（配列番号６６）からなる群から選択される、グリシンとセリン、及びリジン、トレオニン、またはプロリンのうちの少なくとも１つを含むリンカーからなる群から選択される。

【０１３７】

本開示の一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドは、上述したものに加えた構成要素を含み得る。かかる構成要素には、スペーサーが含まれ得る。「スペーサー」という用語は、本明細書で、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び／または第３のポリペプチドの自由端にて組み込まれたアミノ酸残基またはペプチドを指す。本開示の実施において使用するのに好適であるスペーサーには、任意の単一のアミノ酸残基または任意のペプチドが含まれる。好適なスペーサーには、例えば、国際公開第ＷＯ２０１６／０１４９７４号、同第ＷＯ２０１９／０７５４０５号、及び同第ＷＯ２０１９／２１３４４４号（同文献の各々は参照によりそれらの全体が本明細書に援用される）に記載されるもののうちのいずれも含まれる。

【０１３８】

一部の態様では、スペーサーは、約１個のアミノ酸～約１０個のアミノ酸（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８、または９個のアミノ酸）またはそれらの間の任意の数を含み得る。本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの一部の態様では、スペーサーは、ＭＭ１及び／またはＭＭ２に対してＮ末端側に位置付けられる。一部の態様では、スペーサーは、ＱＧＱＳＧＳ（配列番号１１６）の配列を有する。一部の態様では、スペーサーは、ＱＧＱＳＧＱＧ（配列番号１１７）の配列を有する。一部の態様では、スペーサーは、ＱＧＱＳＧＳ（配列番号１１８）の配列を有する。一部の態様では、スペーサーは、ＱＧＱＳＧＱＧ（配列番号１１７）の配列を有する。

【０１３９】

一部の態様では、Ｆｃ１及び／またはＦｃ２として用いられるＦｃドメインは、天然Ｆｃドメイン（例えば、ヒトＩｇＧ１　ＦｃドメインまたはヒトＩｇＧ４　Ｆｃドメイン）である。本開示の一部の態様では、Ｆｃ１及び／またはＦｃ２として用いられるＦｃドメインは、天然Ｆｃアミノ酸配列の変異型である。変異は、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド（及び相応して、活性化ＨＢＰＣ）に所望の有益な特性を付与し得る。例えば、ＦｃＲｎ結合部位におけるある特定の変異は、エフェクター機能を調節することが知られている（例えば、Ｐｅｔｋｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８：１７５９－１７６９，２００６、Ｄｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＭＡｂｓ　４：１０１－１０９，２０１２、及びＯｌａｆｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅ

ｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．９０７：５３７－５５６，２０１２を参照されたい）。エフェクター機能を調節し得るＦｃドメインにおけるいずれの既知の変異の組み込も好適である。例えば、Ｆｃアミノ酸配列におけるＮ２９７ＡまたはＮ２９７Ｇ変異を用いて、ＩｇＧのエフェクター機能（例えば、ＡＤＣＣ及びＣＤＣ）を低減してもよく、これにより標的非依存的毒性が低減され得る（例えば、Ｌｕｎｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９：３５－３９，１９９２を参照されたい）。本開示の関連において使用するのに好適なＦｃドメインには、例えば、ノブ・イン・ホール等といった、いずれの既知のヘテロ二量体Ｆｃも含むがこれらに限定されない、当該技術分野で既知の任意のＦｃドメインが含まれる。

【０１４０】

一部の態様では、本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣは、免疫グロブリンヒンジ領域をさらに含む。好適なヒンジ領域には、いずれの既知のヒンジ領域も含まれる。例えば、免疫グロブリンの５つの主要なクラス：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭ、またはそれらのサブクラス（アイソタイプ）（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）のうちのいずれからのヒンジ領域も、本開示において使用するのに好適である。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なる周知のサブユニット構造及び３次元配置を有する。

【０１４１】

一部の態様では、第１のポリペプチドのＦｃ１及び第３のポリペプチドのＦｃ２のヒンジ領域は、同じ配列を含む。一部の態様では、本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの第１のＦｃドメイン及び第２のＦｃドメイン（それぞれＦｃ１及びＦｃ２）は、ＩｇＧ１　ＦｃドメインもしくはＩｇＧ４　Ｆｃドメイン（例えば、ヒトＩｇＧ１　ＦｃドメインまたはヒトＩｇＧ４　Ｆｃドメイン）、またはそのバリアントである。一部の態様では、Ｆｃ１及び／またはＦｃ２は、天然（例えば、ヒト）ＩｇＧ１　Ｆｃドメインの修飾バリアントである。一部の態様では、Ｆｃ１及び／またはＦｃ２は、天然（例えば、ヒト）ＩｇＧ４　Ｆｃドメインの修飾バリアントである。

【０１４２】

本明細書に記載の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの一部の態様では、Ｆｃ１は、配列番号２３と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の態様では、Ｆｃ１は、配列番号２３（任意選択でＣ末端リジンを有する（すなわち配列番号２４））のアミノ酸配列を含む。

【０１４３】

一部の態様では、第３のポリペプチドは、Ｆｃ１に結合する単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）をさらに含む。一部の態様では、Ｆｃ２は、配列番号２８と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。一部の態様では、Ｆｃ２は、配列番号２８（任意選択で末端リジンを有する（すなわち配列番号２９））を含む。

【０１４４】

一部の態様では、第３のポリペプチドは、配列番号３４及び３５からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するヒンジ領域を含む。

【０１４５】

本明細書の他の箇所で提供されるように、本明細書に開示される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの形式または構造は、リンカー及びスペーサーを含めた、任意の数の任意選択的な追加の構成要素を含み得る。例にすぎないが、下記に定められる構造が、企図される態様の中にある。しかしながら、下記に示される態様は、本開示をいかようにも限定することを意図するものではない。

【０１４６】

一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドは、構造（Ｉ）を有する第１のポリペプチドを含む。
第１のポリペプチド構造（Ｉ）：
（Ｓ１）－ＭＭ１－（Ｌ１）－ＣＭ１－Ｌ２－ＶＨ１－Ｌ３－ＶＬ１－（Ｌ４）－ＶＨ２－（Ｌ５）－（ＣＨ１１）－（Ｌ６）－（ヒンジ１）－（Ｌ７）－Ｆｃ１
構造中、
・（Ｓ１）は、任意選択的なスペーサーであり、
・（Ｌ１）、（Ｌ４）、（Ｌ５）、（Ｌ６）、及び（Ｌ７）は各々独立して、任意選択的なリンカーであり、
・Ｌ２及びＬ３は、リンカーであり、
・（ＣＨ１１）は、任意選択的なＣＨ１ドメインであり、
・（ヒンジ１）は、任意選択的なヒンジ領域であり、
・Ｆｃ１は、本明細書で上述した通りである。

【０１４７】

一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドは、構造（ＩＩ）を有する第２のポリペプチドを含む。
第２のポリペプチド構造（ＩＩ）：
（Ｓ２）－（Ｌ８）－ＭＭ２－（Ｌ９）－ＣＭ２－（Ｌ１０）－ＶＬ２－（ＣＬ）
構造中、
・（Ｓ２）は、任意選択的なスペーサーであり、
・（Ｌ８）、（Ｌ９）、及び（Ｌ１０）は各々独立して、任意選択的なリンカーであり、
・ＭＭ２は、抗ＥＧＦＲマスキング部分であり、
・ＶＬ２は、本明細書で上述した通りであり、
・（ＣＬ）は、任意選択的な軽鎖定常ドメインである。

【０１４８】

一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドは、構造（ＩＩＩ）を有する第３のポリペプチドを含む。
第３のポリペプチド構造（ＩＩＩ）：
（Ｓ３）－（ＣＨ１２）－（Ｌ１１）－（ヒンジ２）－（Ｌ１２）－Ｆｃ２
構造中、
・（Ｓ３）は、任意選択的なスペーサーであり、
・（ＣＨ１２）は、任意選択的なＣＨ１ドメインであり、
・（Ｌ１１）及び（Ｌ１２）は各々独立して、任意選択的なリンカーであり、
・Ｆｃ２は、本明細書で上述した通りである。

【０１４９】

構造（Ｉ）、（ＩＩ）、及び（ＩＩＩ）において使用するのに好適であるリンカー、スペーサー、ＭＭ、ＣＭ、Ｆｃドメイン、ＣＨ１（すなわち、ＣＨ１１及びＣＨ１２）ドメイン、ヒンジ領域、及びＣＬには、当該技術分野で知られているまたは本明細書に記載されるいずれも含まれる。

【０１５０】

本開示の一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣは、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び第３のポリペプチドを含み、ここで、（１）第１のポリペプチドは、配列番号３０（任意選択でＣ末端リジンを有し、及び／または任意選択でスペーサーを有しない（例えば、配列番号１２０（末端リジンを有し、かつスペーサーを有しない））のアミノ酸配列を含み、（２）第２のポリペプチドは、配列番号３１（または配列番号３７（スペーサーを有しない））のアミノ酸配列を含み、（３）第３のポリペプチドは、配列番号３２（任意選択でＣ末端リジンを有する（すなわち配列番号３６））のアミノ酸配列を含む（かつ免疫グロブリン可変ドメインを含まない）。本開示の一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド

は、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び第３のポリペプチドを含み、ここで、下記の配列で規定されるように、（１）第１のポリペプチドは、配列番号１２０のアミノ酸配列を含み、（２）第２のポリペプチドは、配列番号３７のアミノ酸配列を含み、（３）第３のポリペプチドは、配列番号３２のアミノ酸配列を含む（かつ免疫グロブリン可変ドメインを含まない）。

【０１５１】

本開示の一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣは、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び第３のポリペプチドを含み、ここで、（１）第１のポリペプチドは、配列番号３０のアミノ酸配列を含み、（２）第２のポリペプチドは、配列番号３１のアミノ酸配列を含み、（３）第３のポリペプチドは、配列番号３２のアミノ酸配列からなるか、またはそれから本質的になる。本開示の一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドは、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び第３のポリペプチドを含み、ここで、下記の配列で規定されるように、（１）第１のポリペプチドは、配列番号１２０のアミノ酸配列を含み、（２）第２のポリペプチドは、配列番号３７のアミノ酸配列を含み、（３）第３のポリペプチドは、配列番号３２のアミノ酸配列からなるか、またはそれから本質的になり、免疫グロブリン可変ドメインを含まない。

【０１５２】

本開示の一部の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドは、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び第３のポリペプチドを含み、ここで、下記の配列で規定されるように、（１）第１のポリペプチドは、配列番号１４４のアミノ酸配列を含み、（２）第２のポリペプチドは、配列番号３７のアミノ酸配列を含み、（３）第３のポリペプチドは、配列番号３２のアミノ酸配列からなるか、またはそれから本質的になり、免疫グロブリン可変ドメインを含まない。

【０１５３】

下記に示される第１のポリペプチドにおいて、スペーサー配列は角括弧内にあり、マスク配列は下線が引かれ、リンカーは太字にされ（ｓｃＦｖ内のリンカーもまた斜体かつ下線付きである）、基質（すなわち、切断可能な部分）は斜体にされ、ｓｃＦｖ（ＣＤ３ポリペプチドに結合する）は斜体かつ下線付きである。

第１のポリペプチド

[QGQSGS]VSTTCWWDPPCTPNTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGGGSEVQLVESGGGLVQ
PGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD
SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG
GGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPG
TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSQVQLKQ
SGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTS RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST
YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRK

EM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKS
RW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（配列番号３０）（任意選択でＣ末端リジンを有し、及び／またはスペーサーを有しない（例えば、配列番号１３７））。一部の態様では、第１のポリペプチドは、配列番号１２０（スペーサーを有しないが、Ｃ末端リジンを有する）のアミノ酸配列または配列番号１４４（スペーサーを有せず、かつＣ末端リジンを有しない）のアミノ酸配列を有する。

【０１５４】

下記に示される第２のポリペプチドにおいて、スペーサー配列は角括弧内にあり、マスク配列は下線が引かれ、リンカーは太字にされ、基質（すなわち、切断可能な部分）は斜体にされている。

第２のポリペプチド

[QGQSGQG]LSCEGWAMNREQCRAGGGSSGGSISSGLLSGRSDQHGGGSQILLTQSPV
IL
SVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD
FTLS
INSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号３１）（任意選択でスペーサーを有しない（配列番号３７））。

【０１５５】

下記に示される第３のポリペプチドにおいて、ヒンジ領域は太字かつ下線付きであり、配列の残りの部分はＦｃ２である。

第３のポリペプチド

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YV
DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
IS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDT
TPP
VLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（配列番号３２）（任意選択でＣ末端リジンを有する（配列番号３６））。

【０１５６】

キット

本明細書では、本明細書に記載の１つまたは複数の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ＨＢＰＣまたはそのＨＢＰＣを含むキットが提供され、該キットは、診断用または処置のためのものである。ある特定の態様では、本明細書で提供される１つまたは複数の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣまたはその抗原結合断片等の、本明細書に記載の組成物の成分のうちの１つまたは複数が充填された１つまたは複数の容器、任意選択的な使用説明書を含む、パックまたはキットが本明細書で提供される。一部の態様では、キットは、本明細書に記載の組成物、及び本明細書に記載されるもの等の任意の診断剤、予防剤、または治療剤を収容する。

【０１５７】

治療的使用及び治療方法

一部の態様では、疾患、例えば、がんを処置するための方法が本明細書で提示され、該方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣもしくはそのＨＢＰＣ、または本明細書に記載されるその薬学的組成物を

投与することを含む。一部の態様では、腫瘍増殖の阻害を必要とする対象において腫瘍増殖を阻害する方法が本明細書で提示され、該方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣもしくはそのＨＢＰＣ、または本明細書に記載されるその薬学的組成物を投与することを含む。一部の態様では、本開示は、医薬として使用するための、本明細書で提供される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣもしくはそのＨＢＰＣ、または薬学的組成物に関する。通常、対象はヒトであるが、トランスジェニック哺乳動物を含めた非ヒト哺乳動物もまた処置することができる。

【０１５８】

病態の処置において有効であろう活性化可能なＨＢＰＣもしくはそのＨＢＰＣ、またはその組成物の量は、疾患の性質に依存しよう。組成物において用いられるべき正確な用量もまた、投与経路、及び疾患の重症度に依存しよう。

【０１５９】

疾患の非限定的な例としては、がん、関節リウマチ、クローン病、ＳＬＥ、心血管損傷、虚血等が挙げられる。例えば、適応症には、Ｔ細胞急性リンパ芽球性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）を含めた白血病、多発性骨髄腫を含めたリンパ芽球性疾患、ならびに肺癌、結腸直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、及びトリプルネガティブ乳癌を含む乳癌を含めた固形腫瘍が含まれ得る。例えば、適応症には、原発腫瘍の起源を問わない、がんにおける骨疾患もしくは転移；非限定的な例としてＥＲ／ＰＲ＋乳癌、Ｈｅｒ２＋乳癌、トリプルネガティブ乳癌を含めた乳癌；結腸直腸癌；子宮内膜癌；胃癌；神経膠芽腫；頭頸部扁平上皮癌等の頭頸部癌；食道癌；非限定的な例として非小細胞肺癌等の肺癌；多発性骨髄腫、卵巣癌；膵臓癌；前立腺癌；骨肉腫等の肉腫；非限定的な例として腎細胞癌等の腎臓癌；及び／または非限定的な例として扁平上皮癌、基底細胞癌、もしくは黒色腫等の皮膚癌が含まれ得る。

【０１６０】

ポリヌクレオチド

一部の態様では、本開示の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び／または第３のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド（対応して、本明細書でそれぞれ「第１のポリヌクレオチド」、「第２のポリヌクレオチド」、及び「第３のポリヌクレオチド」と称される））が本明細書で提供される。好適なポリヌクレオチドには、本明細書に記載の第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び／または第３のポリペプチド、またはそれらの一部分のうちのいずれかをコードするいずれも含まれる。第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の例示的なセットが、本明細書の下記に記載される。

【０１６１】

本開示のポリヌクレオチドは、例えば、コドン／ＲＮＡ最適化、異種シグナル配列での置換、及びｍＲＮＡ不安定性要素の排除によって、発現用に選択される宿主生物からの最適な生産のために配列最適化されてもよい。ｍＲＮＡにおいてコドン変更（例えば、遺伝コードの縮重に起因して同じアミノ酸をコードするコドン変更）を導入すること及び／または阻害領域を排除することによって、組換え発現用の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドまたはその抗原結合断片（例えば、重鎖、軽鎖、ＶＨドメイン、またはＶＬドメイン）をコードする最適化された核酸を生成するための方法は、例えば、米国特許第５，９６５，７２６号、同第６，１７４，６６６号、同第６，２９１，６６４号、同第６，４１４，１３２号、及び同第６，７９４，４９８号に記載される最適化法を適宜、適合することによって実施することができる。

核酸

第１のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（配列番号１１２）

CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGGGACCCTCCATGCACAC
CTAATACCGGCAGCTCTGGTGGCTCTGGCGGAAGCGGAGGACTGTCTGGCAGAT
CCGATGATCACGGCGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGAC

TGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTT C
AACAAATACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATG
GGTCGCCAGAATCAGAAGCAAGTACAACAACTATGCCACCTACTACGCCGACAG
CGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCT
GCAGATGAACAACCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGCGGCA
CGGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTACTGGGCCTATTGGGGCCAGGGCAC
ACTGGTCACAGTTTCTAGTGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGG
CGGAGGTTCTCAAACAGTGGTCACCCAAGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGC
GGAACCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCAGCGGCAAC T
ACCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGC
GGCACAAAGTTTCTGGCTCCCGGAACACCAGCCAGATTCAGCGGTTCTCTGCTCG
GAGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGCGTGCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGT
ACTATTGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGC
TGACAGTTCTTGGAGGTGGCGGTAGCCAGGTCCAGCTGAAACAATCTGGACCCG
GACTCGTGCAGCCAAGCCAGAGCCTGTCTATCACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAG
CCTGACCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCTCCCGGCAAGGGACTCGA
ATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGACTACAACACCCCATTCAC
CAGCAGACTGAGCATCAACAAGGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGAT
GAACTCCCTGCAGAGCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGACC T
ACTATGACTACGAGTTTGCCTACTGGGGACAGGGAACCCTCGTGACAGTGTCTG CT
GCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTCCCACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTAC
ATCCGGTGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCGAGCCA
GTGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCTGGCGTGCACACATTTCCAG
CCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCCAG
CAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAA CA
CCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACACACCT
GTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCT
CCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTG
GTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGAC
GGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACGGCAGC
ACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGC
AAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAA
ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCT C
CAAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAG
GGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAG
AACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGT
ACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCT
GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCT
GAGCCCCGGCAAA

【０１６２】

末端リジンは、遺伝子における存否にかかわらず精製タンパク質には存在しない場合がある。この例示的なポリヌクレオチドの変形形態において、Ｃ末端リジンをコードするコドンは、不在である場合がある（すなわち配列番号１３９）。

第２のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（配列番号１１３）

CAAGGCCAGTCTGGCCAAGGTCTTAGTTGTGAAGGTTGGGCGATGAATAGAGAA
CAATGTCGAGCCGGAGGTGGCTCGAGCGGCGGCTCTATCTCTTCCGGACTGCTGT
CCGGCAGATCCGACCAGCACGGCGGAGGATCCCAAATCCTGCTGACACAGTCTC CT
GTCATACTGAGTGTCTCCCCCGGCGAGAGAGTCTCTTTCTCATGTCGGGCCAG
TCAGTCTATTGGGACTAACATACACTGGTACCAGCAACGCACCAACGGAAGCCC
GCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTT

AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAAGC
GAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACTGGCCGACCACCTTTG
GCGCGGGCACCAAACTGGAACTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCA
TCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCT
GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC
CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG
CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA C
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

第２のポリペプチドはまた、配列番号１１５の配列を有するポリヌクレオチドによってもコードされる。

第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（配列番号１１４）

GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTT
CCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCC
TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTT
CAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACAAAGCCCTGCGA
GGAACAGTACGGCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA
GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCC
TGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCA
GGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCT
GACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGC
AATGGACAGCCCGAGAACAACTACGACACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGAC
GGCTCATTCTTCCTGTACAGCGACCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAG G
GCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC
CAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAA

【０１６３】

この例示的なポリヌクレオチドの変形形態において、Ｃ末端リジンをコードするコドンは、不在である場合がある（すなわち配列番号１４１）。

【０１６４】

本開示のさらなる例示的な活性化可能なＨＢＰＣは実施例１に記載され、これは、配列番号３０のアミノ酸配列（配列番号１３９または１１２（末端リジンは、遺伝子における存否にかかわらず精製タンパク質には存在しない）のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列によってコードされる）を有する第１のポリペプチド、配列番号３１のアミノ酸配列（配列番号１１３または配列番号１１５のポリヌクレオチド配列によってコードされる）を有する第２のポリペプチド、及び配列番号３２のアミノ酸配列（配列番号１１４（末端リジンは、遺伝子における存否にかかわらず精製タンパク質には存在しない）または配列番号１４１のポリヌクレオチド配列によってコードされる）を有する第３のポリペプチドを含む。

【０１６５】

実施例１に記載される本開示の別の例示的な活性化可能なＨＢＰＣにおいて、活性化可能なＨＢＰＣは、配列番号３８のアミノ酸配列（配列番号１４２または１４３（末端リジンは、遺伝子における存否にかかわらず精製タンパク質には存在しない）のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド配列によってコードされる）を有する第１のポリペプチド、配列番号３１のアミノ酸配列（配列番号１１３または配列番号１１５のポリヌクレオチド配列によってコードされる）を有する第２のポリペプチド、及び配列番号３２のアミノ酸配列（配列番号１１４（末端リジンは、遺伝子における存否にかかわらず精製タンパク質には存在しない）、または配列番号１４１（末端リジンは、遺伝子における存否にかかわらず精製タンパク質には存在しない）のポリヌクレオチド配列によってコードされる）を有する第３のポリペプチドを含む。

【０１６６】

本明細書に記載のポリペプチドもしくはその抗原結合断片またはそのドメインをコードするポリヌクレオチドは、当該技術分野で周知の方法（例えば、ＰＣＲ及び他の分子クローニング法）を使用して好適な供給源（例えば、ハイブリドーマ）に由来する核酸から生成すること、当該技術分野で周知の技法を使用して合成すること等が可能である。第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、宿主細胞における発現のため、ならびに例えば、キメラ抗体及びヒト化抗体またはその抗原結合断片を生成するためのさらなるクローニングのために、１つまたは複数のベクターにクローニングすることができる。

【０１６７】

本明細書で提供されるポリヌクレオチドは、ＲＮＡまたはＤＮＡであり得る。ＤＮＡには、ｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、及び合成ＤＮＡが含まれ、ＤＮＡは、一本鎖または二本鎖であり得る。一本鎖の場合、ＤＮＡは、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であり得る。一部の態様では、ポリヌクレオチドは、ｃＤＮＡ、すなわち１つのさらなる内在性イントロンを欠いたＤＮＡである。一部の態様では、ポリヌクレオチドは、天然に存在しないポリヌクレオチドである。一部の態様では、ポリヌクレオチドは、組換え生産される。一部の態様では、ポリヌクレオチドは、単離される。一部の態様では、ポリヌクレオチドは、実質的に純粋である。一部の態様では、ポリヌクレオチドは、天然の構成要素から精製される。

【０１６８】

一部の態様では、本明細書に記載のポリヌクレオチドは、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣまたはその抗原結合断片をコードし、本明細書で提供される重鎖（ＶＨ）及び軽鎖（ＶＬ）ならびにＣＤＲを含む。

【０１６９】

ベクター、宿主細胞、及び生産方法

本明細書では、本開示の第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び／または第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（それぞれ第１のポリヌクレオチド、第２のポリヌクレオチド、及び第３のポリヌクレオチドに対応する）を含む１つまたは複数のベクターが提供される。一部の態様では、かかるベクターを使用して、本明細書の下記にさらに詳述されるように、宿主細胞からＨＢＰＣのポリペプチドを組換え生産してもよい。一部の態様では、ベクターは、１つまたは複数のプロモーター配列に作動可能に連結された第１のポリヌクレオチド、第２のポリヌクレオチド、及び／または第３のポリヌクレオチドを含む。ある特定の態様では、本開示は、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（すなわち、第１のポリヌクレオチド、第２のポリヌクレオチド、及び第３のポリヌクレオチド）を合わせて含む複数のベクターを提供し、この場合、複数とは、第１のポリヌクレオチド、第２のポリヌクレオチド、及び第３のポリヌクレオチドのうちの２つ以下、またはわずか１つを含む少なくとも１つのベクターを含む。これらの態様では、複数のベクターにおける第１のポリヌクレオチド、第２のポリヌクレオチド、及び第３のポリヌクレオチド配列は、通常、１つまたは複数のプロモーター配列に作動可能に連結されている。

【０１７０】

本明細書ではまた、本開示の活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを組換え発現させるための、上述のポリヌクレオチド及び／またはベクターのうちのいずれかを含む組換え宿主細胞も提供される。様々な宿主発現ベクター系を利用して、本明細書に記載のポリペプチドを発現させることができる（例えば、米国特許第５，８０７，７１５号を参照されたい）。かかる宿主発現系は、目的のコード配列を生産し、その後精製することができるビヒクルに相当するが、また、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトされたときに、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合断片をインサイチュで発現することができる細胞にも相当する。上述のポリヌクレオチドのための組換え発現の宿主として使用するのに好適である、例となる宿主細胞には、哺乳類細胞系（例えば、ＣＯＳ（例えば、ＣＯＳ１またはＣＯ

Ｓ）、ＣＨＯ、ＢＨＫ、ＭＤＣＫ、ＨＥＫ　２９３、ＮＳ０、ＰＥＲ．Ｃ６、ＶＥＲＯ、ＣＲＬ７Ｏ３Ｏ、ＨｓＳ７８Ｂｓｔ、ＨｅＬａ、及びＮＩＨ　３Ｔ３、ＨＥＫ－２９３Ｔ、ＨｅｐＧ２、ＳＰ２１０、Ｒ１．１、Ｂ－Ｗ、Ｌ－Ｍ、ＢＳＣ１、ＢＳＣ４０、ＹＢ／２０、ＢＭＴ１０細胞等）が含まれる。組換え哺乳類宿主細胞の構築において用いられるベクターは、哺乳類細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳類ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス７．５Ｋプロモーター）を含んでもよい。一部の態様では、組換え宿主細胞は、ＣＨＯ細胞またはＮＳ０細胞である。

【０１７１】

一部の態様では、本明細書に記載のポリペプチド、例えば、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び／または第３のポリペプチドの組換え発現は、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣをコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を伴う。ＨＢＰＣをコードするポリヌクレオチドを含むベクター（複数可）は、当該技術分野で周知の技法を使用して、組換えＤＮＡ技術によって容易に生成することができる。当業者に周知の方法を使用して、本明細書に記載のポリペプチド、例えば、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び／または第３のポリペプチド、ならびに適切な転写及び翻訳制御シグナルをコードする１つまたは複数のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ技法、合成技法、及びインビボ遺伝子組換えが含まれる。また、プロモーターに作動可能に連結されたヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターも提供される。かかるベクターは、例えば、本明細書に記載のポリペプチド、例えば、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び／または第３のポリペプチドの定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むことができ（例えば、国際公開第ＷＯ８６／０５８０７号及び同第ＷＯ８９／０１０３６号、ならびに米国特許第５，１２２，４６４号を参照されたい）、ポリペプチドの可変ドメインをＶＨ全体、ＶＬ全体、またはＶＨ全体及びＶＬ全体の両方の発現のためにかかるベクターにクローニングすることができる。

【０１７２】

発現ベクターは、従来の技法によって細胞（例えば、宿主細胞）にトランスフェクトすることができ、次いで得られた細胞を従来の技法によって培養して、本明細書に記載のＨＢＰＣ（例えば、本明細書で提供される活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドのＣＤＲ、ＶＨ１、ＶＨ２、ＶＬ１、及びＶＬ２）を生産することができる。故に、本明細書では、宿主細胞におけるかかる配列の発現のためにプロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載のＨＢＰＣをコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞が提供される。一部の態様では、宿主細胞は、本明細書に記載のＨＢＰＣまたはそのドメインをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含有する。一部の態様では、宿主細胞は、３つの異なるベクターを含有し、第１のベクターが、本明細書に記載の第１のポリペプチドをコードする第１のポリヌクレオチドを含み、第２のベクターが、本明細書に記載の第２のポリペプチドをコードする第２のポリヌクレオチドを含み、第３のベクターが、本明細書に記載の第３のポリペプチドをコードする第３のポリヌクレオチドを含む。

【０１７３】

一部の態様では、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを合わせて含むベクターの集団が本明細書で提供され、この場合、各ベクターは、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、または第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのうちの１つまたは２つのみを含む。ある特定の態様では、第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（すなわち、それぞれ第１のポリヌクレオチド、第２のポリヌクレオチド、及び第３のポリヌクレオチド）を含む、単一のベクターが本明細書で提供される。

【０１７４】

一部の態様では、本開示は、活性化可能なＨＢＰＣを生産する方法を提供し、該方法は

、（ａ）本開示のポリペプチドをコードする１つまたは複数のポリヌクレオチド（例えば、第１のポリヌクレオチド、第２のポリヌクレオチド、及び／または第３のポリヌクレオチド、ならびに前述のポリヌクレオチドを含むベクター（複数可））を含む宿主細胞を液体培地中、活性化可能なＨＢＰＣを生産するのに十分な条件下で培養することと、（ｂ）活性化可能なＨＢＰＣを回収することと、を含む。

【０１７５】

特定の態様では、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣを生産するための方法が本明細書で提供され、該方法は、宿主細胞においてかかるそのポリペプチドを発現させることを含む。より具体的には、活性化可能なＨＢＰＣを生産する方法が本明細書で提供され、該方法は、（ａ）本開示のポリペプチドをコードする１つまたは複数のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を液体培地中、ＨＢＰＣを生産するのに十分な条件下で培養することと、（ｂ）活性化可能なＨＢＰＣを回収することと、を含む。

【０１７６】

別の態様では、該方法は、活性化可能なＨＢＰＣを含む水性組成物を、例えば、親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、セラミックハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー等といった単位操作に供することを含む、活性化可能なＨＢＰＣまたは他の工程内（ｉｎ－ｐｒｏｃｅｓｓ）組成物のバイオハーベスト（無細胞発現産物）を精製することをさらに含む。ある特定の態様では、単位操作は、セラミックハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーである。

【０１７７】

組成物

一部の態様では、本開示の活性化可能なＨＢＰＣまたはそのＨＢＰＣは、本明細書に開示される治療用途のうちのいずれかに有用な薬学的組成物において利用することができる。ある特定の態様では、薬学的組成物は、治療上有効量の１つまたは複数の活性化可能なＨＢＰＣを、薬学的に許容される希釈剤または担体と一緒に含む。他の態様では、薬学的組成物は、治療上有効量の１つまたは複数の活性化可能なＨＢＰＣ、薬学的に許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、防腐剤、及び／またはアジュバントを含む。許容される製剤材料は、用いられる投薬量及び濃度でレシピエントにとって無毒である。薬学的組成物は、液体、凍結、または凍結乾燥組成物として製剤化され得る。

【０１７８】

ある特定の態様では、薬学的組成物は、例えば、組成物のｐＨ、オスモル濃度、粘度、透明度、色、等張性、臭気、滅菌性、安定性、溶解または放出速度、吸着性または浸透性を改変、維持、または保存するための製剤材料を含有し得る。好適な製剤材料には、アミノ酸；抗菌剤；酸化防止剤；緩衝剤；増量剤；キレート剤；錯化剤；充填剤；単糖もしくは二糖等の炭水化物；タンパク質；着色剤、香味剤、及び希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン（ナトリウム等）；防腐剤；溶媒（グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール等）；糖アルコール；懸濁剤；界面活性剤もしくは湿潤剤；安定性向上剤；等張性向上剤；送達ビヒクル；及び／または医薬品アジュバントが含まれるが、これらに限定されない。薬学的組成物に組み込まれ得る好適な薬剤についての追加の詳細及び選択肢は、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，２２ｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，（Ｌｏｙｄ　Ｖ．Ａｌｌｅｎ，ｅｄ．）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｐｒｅｓｓ（２０１３）、Ａｎｓｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｄｏｓａｇｅ　Ｆｏｒｍｓ　ａｎｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｌｉｖｅｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，７ｔｈ　ｅｄ．，Ｌｉｐｐｅｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ　ａｎｄ　Ｗｉｌｋｉｎｓ（２００４）、及びＫｉｂｂｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ，３ｒｄ　ｅｄ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｐｒｅｓｓ（２０００）で提供される。

【０１７９】

薬学的組成物の構成成分は、例えば、意図される投与経路、送達形式、及び所望の投薬

量に応じて選択される。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，２２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，（Ｌｏｙｄ Ｖ．Ａｌｌｅｎ，ｅｄ．）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ（２０１３）を参照されたい。組成物は、開示される抗原結合タンパク質の物理的状態、安定性、インビボ放出速度、及びインビボクリアランス速度に影響を及ぼすように選択される。薬学的組成物中の主要なビヒクルまたは担体は、本質的に水性または非水性のいずれであることもできる。例えば、好適なビヒクルまたは担体は、注射用水または生理食塩液であり得る。ある特定の態様では、抗原結合タンパク質組成物は、所望の純度を有する選択した組成物を任意選択的な製剤化剤と混合することによって、凍結乾燥ケークまたは水溶液の形態で保管用に調製され得る。さらに、ある特定の態様では、抗原結合タンパク質は、適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として製剤化され得る。

【０１８０】

ある特定の製剤において、活性化可能なＨＢＰＣの濃度は、少なくとも２ｍｇ／ｍｌ、５ｍｇ／ｍｌ、１０ｍｇ／ｍｌ、２０ｍｇ／ｍｌ、３０ｍｇ／ｍｌ、４０ｍｇ／ｍｌ、５０ｍｇ／ｍｌ、６０ｍｇ／ｍｌ、７０ｍｇ／ｍｌ、８０ｍｇ／ｍｌ、９０ｍｇ／ｍｌ、１００ｍｇ／ｍｌ、１１０ｍｇ／ｍｌ、１２０ｍｇ／ｍｌ、１３０ｍｇ／ｍｌ、１４０ｍｇ／ｍｌ、または１５０ｍｇ／ｍｌである。他の製剤において、活性化可能なＨＢＰＣは、１０～２０ｍｇ／ｍｌ、２０～４０ｍｇ／ｍｌ、４０～６０ｍｇ／ｍｌ、６０～８０ｍｇ／ｍｌ、または８０～１００ｍｇ／ｍｌの濃度を有する。

【０１８１】

一部の組成物は、緩衝剤またはｐＨ調整剤を含む。代表的な緩衝剤には、有機酸塩（クエン酸、酢酸、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、またはフタル酸の塩等）、トリス、リン酸緩衝液、及び一部の事例では、下記に記載されるようなアミノ酸が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の態様では、緩衝剤は、組成物を生理的ｐＨまたはそれよりも若干低いｐＨ、典型的には約５～約８のｐＨ範囲内に維持するために使用される。一部の組成物は、約５～６、６～７、または７～８のｐＨを有する。他の態様では、ｐＨは、５．５～６．５、６．５～７．５、または７．５～８．５である。

【０１８２】

一部の組成物中では増量、安定剤、及び／または酸化防止剤として遊離アミノ酸またはタンパク質が使用される。例として、製剤中のタンパク質を安定化するためにリジン、プロリン、セリン、及びアラニンが使用され得る。ケークの妥当な構造及び特性を確保するためにグリシンが凍結乾燥において有用である。液体製剤及び凍結乾燥製剤の両方においてタンパク質凝集を阻害するのにアルギニンが有用であり得る。メチオニンが酸化防止剤として有用である。一部の態様ではグルタミン及びアスパラギンが含まれる。一部の製剤にはアミノ酸がその緩衝能の故に含まれる。かかるアミノ酸には、例えば、アラニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リジン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテーム等が含まれる。ある特定の製剤はまた、血清アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）及び組換えヒトアルブミン（ｒＨＡ））、ゼラチン、カゼイン等といったタンパク質賦形剤も含む。

【０１８３】

一部の組成物は、ポリオールを含む。ポリオールには、糖（例えば、マンニトール、スクロース、トレハロース、及びソルビトール）、ならびに、例えば、グリセロール及びプロピレングリコール、及びポリエチレングリコール（ＰＥＧ）及び関連物質等の多価アルコールが含まれる。ポリオールは、コスモトロピックである。それらは、タンパク質を物理的分解及び化学分解プロセスから保護するために液体製剤及び凍結乾燥製剤の両方において有用な安定剤である。ポリオールはまた、製剤の等張性を調整するためにも有用である。

【０１８４】

ある特定の組成物は、安定剤としてマンニトールを含む。それは一般に、凍結保護剤、

例えば、スクロースとともに使用される。ソルビトール及びスクロースは、等張性を調整するため、及び輸送中または製造プロセスの間のバルク製品の調製中の凍結融解ストレスに対して保護するための安定剤として有用である。ＰＥＧは、タンパク質を安定化するため及び凍結保護剤として有用であり、この点に関して本開示で使用され得る。

【０１８５】

一部の製剤には単糖、二糖、三糖、四糖、及びオリゴ糖を含めた糖；アルジトール、アルドン酸、エステル化糖等といった誘導糖；ならびに多糖または糖ポリマーが含まれ得る。例えば、好適な炭水化物賦形剤には、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、Ｄ－マンノース、ソルボース等といった単糖；ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオース等といった二糖；ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプン等といった多糖；及びマンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトール、ソルビトール（グルシトール）、ミオイノシトール等といったアルジトールが含まれる。

【０１８６】

ある特定の製剤には界面活性剤が含まれ得る。界面活性剤は、典型的に、気液、固液、及び液液界面における表面へのタンパク質の吸着及びその後の凝集を阻止、最小化、または低減するため、ならびにタンパク質の立体構造安定性を制御するために使用される。好適な界面活性剤には、例えば、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０、ソルビタンエステルの他の脂肪酸エステル、Ｔｒｉｔｏｎ界面活性剤、レシチン、チロキサポール、及びポロキサマー１８８が含まれる。

【０１８７】

一部の態様では、薬学的組成物中に１つまたは複数の酸化防止剤が含まれる。酸化防止剤賦形剤を使用して、タンパク質の酸化的分解を阻止することができる。還元剤、酸素／フリーラジカルスカベンジャー、及びキレート剤がこの点に関して有用な酸化防止剤である。酸化防止剤は典型的には、水溶性であり、生成物の貯蔵寿命全体にわたってそれらの活性を維持する。ＥＤＴＡは、別の有用な酸化防止剤である。

【０１８８】

ある特定の製剤は、金属イオンを含み、これはタンパク質補因子であり、タンパク質配位錯体を形成するのに必要である。金属イオンはまた、タンパク質を分解する一部のプロセスも阻害することができる。例えば、マグネシウムイオン（１０～１２０ｍＭ）を使用して、アスパラギン酸からイソアスパラギン酸への異性化を阻害することができる。

【０１８９】

ある特定の製剤には等張性向上剤もまた含まれ得る。かかる薬剤の例としては、ハロゲン化アルカリ金属、好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトール、及びソルビトールが挙げられる。

【０１９０】

ある特定の製剤には１つまたは複数の防腐剤が含まれ得る。防腐剤は、同じ容器からの２回以上の抽出を伴う複数回投与用の非経口製剤を開発する際に必要である。それらの主要な機能は、医薬品の貯蔵寿命または有効期間全体にわたって微生物の増殖を阻害し、製品の滅菌状態を確保することである。好適な防腐剤には、水性希釈剤中のフェノール、ｍ－クレゾール、ｐ－クレゾール、ｏ－クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、亜硝酸フェニル水銀、フェノキシエタノール、フェニルアルコール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マグネシウム（例えば、六水和物）、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチル等）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、チメロサール、安息香酸、サリチル酸、クロルヘキシジン、またはそれらの混合物が含まれる。

【０１９１】

薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合性であるように製剤化される。投与経路の例は、静脈内（ＩＶ）、皮内、吸入、経皮、局所、経粘膜、及び直腸投与である。

【０１９２】

非経口投与（例えば、静脈内、皮下、眼内、腹腔内、筋肉内）に好適な製剤構成成分には、注射用水、食塩液、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒等の滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベン等の抗菌剤；アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム等の酸化防止剤；ＥＤＴＡ等のキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩等の緩衝液；及び塩化ナトリウムまたはデキストロース等の等張性の調整のための薬剤が含まれる。

【０１９３】

静脈内投与の場合、好適な担体は、生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ　ＥＬ（商標）（ＢＡＳＦ，Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，Ｎ．Ｊ．）、またはリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）を含む。担体は、製造条件下で安定であるべきであり、微生物に対して保護されるべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール）、及びそれらの好適な混合物を含有する、溶媒または分散媒であり得る。

【０１９４】

送達形態に応じた適切な製剤についてのさらなる手引きは、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，２２nd　Ｅｄｉｔｉｏｎ，（Ｌｏｙｄ　Ｖ．Ａｌｌｅｎ，ｅｄ．）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｐｒｅｓｓ（２０１３）で提供される。

【０１９５】

薬学的製剤は滅菌されていることが可能である。滅菌は、任意の好適な方法、例えば、滅菌濾過膜に通した濾過によって遂行することができる。組成物が凍結乾燥される場合、凍結乾燥及び再構成の前または後に濾過滅菌を実施することができる。実施例７及び８で実証されるように、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣは、比較的高い濃度であっても比較的耐凝集性であるようである。故に、別の態様では、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのうちのいずれか、及び水を含む組成物が本明細書で提供され、該活性化可能なＨＢＰＣは、少なくとも１ｍｇ／ｍＬの濃度で存在し、該組成物は、少なくとも約９５％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９６％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９７％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９８％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９９％単量体の活性化可能なＨＢＰＣを含む。本明細書で使用されるとき、「単量体の活性化可能なＨＢＰＣ」という用語は、非凝集形態の活性化可能なＨＢＰＣを指す。これらの態様のうちのある特定のものにおいて、該組成物は、少なくとも約２ｍｇ／ｍｌ、及び少なくとも約９５％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９６％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９７％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９８％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９９％単量体の活性化可能なＨＢＰＣを含む。一部の態様では、該組成物は、少なくとも約３ｍｇ／ｍｌ、及び少なくとも約９５％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９６％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９７％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９８％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９９％単量体の活性化可能なＨＢＰＣを含む。一部の態様では、該組成物は、少なくとも約４ｍｇ／ｍｌ、及び少なくとも約９５％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９６％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９７％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９８％単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９９％単量体の活性化可能なＨＢＰＣを含む。単量体の活性化可能なＨＢＰＣのパーセンテージは、例えば、実施例７に例示されるようなサイズ排除（ＳＥ）－ＨＰＬＣによって容易に決定することができ、この場合、単量体の活性化可能なＨＢＰＣのパーセントが、ピーク総面積に基づいた単量体の活性化可能なＨＢＰＣに対応するピーク面積パーセンテージとして決定される。

【実施例】

【０１９６】

この実施例の節における実施例は、限定としてではなく例示説明として提供されるもの

である。

【０１９７】

実施例１：活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの構築及び発現

この実施例では、図１に示される構造を有する、２つの例示的な活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣである複合体－５７及び複合体－６７を調製した。図１を参照して、活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＨＢＰＣの各々を下記に記載される３つのポリペプチドとして構築した。

（ａ）ＣＤ３マスキング部分（ＭＭ１）（１００）、第１の切断可能な部分（ＣＭ１）（１０１）、抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ（１０２）（リンカーを介してつなげられたＶＨ１及びＶＬ１配列を含む）、一緒に（１０３）として示される抗ＥＧＦＲ重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）（上）及びＣＨ１ドメイン（下）、これらがヒンジ領域（１０９）を介して連結されている第１のＦｃドメイン（Ｆｃ１）（１０４）を含む、第１のポリペプチド；ならびに

（ｂ）ＥＧＦＲマスキング部分（ＭＭ２）（１０５）、第２の切断可能な部分（ＣＭ２）（１０６）、ならびに一緒に（１０７）として示される抗ＥＧＦＲ軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）（上）及び定常軽鎖ドメイン（ＣＬ）（下）を含む、第２のポリペプチド；ならびに

（ｃ）ヒンジ領域（１１０）及び第２のＦｃドメイン（Ｆｃ２）（１０８）を含む、第３のポリペプチド。図１で見て取れるように、第１のＦｃドメイン及び第２のＦｃドメインは互いに結合し、抗ＥＧＦＲ重鎖及び軽鎖可変ドメインは、ＥＧＦＲに特異的に結合するＥＧＦＲ標的化ドメインを形成する。複合体－５７及び複合体－６７は、同じ抗ＥＧＦＲ標的化ドメインを含んでいたが、異なる抗ＣＤ３　ｓｃＦｖを含んでいた。複合体－６７の構成要素は表４Ａ～４Ｃに列挙され、複合体－５７の構成要素は表５Ａ～５Ｃに列挙される。

【表３】

表４Ａ．複合体－６７の第１のポリペプチド構成要素

名称	第１のポリペプチド				
	MM1	CM1	scFv	VH2	Fc1$^{\Delta}$
第１のポリペプチド 配列番号 30$^{*,++}$	ML15 配列番号 1	0011 配列番号 73	i2C 配列番号 11	C225v5 配列番号 21	配列番号 23

＊対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号１１２（末端リジンは、遺伝子における存否にかかわらず精製タンパク質には存在しない）または配列番号１３９である。

＋＋Ｎ末端スペーサー、配列番号３３を含有する。

$^{\Delta}$Ｆｃ１は、ＣＨ１（配列番号２６）－ヒンジ（配列番号３４）配列のＣ末端に位置する。

【表４】

表４Ｂ．複合体－６７の第２のポリペプチド構成要素

名称	第２のポリペプチド			
	MM2	CM2	VL2	定常軽鎖(CL)
第２のポリペプチド 配列番号 31$^{*,++}$	CF41 配列番号 13	2008 配列番号 14	C225v5 配列番号 22	CL 配列番号 25

＊対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号１１３または代替として配列番号１１５である。

＋＋Ｎ末端スペーサー、配列番号１１７を含有する。

【表５】

表４Ｃ．複合体－６７の第３のポリペプチド構成要素

名称	第3のポリペプチド
	Fc2
第3のポリペプチド 配列番号32*,++	配列番号28

＊対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号１１４（末端リジンは、遺伝子における存否にかかわらず精製タンパク質には存在しない）または配列番号１４１である。

＋＋Ｆｃ２のＮ末端に位置するヒンジ（配列番号３５）を含有する。

【表６】

表５Ａ．複合体－５７の第１のポリペプチド

名称	第1のポリペプチド				
	MM1	CM1	scFv	VH2	Fc1Δ
第1のポリペプチド 配列番号38*,++	H20GG 配列番号72	0011 配列番号2	v16 配列番号122	C225v5 配列番号21	配列番号23

＊対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号１４３（末端リジンは、遺伝子における存否にかかわらず精製タンパク質には存在しない）または配列番号１４２である。

＋＋Ｎ末端スペーサー（配列番号１１７）を含有する。

Δ Ｆｃ１は、ＣＨ１（配列番号２６）－ヒンジ（配列番号３４）配列のＣ末端に位置する。

【表７】

表５Ｂ．複合体－５７の第２のポリペプチド

名称	第2のポリペプチド			
	MM2	CM2	VL2	定常軽鎖(CL)
第2のポリペプチド 配列番号31*,++	CF41 配列番号13	2008 配列番号14	C225v5 配列番号22	CL 配列番号25

＊対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号１１３または代替として配列番号１１５である。

＋＋Ｎ末端スペーサー、配列番号１１７を含有する。

【表８】

表５Ｃ．複合体－５７の第３のポリペプチド構成要素

名称	第3のポリペプチド
	Fc2
第3のポリペプチド 配列番号32*,++	配列番号28

＊対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号１１４（末端リジンは、遺伝子における存在にかかわらず精製タンパク質には存在しない）または配列番号１４１である。

＋＋Ｆｃ２のＮ末端に位置するヒンジ（配列番号３５）を含有する。

【０１９８】

対照としての活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの構築

対照としての活性化可能な二重特異性構築物（本明細書で「ＣＩ１０６」と称される）は、国際特許出願公開第ＷＯ２０１９／０７５４０５号に記載されるように調製した（同文献は参照により本明細書に援用される）。ＣＩ１０６は、２本の同一の重鎖鎖（２つの第１のポリペプチド）及び同一の軽鎖（２つの第２のポリペプチド）に対応する４つのポリペプチドから成り立ち、各重鎖及び軽鎖が二重特異性構築物のアームを形成する、活性化可能なデュアルアーム二価二重特異性構築物である。ＣＩ１０６は、それが各種の結合ドメインを２つ（すなわち、２つのＥＧＦＲ結合ドメイン及び２つのＣＤ３結合ドメイン）有するという点で「二価」である。軽鎖のアミノ酸配列は、複合体－６７及び複合体－５７の第２のポリペプチドのアミノ酸配列と同一である。ＣＩ１０６の重鎖及び複合体－６７の第１のポリペプチドは、同一のスペーサー、切断可能な部分、抗ＥＧＦＲ　ＶＨ、切断可能な部分の構成要素を有する。ＣＩ１０６の重鎖及び複合体－５７の第１のポリペプチドは、同一のスペーサー、抗ＣＤ３　ＭＭ／ＭＭ１、切断可能な部分、及び抗ＣＤ３　ＶＬ／ＶＨ（及び同一の抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ）、ならびに抗ＥＧＦＲ　ＶＨの構成要素を有する。ＣＩ１０６に関しては、４つ全ての標的化ドメイン（２つの抗ＣＤ３結合ドメイン及び２つの抗ＥＧＦＲ結合ドメイン）をマスクした。ＣＩ１０６の構成要素が表６Ａ～６Ｂで提供される。

【表９】

表６Ａ．ＣＩ１０６重鎖構成要素

名称	重鎖				
	抗 CD3 マスキング部分	切断可能な部分	抗 CD3 scFv	抗 EGFR 可変重鎖ドメイン	Fc^{Δ}
CI106 配列番号 123[*,++]	H20GG 配列番号 72	0011 配列番号 2	v16 配列番号 122	C225v5 配列番号 21	配列番号 124

＊対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号１２５（タンパク質は、発現／精製中に末端リジンを喪失するようである）である。

＋＋Ｎ末端スペーサー（配列番号１１６）を含有する。

$^{\Delta}$Ｆｃドメインは、ＣＨ１（配列番号２６）－ヒンジ（配列番号３４）配列のＣ末端に位置する。

【表１０】

表６Ｂ．ＣＩ１０６軽鎖構成要素

名称			軽鎖	
	抗 EGFR MM (MM2)	CM2	抗 EGFR VL2	定常軽鎖
CI106 LC 配列番号 31[*,++]	CF41 配列番号 13	2008 配列番号 14	C225v5 配列番号 22	CL 配列番号 25

＊対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号１１３または代替として配列番号１１５である。

＋＋Ｎ末端スペーサー、配列番号１１７を含有する。

【０１９９】

実施例２．ＥＧＦＲ$^{+}$　ＨＴ－２９細胞及びＣＤ３ε^{+}　Ｊｕｒｋａｔ細胞への活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの結合

記載される抗ＥＧＦＲ及び抗ＣＤ３マスキングペプチドが、ＥＧＦＲ及びＣＤ３への活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの結合を阻害し得るかどうかを評定する

ために、フローサイトメトリーベースの結合アッセイを実施した。

【０２００】

ＨＴ－２９－ｌｕｃ２（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ（旧称Ｃａｌｉｐｅｒ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．）及びＪｕｒｋａｔ（クローンＥ６－１、ＡＴＣＣ、ＴＩＢ－１５２）細胞を、熱失活させた１０％ウシ胎児血清（ＨＩ－ＦＢＳ，Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ１０４３８－０２６）を補充したＲＰＭＩ１６４０＋ｇｌｕｔａｍａｘ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ７２４００～０４７）中で培養した。示されるように、「活性化」（本明細書で「ａｃｔ」と付記される）分子をマスクされたＨＢＰＣとして生産し、タンパク質分解により切断して、活性化形態を生産した。活性化可能なＨＢＰＣは生産したが、実験前にタンパク質分解切断を行わなかった。以下のポリペプチド複合体を試験した：ａｃｔ－ＣＩ１０６（二価ダブルアーム二重特異性構築物）、ａｃｔ－複合体－５７（ＨＢＰＣ）、及びａｃｔ－複合体－６７（ＨＢＰＣ）、ならびに活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣ複合体－５７、（マスクされた）ＨＢＰＣ複合体－６７、及びデュアルマスク二価ダブルアーム二重特異性構築物ＣＩ１０６。実施例１で言及されるように、ＣＩ１０６及び複合体－５７においてはＣＤ３結合剤（抗ＣＤ３ ｓｃＦｖ ｖ１６）及びマスク（ＭＭＨ２０ＧＧ）の１つの組み合わせを利用し、複合体－６７においてはＣＤ３結合剤（抗ＣＤ３ ｓｃＦｖ Ｉ２Ｃ）及びマスク（ＭＬ１５）の異なる組み合わせを利用した。

【０２０１】

ＨＴ２９－ｌｕｃ２細胞をＶｅｒｓｅｎｅ（商標）（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ１５０４０－０６６）で剥離し、洗浄し、９６ウェルプレートにおよそ１５０，０００細胞／ウェルでプレートし、５０μＬの活性化ＨＢＰＣまたは活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣに再懸濁した。Ｊｕｒｋａｔ細胞を計数し、ＨＴ２９－ｌｕｃ２細胞について記載したようにプレートした。活性化（マスクされていない）ＨＢＰＣまたは活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣのタイトレーションを図２Ａ及び２Ｂに示される濃度で開始し、続いてＦＡＣＳ染色緩衝液＋２％ＦＢＳ（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、カタログ５５４６５６）中で３倍段階希釈した。細胞を振とうしながら４℃で約１時間インキュベートし、採取し、２×２００μＬのＦＡＣＳ染色緩衝液で洗浄した。細胞を５０μＬのＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８コンジュゲート抗ヒトＩｇＧ Ｆｃ（１０μｇ／ｍｌ、Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）に再懸濁し、振とうしながら４℃で約１時間インキュベートした。細胞を採取し、洗浄し、２．５μｇ／ｍＬの７－ＡＡＤ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ５５９９２５）を含有する最終体積２００μＬのＦＡＣＳ染色緩衝液に再懸濁した。二次抗体単独で染色した細胞を陰性対照として使用した。データをＡｔｔｕｎｅ ＮｘＴフローサイトメーターで取得し、ＦｌｏｗＪｏ（登録商標）Ｖ１０（Ｔｒｅｅｓｔａｒ）を使用して生細胞の蛍光強度の中央値（ＭＦＩ）を算出した。バックグラウンド減算済みのＭＦＩデータを、曲線当てはめ分析を使用してＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍでグラフ化した。

【０２０２】

図２Ａ～２Ｂに示されるように、活性化可能なＨＢＰＣである複合体－５７及び複合体－６７の両方、ならびに対照ＣＩ１０６は、活性化（マスクされていない）複合体－５７、活性化複合体－６７、及び活性化ＣＩ１０６と比べてＥＧＦＲ標的及びＣＤ３標的の両方への結合の低減を示した。結合の低減は、結合曲線の右方向の移行によって表わされる。この細胞上結合実験におけるＥＧＦＲマスキング効率は、複合体－５７が１０５、複合体－６７が３３８、及びＣＩ１０６が５９４であった。

【０２０３】

実施例３．活性化可能なＨＢＰＣ及び活性化ＨＢＰＣの生物活性

活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣ及び活性化（マスクされていない）ＨＢＰＣの生物活性を、細胞傷害性アッセイを使用してアッセイした。ヒトＰＢＭＣをＳｔｅｍｃｅｌｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，Ｃａｎａｄａ）から購入し、熱失活させた５％ヒト血清（Ｓｉｇｍａ、カタログＨ３６６７）を補充したＲＰＭＩ－１６

４０＋ｇｌｕｔａｍａｘ中５：１のＥ（ＣＤ３＋）：Ｔ比でＥＧＦＲ発現がん細胞株ＨＴ２９－ｌｕｃ２（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ（旧称Ｃａｌｉｐｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．））と共培養した。ａｃｔ－ＣＩ１０６、ａｃｔ－複合体－５７及びａｃｔ－複合体－６７、ならびに活性化可能な（マスクされた）ＣＩ１０６、複合体－５７、及び複合体－６７のタイトレーションを試験した。４８時間後、ＯＮＥ－Ｇｌｏ（商標）ルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ、カタログＥ６１３０）を使用して細胞傷害作用を評価した。発光をＩｎｆｉｎｉｔｅ（登録商標）Ｍ２００　Ｐｒｏ（Ｔｅｃａｎ　Ｔｒａｄｉｎｇ　ＡＧ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）で測定した。細胞傷害作用パーセントを算出し、曲線当てはめ分析を用いてＧｒａｐｈＰａｄ　ＰＲＩＳＭでプロットした。ＥＣ５０を算出することによって活性化された分子の効力を比較した。マスキング効率を各分子について未変化ＥＣ５０対活性化ＥＣ５０の比として算出した。

【０２０４】

図３Ａ及び３Ｂに示されるように、活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣは、活性化（マスクされていない）二重特異性抗体と比べて移行した用量応答曲線を有する。このアッセイにおいて、図３Ａのデータは、ＣＩ１０６について２９，６５０のマスキング効率及び複合体－５７について１，０３４のマスキング効率を示す。図３Ｂのデータは、ＣＩ１０６について２６，５３７のマスキング効率及び複合体－６７について７，１４１のマスキング効率を示す。複合体－５７は全般的に、このアッセイを使用した複数の実験に基づいて、複合体－６７と比較して１０～４２倍低減された効力を示した。

【０２０５】

実施例４．マウスにおいて樹立されたＨＴ２９腫瘍のＨＢＰＣにより誘導される退縮

この実施例では、活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣ複合体－６７及び対照ＣＩ１０６を、ヒトＰＢＭＣ移植ＮＳＧマウスにおいて樹立されたＨＴ２９異種移植腫瘍の退縮を誘導するまたはその増殖を低減する能力に関して分析した。

【０２０６】

ヒト結腸癌細胞株ＨＴ２９－ｌｕｃ２（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ））を、確立された手順に従って培養した。精製された凍結ヒトＰＢＭＣは、Ｈｅｍａｃａｒｅ，Ｉｎｃ．（Ｖａｎ　Ｎｕｙｓ，ＣＡ）から入手した。ＮＳＧ（ＮＯＤ．Ｃｇ－ＰｒｋｄｃｓｃｉｄＩｌ２ｒｇｔｍ１Ｗｊｌ／ＳｚＪ）マウスは、Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｂａｒ　Ｈａｒｂｏｒ，ＭＥ）から入手した。

【０２０７】

０日目、各マウスの右脇腹に１００μＬのＲＰＭＩ＋Ｇｌｕｔａｍａｘ無血清培地中の2×10^{6}個のＨＴ２９－ｌｕｃ２細胞を皮下接種した。３日目、単一のドナー由来の以前に凍結されていたＰＢＭＣを１：１のＣＤ３＋　Ｔ細胞対腫瘍細胞の比で投与した（腹腔内）。腫瘍体積が１５０～２００mm^{3}に達したとき（およそ１２日目）、マウスを処置群に無作為割付けし、表７に従って投与を行った。腫瘍体積及び体重を週２回測定した。複合体－６７の用量レベルは、ＣＩ１０６と複合体－６７との間の分子量の差異を考慮に入れるように調整した。

【表１１】

表７．ＨＴ２９－ｌｕｃ２異種移植研究に関する群及び用量

群	数	処置	用量(mg/kg)
1	8	ビヒクル	該当なし
2	8	CI106、デュアルマスク二価ダブルアーム二重特異性構築物	1.0
3	8	複合体-67、活性化可能な(マスクされた)HBPC	0.2
4	8	複合体-67、活性化可能な(マスクされた)HBPC	0.6
5	8	複合体-67、活性化可能な(マスクされた)HBPC	1.8

【０２０８】

腫瘍体積対初回処置投与（０日目）後日数のプロットを描く図４に示されるように、ＨＴ２９－ｌｕｃ２異種移植腫瘍の増殖に対する複合体－６７の用量依存的効果が存在する。複合体－６７は、等価用量（１ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０６及び０．６ｍｇ／ｋｇの複合体－６７）で、対照であるＣＩ１０６よりも効力の高い抗腫瘍活性を実証した（ｐ＝０．００９９、ダネットによるＲＭＡＮＯＶＡ）。

【０２０９】

実施例５．マウスにおいて樹立されたＨＣＴ１１６腫瘍の活性化可能なＨＢＰＣでの処置後の腫瘍退縮

活性化（マスクされていない）ＨＢＰＣであるａｃｔ－複合体－６７、及び活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣである複合体－６７を、ヒトＴ細胞移植ＮＳＧマウスにおいて樹立されたＨＣＴ１１６異種移植腫瘍の退縮を誘導するまたはその増殖を低減する能力に関して分析した。ヒト結腸癌細胞株ＨＣＴ１１６（ＡＴＣＣ）を、確立された手順に従ってＲＰＭＩ＋Ｇｌｕｔａｍａｘ＋１０％ＦＢＳ中で培養した。腫瘍モデルは実施例４に記載されるように実施した。表８に従ってマウスに投与を行った。

【表１２】

表８．ＨＣＴ１１６異種移植研究に関する群及び用量

群	数	処置	用量(mg/kg)
1	8	ビヒクル	該当なし
2	8	複合体-67(活性化、マスクされていない)	0.3
3	8	複合体-67(活性化、マスクされていない)	1.0
4	8	複合体-67(活性化可能、マスクされた)	1.0
5	8	複合体-67(活性化可能、マスクされた)	3.0

【０２１０】

実施例６：セラミックハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー（ＣＨＴ）での精製後の単量体パーセントの評価

デュアルマスクＣＩ１０６対照及び活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣ複合体－６７を、精製中の高濃度における二量体化の量を比較するためにセラミックハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーカラムを使用して精製した。これは精製プロセスの各ステップにおける単量体のパーセンテージを分析することによって評定した。

【０２１１】

試料を、２０ｇ／Ｌ樹脂で負荷したＣＨＴタイプＩ、４０μｍビーズカラム（Ｂｉｏｒ

ａｄカタログ１５７－００４０及び番号１５７－００４１）に負荷した。カラムを平衡化緩衝液である１０ｍＭのＮａＰＯ４、１００ｍＭのヒスチジン緩衝液（ｐＨ６．５）で洗浄し、次いでＣＩ１０６については１０ｍＭのＮａＰＯ４、１００ｍＭのヒスチジン、２００ｍＭのリジン－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ６．５）、複合体－６７については１０ｍＭのＮａＰＯ４、１００ｍＭのヒスチジン１００ｍＭのリジン－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ６．５）により２ｍＬ画分で溶出させた。ＣＩ１０６を２ｍＬ画分で収集し、次いで５つの画分をプールして溶出液を形成させた。ＣＩ１０６については、ピーク収集を２５ｍＡＵ前後で開始し、３００ｍＡＵ前後で停止した。複合体－６７は１本の管に収集し、ピーク収集を１００ｍＡＵで開始し、５００ｍＡＵで停止した。これに続いて、５００ｍＭのＮａＰＯ４（ｐＨ７．０）のストリップ緩衝液ステップを行った。各画分のタンパク質濃度を２８０ｎｍの波長におけるＵＶ吸光度によって定量した。各画分における単量体パーセントを、ピーク総面積に基づいてＳＥ－ＨＰＬＣ（分析規模のサイズ排除クロマトグラフィー）によって決定した。

【０２１２】

クロマトグラフィーの結合段階中、タンパク質は、最初にカラムの上部に結合し、上位部位が充満してから初めてカラムの下方に移動する。このことは、分子がカラムに高濃度となることにつながる。多量体形態のＣＩ１０６及び複合体－６７は、単量体形態よりも強い親和性でカラムに結合し、したがって、カラムから完全に除去するためにより強力な緩衝液を必要とする。したがって、カラムからより弱い緩衝液で溶出させ、次いでより強力な緩衝液でストリップする場合、溶出液は、ストリッピング液よりも低いパーセンテージの二量体（より高いパーセンテージの単量体）を有する。表１０に示されるように、複合体－６７（活性化可能なＨＢＰＣ）の送液の結果、溶出液中の単量体パーセントは７．６％増加し、高分子量の材料をストリップステップまでカラムに残し、溶出液中の回収率が７７％となった。これはＣＩ１０６の送液と対照的であり、ＣＩ１０６の送液の結果、より多くの二量体材料（わずか３０．６％の単量体）がストリップ時までカラムに留まったにもかかわらず、溶出液中の単量体パーセントは５．４％減少して６５．０％であり、溶出液中の回収率が８１％となった。

【表１３】

表９．ＣＨＴクロマトグラフィー結果

分子	負荷量中の単量体%	溶出液中の単量体%	溶出液中の回収率%	ストリッピング液中の単量体%	ストリッピング液中の回収率%
複合体-67	90.9	98.5	77	データなし	データなし
CI106 対照	70.4	65.0	81	30.6	9

【０２１３】

これらの結果は、複合体－６７がカラムに高濃度であるときに追加の二量体化を受けず、溶出液中の単量体がＣＩ１０６のわずか６５％と比較して９８．５％で、ほぼ全ての高分子種の除去をもたらすことを示唆する。ＣＩ１０６の場合、元の負荷量よりも溶出液プール中により多くの高分子種が存在する。複合体－６７の改善された挙動により、ＣＨＴタイプ１クロマトグラフィーを介した高度に単量体の複合体－６７の精製が可能となる。しかしながら、ＣＩ１０６は、ＣＩ１０６がカラムに高濃度となるときに起こる二量体化に起因して、この結合／溶出クロマトグラフィー法または評価したいずれの結合／溶出クロマトグラフィー法によっても精製することができなかった。

【０２１４】

実施例７：遠心濃縮機での濃縮を介した濃度依存的二量体化の評定

複合体－６７、複合体－５７、及びデュアルマスク対照ＣＩ１０６のプロテインＡ及びＳＥＣ精製調製物を、遠心濃縮及び最高濃度での一晩のインキュベーション後の単量体パーセントに関して比較した。

【０２１５】
複合体－６７、複合体－５７、及びＣＩ１０６をプロテインＡ及びＳＥＣで精製し、次いで低ｐＨ緩衝液（１０ｍＭの酢酸塩、１００ｍＭのリジン（ｐＨ６））中で調合した。試料をＰＢＳ（７５３－４５－０１）中に１：１５に希釈し、Ｐｉｅｒｃｅ（商標）タンパク質コンセントレータＰＥＳ　１０Ｋ　ＭＷＣＯ　０．５ｍｌ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒカタログ番号８８５１３）を使用して、各濃度において１４，０００ＲＰＭで２分間遠心分離することによって濃縮した。最高濃度の試料を一晩保管し、単量体パーセントに関して評定した。得られた濃度及び単量体量パーセントが表１０及び図８に示される。
【表１４】
表１０．単量体の活性化可能なＨＢＰＣのパーセント対総タンパク質濃度

複合体-67		複合体-57		PBS 中の CI106	
濃度 mg/ml	単量体%	濃度 mg/ml	単量体%	濃度 mg/ml	単量体%
1.0	99.1	1.0	98.6	1.1	94.4
3.2	99.0	2.4	98.4	3.58	93.0
5.4	98.9	3.6	98.3	5.67	90.9
6.5	99.0	4.0	98.2	7.27	88.6
一晩	98.9	一晩	97.9		

【０２１６】
図６及び表１０は、複合体－６７が、濃度を増加させるにつれて高い単量体パーセンテージ（９８％～９９％）及び非常に低い溶液中凝集度で維持されることを示す。これはＣＩ１０６と対照的であり、ＣＩ１０６は、濃度を増加させるにつれて顕著な濃度依存的二量体化を示す。複合体－５７は、濃度が増加するにつれてごくわずかな濃度依存的二量体化を示し、安定な単量体パーセンテージを維持した。複合体－６７はまた、最高濃度での一晩のインキュベーション中にも単量体パーセンテージを維持し、より高い濃度での単量体パーセンテージの安定性が実証された。
【０２１７】
実施例８：活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＴＣＢ構築物ＣＩ１０７の安全性及び有効性
この研究では、ＥＧＦＲを発現している腫瘍の処置に対する治療可能性を評定するために、ＣＩ１０６対照（上述）の同じ構造形式を有する抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＴＣＢ構築物であるＣＩ１０７の安全性及び有効性を前臨床モデルにおいて評価した。ＣＩ１０７は、国際特許出願公開第ＷＯ２０１９／０７５４０５号に記載されるように調製した（同文献は参照により本明細書に援用される）。ＣＩ１０７　ＴＣＢ構築物は、この実施例で代替的に「Ｔ細胞誘導二重特異性抗体」すなわち「ＴＣＢ」と称される。
【０２１８】
方法
動物試験
全ての動物試験は、各試験を実施する施設を管理する動物実験委員会の規制に準拠して実施した。マウス異種移植研究は、ＣｙｔｏｍＸ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ（ＣｙｔｏｍＸ）によって実施され、カニクイザル試験は、Ａｌｔａｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｅｖｅｒｅｔｔ，ＷＡ）によって実施された。全ての動物試験は、ＵＳＤＡ動物福祉法及び実験動物の管理と使用に関する指針によって定められる規制に従った。
【０２１９】
材料
この研究で説明される、ＣＩ１０７、ＣＩ１２８、ＣＩ０２０、ＣＩ０１１、ＣＩ０４０、ＣＩ０４８、及びＣＩ１０４を含めた全てのＴＣＢ及び他の構築物は、ＣｙｔｏｍＸ

Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．によって生成された（ＷＯ２０１６／０１４９７４及びＷＯ２０１９／０７５４０５を参照されたい）。ＣＩ１０７、ＣＩ１２８、ＣＩ０２０、ＣＩ０１１、ＣＩ０４０、及びＣＩ１０４は、ＣＩ１０６と同じ構造形式を有する。ＣＩ０４８は、活性化ＣＩ０１１に対応する。活性化ＴＣＢは、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）でのインビトロ処理、続いてＳＥＣ精製によって生成された（Ｄｅｓｎｏｙｅｒｓ　２０１３）。ＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞は、Ｃａｌｉｐｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｈｏｐｋｉｎｔｏｎ，ＭＡ）から入手し、ＨＣＴ１１６及びＪｕｒｋａｔ細胞は、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から入手した。ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は、ＨｅｍａＣａｒｅ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｎｏｒｔｈｒｉｄｇｅ，ＣＡ）、ＡｌｌＣｅｌｌｓ（Ａｌａｍｅｄａ，ＣＡ）、またはＳＴＥＭＣＥＬＬ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）から個々のドナー由来の細胞の冷凍保存バイアルとして入手した。ＮＯＤ．Ｃｇ－Ｐｒｋｃｄｓｃｉｄ　Ｉｌ２ｒｇ　ｔｍ１Ｗｊｌ／ＳｚＪ（ＮＳＧ）マウスは、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｓａｃｒａｍｅｎｔｏ，ＣＡ）から入手した。

【０２２０】

細胞結合アッセイ

ＨＴ２９及びＪｕｒｋａｔ細胞を完全培地中で維持した。ＨＴ２９細胞を、Ｖｅｒｓｅｎｅ（商標）細胞解離緩衝液を使用して採取した。細胞を２５０×ｇで５～１０分間遠心分離し、２％ＦＢＳを含有するＦＡＣＳ緩衝液（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｏｇｅｎ）に再懸濁した。細胞をＶ底９６ウェルプレート中、１５０，０００／ウェルでプレートし、複合体－０７またはインビトロプロテアーゼ活性化ＣＩ１０４により、ＨＴ２９及びＪｕｒｋａｔ細胞の両方に対しては１．５μＭのＣＩ１０７、ＨＴ２９細胞に対しては０．０５μＭの活性化ＣＩ１０４、ならびにＪｕｒｋａｔ細胞に対しては０．５μＭの活性化ＣＩ１０４で開始する、ＦＡＣＳ緩衝液中の３倍段階希釈によって得た種々の濃度で処理した。細胞を４℃で１時間インキュベートし、ＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、１０μｇ／ｍｌのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７抗ヒトＦｃ二次抗体に再懸濁した。次いで細胞を光から保護しながら４℃で３０～６０分間インキュベートし、ＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、７－ＡＡＤを含有するＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＭＡＣＳＱｕａｎｔフローサイトメーター（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）で分析した。平均蛍光強度データを二次抗体のバックグラウンドシグナルに対して補正し、Ｇｒａｐｈｐａｄ　Ｐｒｉｓｍでグラフ化し、ＥＣ５０値を算出した。

【０２２１】

細胞傷害性アッセイ

ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２またはＨＴ２９－Ｌｕｃ２をＲＰＭＩ＋５％ヒト血清中、９６ウェルの白色平底組織培養処理済みプレート（Ｃｏｓｔａｒ番号３９１７）に１０，０００細胞／ウェルでプレートした。ヒトＰＢＭＣを新たに解凍し、ＲＰＭＩ＋５％ヒト血清で２回洗浄し、１００，０００個のＰＢＭＣをＲＰＭＩ＋５％ヒト血清中、ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２またはＨＴ２９－Ｌｕｃ２を含むウェルに添加した。次いでプロテアーゼ活性化ＴＣＢまたはＣＩ１０７を、３倍段階希釈によって得た種々の濃度でウェルに添加した。対照ウェルは、未処理の標的＋エフェクター細胞、標的細胞のみ、エフェクター細胞のみ、または培地のみを含んでいた。次いでプレートを３７℃及び５％ＣＯ２でおよそ４８時間インキュベートした。ＯＮＥ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ、番号Ｅ６１２０）及びＴｅｃａｎプレートリーダーを使用して細胞生存率を測定した。細胞傷害作用パーセントを以下のように算出した：（１－（実験ＲＬＵ／未処理ＲＬＵ平均値））×１００。

【０２２２】

インビトロＴ細胞活性化及びサイトカイン分析

Ｔ細胞活性化を、ＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞またはＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞と共培養したＰＢＭＣにおけるＣＤ６９発現の誘導によって測定した。ＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞またはＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞をＵ底非接着性プレートに１０，０００細胞／ウェルで

プレートした。ヒトＰＢＭＣを新たに解凍し、血清を含有するＲＰＭＩで２回洗浄し、１００，０００個のＰＢＭＣ／ウェルを、腫瘍細胞を含むプレートに添加した。ＰＢＭＣのみを含む複製プレートをフローサイトメトリー蛍光補正対照のために播種した。ＣＩ１０７、活性化ＣＩ１０７、またはＣＩ１２８の３倍段階希釈液を培地中で調製し、プレートした細胞に添加した。細胞を３７℃及び５％CO_2で１６時間インキュベートした。フローサイトメトリー分析に備えて、プレートを２５０×ｇで１０～１５分間遠心分離した。上清をサイトカイン分析のために取り出し、Ｆｃブロック（Ｈｕｍａｎ　ＴｒｕＳｔａｉｎ　ＦｃＸ，ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）を各ウェルに添加し、プレートを１０分間インキュベートした。抗ＣＤ４５－ＦＩＴＣ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、抗ＣＤ３－パシフィックブルー（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、抗ＣＤ８ａ－ＡＰＣ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、及び抗ＣＤ６９－ＰＥ－Ｃｙ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）を含有する抗体カクテル、または適切な蛍光補正対照をウェルに添加し、プレートを光から保護して振とうしながら４℃で３０～６０分間インキュベートした。次いでプレートをＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、７－ＡＡＤを含有するＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁した。発光を、Ａｔｔｕｎｅフローサイトメーターを使用して測定し、ＰＢＭＣに相当する１５，０００個の事象を収集した。

【０２２３】

サイトカイン分析には、Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｕ－ＰＬＥＸプレートアッセイ（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＡ）を使用した。ＭＣＰ－１、ＴＮＦ－α、ＩＬ－６、ＩＬ－２、及びＩＦＮ－γのレベルを評価するためにＵ－ＰＬＥＸプレートを製造業者のプロトコルに従って調製した。ＰＢＭＣと共培養し、マスクされた（活性化可能な）ＣＩ１０７、活性化（本明細書で「ａｃｔ－」とも称される）ＣＩ１０７、またはＣＩ１２８で処理したＨＴ２９－Ｌｕｃ２またはＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２から収集した上清試料を希釈し、プレートに添加し、製造業者の指示に従って処理した。

【０２２４】

インビボ有効性研究

インビボ実験のために、ＨＴ２９－Ｌｕｃ２腫瘍またはＨＣＴ１１６腫瘍を保有し、ヒトＰＢＭＣの腹腔内（ＩＰ）注射からもたらされたヒトＴ細胞を移植されたマウスにおいて、腫瘍増殖に対するＴＣＢの効果を測定した。０日目、２００万個のＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞またはＨＣＴ１１６細胞を１００μｌの無血清ＲＰＭＩ中、雌性ＮＳＧマウスの脇腹に皮下注射した。３日目、単一のドナー由来の凍結ＰＢＭＣを新たに解凍し、１００～２００μＬのＲＰＭＩ＋Ｇｌｕｔａｍａｘ無血清培地中、ＩＰ注射を介して投与した。ＰＢＭＣは、ＣＤ３＋　Ｔ細胞パーセンテージに関して以前に特性評価されており、インビボ投与に使用するＰＢＭＣの数は、１：１のＣＤ３＋　Ｔ細胞対腫瘍細胞の比に基づいていた。およそ１２日目の腫瘍測定値を使用して、ＴＣＢ、対照物質、またはビヒクルの静脈内（ＩＶ）投与前にマウスを無作為割付けした。動物に試験物質を毎週、３週間にわたって投与し、腫瘍体積及び体重を週２回記録した。活性化ＴＣＢＣＩ１０４をインビボ研究に使用した。ＣＩ１０４構築物は、切断可能なリンカーを使用してＣＤ３マスクをｓｃＦｖにテザリングした点のみがＣＩ１０７と異なる。インビトロでのプロテアーゼ活性化によりマスクが完全に除去されると、活性化ＣＩ１０４は活性化ＣＩ１０７と同一であり、これを使用して活性化ＣＩ１０７の活性を評定することができ、その後のインビトロ細胞傷害性研究により、活性化ＣＩ１０４の活性が活性化ＣＩ１０７のそれと同じであることが検証された。

【０２２５】

非ヒト霊長類における安全性研究

雄性カニクイザルに試験物質の低速ＩＶボーラス注射を、試験物質に応じて１日目、または１日目及び１５日目に１回与えた。試験物質の投与後、臨床観察を１日２回実施した。血液試料をサイトカイン放出、血清生化学、血液、及び毒物動態の分析のために投与後の種々の時点で収集した。サイトカイン分析は、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｍｏｎｋｅｙ　Ｍａｇｎｅｔｉｃ　２９－Ｐｌｅｘ　Ｐａｎｅｌ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ

Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を使用して血清試料に対して実施した。毒物動態分析については、試料を血漿へと処理し、ＡＩＴ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ ＩＮ）またはＣｙｔｏｍＸによる分析のための発送に先立って－６０～－８６℃で保管した。試験物質の血漿中濃度を、抗イディオタイプキャプチャー抗体及び抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）キャプチャー抗体を使用してＥＬＩＳＡによって測定した。毒物動態分析は、Ｐｈｏｅｎｉｘ ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ ｖ６．４（Ｃｅｒｔａｒａ，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，ＮＪ）を利用したノンコンパートメント解析を使用してＮｏｒｔｈｗｅｓｔ ＰＫ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓによって実施された。

【０２２６】

結果

ＣＩ１０７は、抗ＥＧＦＲドメイン及び抗ＣＤ３ドメインを含有するデュアルマスク（活性化可能な）デュアルアーム二価二重特異性分子として設計された。ＣＩ１０７は、ＳＰ３４由来の抗ＣＤ３ε ｓｃＦｖが重鎖のＮ末端に融合された、セツキシマブ由来の抗体を使用して生成した。ＣＩ１０７は、Ｆｃ機能をサイレンシングする変異を含むヒトＩｇＧ１ Ｆｃドメインを有する。ＣＩ１０７を生成するために、抗ＥＧＦＲ抗体要素に特異的なマスキングペプチドを、以前に記載されたように（Ｄｅｓｎｏｙｅｒｓ ２０１３）、柔軟なＧｌｙ－Ｓｅｒリッチペプチドリンカーが側面に位置するプロテアーゼ切断可能な基質リンカーを使用して、軽鎖のＮ末端に融合した。抗ＣＤ３要素に特異的なマスキングペプチドを、プロテアーゼ切断可能な基質リンカーを使用してｓｃＦｖに同様に付加した。ＣＩ１０７は、Ｆｃ－エフェクター機能を損なうことにより、ＦｃγＲを発現する細胞への架橋結合を最小化した。この設計は、正常組織における結合及び活性を最小化しながら、プロテアーゼが豊富な腫瘍微小環境において標的結合及び活性を最大化することが意図される。この実施例全体を通して使用された比較用ＴＣＢの全ては、ＥＧＦＲ結合ドメイン及びＣＤ３結合ドメイン、マスク、ならびに様々な程度の切断性を有するリンカーペプチドを含有する。ＣＩ０１１及びＣＩ０４０は、ＣＩ１０４及びＣＩ１０７の第１世代バージョンである。ＣＩ１０４及びＣＩ１０７分子は、最適化されたＣＤ３ ｓｃＦｖ、次世代の切断可能なリンカー、及び追加のＦｃサイレンシング変異を含有する。ＣＩ１０４及びＣＩ１０７は、同じマスクならびにＥＧＦＲ結合ドメイン及びＣＤ３結合ドメインを有するが、ＣＤ３プロテアーゼリンカーが異なる。しかしながら、プロテアーゼ活性化後には、活性化ＴＣＢは同じである。ＥＧＦＲ結合剤が無関係の抗体（抗ＲＳＶ）によって置き換えられているＣＩ１２８を非標的化対照として使用した。

【０２２７】

マスキングは、細胞表面上のＥＧＦＲへの結合を損なう。

ＥＧＦＲ結合ドメインのマスキングが、細胞表面上に発現したＥＧＦＲへの結合を損なうかどうかを評定するために、ＥＧＦＲを発現しているＨＴ２９細胞及びＨＣＴ１１６細胞へのＣＩ１０７及び比較用の活性化ＴＣＢ構築物（すなわち、ａｃｔ－ＴＣＢ）の結合を測定した。

【０２２８】

標的細胞を漸増濃度のＣＩ１０７または比較用の活性化構築物とともにインキュベートし、結合をフローサイトメトリーによって評価した。図７Ａ及び７Ｂに示されるように、ＣＩ１０７におけるＥＧＦＲマスクの存在は、活性化ＴＣＢ ＣＩ１０７と比較して、細胞表面上に発現したＥＧＦＲへの結合を実質的に減弱した。活性化ＴＣＢ構築物は、０．１７ｎＭのＫｄ計算値でＨＴ２９細胞に結合した一方で、ＣＩ１０７の結合についてのＫｄは９１．２８ｎＭであり、これは活性化ＴＣＢと比較して５００倍超の結合の減少に相当する。ＨＣＴ１１６細胞を使用して類似の結果が得られた。ＣＩ１０７と同じ抗ＣＤ３モジュールを含有するがＥＧＦＲ標的化を欠いている非標的化対照ＴＣＢである、ＣＩ１２８の結合もまた評価した。この対照は、ＨＴ２９細胞にもＨＣＴ１１６細胞にも結合しなかった（図７Ａ及び７Ｂを参照されたい）。

【０２２９】

マスキングは、リンパ球の表面上のＣＤ３への結合を損なう。

抗ＣＤ３結合ドメインのマスキングが、リンパ球の表面上のＣＤ３へのＣＩ１０７の結合を損なうかどうかを決定するために、Ｊｕｒｋａｔ細胞へのＣＩ１０７及び活性化ＣＩ１０７（すなわち、活性化ＴＣＢ）の結合を測定した。図７Ｃに示されるように、活性化ＴＣＢは、０．６２ｎＭのＫｄでＪｕｒｋａｔ細胞に結合した。しかしながら、ＣＩ１０７の結合は検出されず、Ｋｄを算出することはできなかった。活性化対照ＣＩ１２８は、活性化ＴＣＢと同様の親和性でＪｕｒｋａｔ細胞に結合した。

【０２３０】

まとめると、これらのデータは、ＣＩ１０７における抗ＥＧＦＲ結合ドメイン及び抗ＣＤ３結合ドメインのデュアルマスキングが、ＥＧＦＲまたはＣＤ３を発現している細胞への結合を減弱することを実証する。

【０２３１】

マスキングは、ＰＢＭＣ共培養物において細胞傷害作用及びＴ細胞活性化を減弱する。

ＣＩ１０７によるＥＧＦＲの標的化が抗腫瘍細胞効果につながり得るかどうかに取り組むために、インビトロ細胞傷害性アッセイを実施した。ルシフェラーゼ発現ＨＴ２９細胞またはＨＣＴ１１６細胞をヒトＰＢＭＣと共培養し、漸増濃度のＣＩ１０７、活性化ＴＣＢ、または非標的化対照ＣＩ１２８とともにインキュベートした。４８時間の培養後、ルシフェラーゼアッセイを介してＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞またはＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞の生存率を測定した。図８Ａに示されるように、対照ＣＩ１２８での処理は、ＰＢＭＣと共培養したＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞に対する最小の細胞傷害作用をもたらし、細胞傷害性活性のためにＥＧＦＲ及びＣＤ３の両方の結合が必要とされることを実証した。対照的に、マスクされたＣＩ１０７及び活性化ＣＩ１０７（すなわち、ａｃｔ－ＴＣＢ）の両方は、ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞に対する細胞傷害性効果を有した。しかしながら、活性化ＴＣＢは、マスクされた形態と比較してはるかにより低い濃度で細胞傷害作用をもたらし、ＥＣ５０値がそれぞれ０．４４ｐＭ及び７２９７ｐＭであった。類似の結果がＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞において観察され、ＥＣ５０値が活性化ＴＣＢについて０．２５ｐＭであるのに対し、ＣＩ１０７については３６７８ｐＭであった（図８Ｂ）。したがって、ＣＩ１０７における抗ＥＧＦＲドメイン及び抗ＣＤ３ドメインのデュアルマスキングは、プロテアーゼ活性化の不在下で、ＰＢＭＣによって媒介される細胞傷害性活性のおよそ１５，０００倍の減少をもたらした。

【０２３２】

ＣＩ１０７での処理は、Ｔ細胞活性化のマーカーであるＣＤ６９発現の誘導をもたらす。

ＣＩ１０７がＴ細胞活性化をもたらすかどうかを決定するために、ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞またはＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞と共培養したＰＢＭＣにおけるＣＤ６９レベルを、マスクされたＣＩ１０７、活性化ＣＩ１０７（すなわち、ａｃｔ－ＴＣＢ）、及び対照ＣＩ１２８での処理後に測定した。ＣＤ６９はＴ細胞活性化のマーカーとしての機能を果たし、ＴＣＲ／ＣＤ３結合後、Ｔリンパ球の表面上でＣＤ６９発現が迅速に誘導され、Ｔ細胞の活性化及び増殖に対する共刺激分子としての機能を果たす。ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞またはＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞と共培養したヒトＰＢＭＣを漸増濃度のＣＩ１０７、活性化ＴＣＢ（すなわち、活性化ＣＩ１０７）、または対照ＣＩ１２８で１６時間処理し、ＣＤ６９発現レベルをフローサイトメトリーによって測定した。図８Ｃに示されるように、ＣＩ１０７は、１４１７８ｐＭのＥＣ５０で、ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞と共培養したＣＤ８＋　Ｔ細胞上のＣＤ６９発現の誘導をもたらした。対照的に、活性化ＣＩ１０７での処理は、７．６５ｐＭのＥＣ５０でＣＤ６９誘導をもたらし、これはＣＩ１０７と比較してＴ細胞活性化曲線におけるおよそ１８，０００倍の移行を反映する。非ＥＧＦＲ標的化対照ＣＩ１２８でＴ細胞活性化は観察されず、このことは、ＣＤ３の結合単独ではＴ細胞活性化に十分でないことを示す。同様に、ＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞と共培養した同じドナー由来のＰＢＭＣの処理はＣＤ６９誘導をもたらし、ＥＣ５０値がマスクされたＣＩ１０７について６５９７１ｐＭであるのに対し、活性化ＴＣＢについては８．７５ｐＭで、ＣＤ６９誘導能力のおよそ７５００倍の差異を反映する（図８Ｄ）。

【０２３３】
ＣＩ１０７での処理は、サイトカイン放出をもたらす。
ＥＧＦＲを発現しているがん細胞と共培養したＰＢＭＣにおける、ＴＣＢでの処理時のＴ細胞活性化をさらに評定するために、サイトカイン放出をＣＩ１０７、活性化ＴＣＢ（すなわち、活性化ＣＩ１０７）、または対照ＣＩ１２８での処理後に評価した。ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２、ＩＬ６、ＭＣＰ－１、及びＴＮＦ－αのレベルを漸増濃度のＴＣＢでの処理から１６時間後に測定した。図９Ａ～９Ｅに示されるように、１０４ｐＭ範囲の濃度のＣＩ１０７での処理は、測定したサイトカインの各々の放出をもたらした。対照的に、活性化ＴＣＢは、１～１００ｐＭ範囲の濃度での処理時にサイトカイン放出をもたらした。これらの結果は全般的に、異なるＰＢＭＣドナー細胞及びがん細胞株（ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２対ＨＴ２９－Ｌｕｃ２）の間で一致していた。

【０２３４】
まとめると、これらのデータは、ＣＩ１０７におけるＥＧＦＲ結合ドメイン及びＣＤ３結合ドメインのデュアルマスキングが、プロテアーゼ活性化の不在下でＴ細胞活性化を減弱することを実証する。

【０２３５】
プロテアーゼ切断に対するＴＣＢの感受性は、インビボでの抗腫瘍有効性及び腫瘍内Ｔ細胞と相関がある。
ＴＣＢの抗腫瘍有効性をインビボで評価した。ＨＴ２９－Ｌｕｃ２腫瘍を保有し、ヒトＰＢＭＣを移植された免疫不全マウスをビヒクル（ＰＢＳ）、または異なるプロテアーゼ感受性を有するリンカー（ＣＩ０１１、ＣＩ０４０）、切断可能でないリンカー（ＣＩ０２０）、もしくはマスクされていない二重特異性治療薬ＣＩ０４８を含有する０．３ｍｇ／ｋｇのＴＣＢで週１回、３週間にわたって処置した。ＣＩ０２０は、切断可能でないリンカーに起因して最小の抗腫瘍活性を有することが予想される一方で、マスクされていないＣＩ０４８は、最大の有効性を有することが予想される。いずれもＥＧＦＲマスク及びＣＤ３マスクを含有するＣＩ０１１及びＣＩ０４０は、異なるリンカーペプチドに起因して異なるプロテアーゼ感受性を有し、ＣＩ０４０のプロテアーゼ感受性は、ＣＩ０１１のそれよりも高い。

【０２３６】
図１０Ａに示されるように、マスクされていないＴＣＢ　ＣＩ０４８での処理は、処置の開始から１週間以内に腫瘍退縮をもたらした。同様に、マスクされたＣＩ０１１及びＣＩ０４０での処理もまた、腫瘍退縮または静止をもたらした。ＣＩ０４０で見られた退縮は、この分子におけるリンカーの切断性がＣＩ０１１と比較してより高いことと相関がある。対照的に、切断可能でないリンカーを含有するＣＩ０２０での処理は腫瘍増殖に影響を及ぼさず、このことは、インビボでのＴＣＢの抗腫瘍活性にプロテアーゼ切断性が必要とされることを示す。

【０２３７】
試験したＴＣＢによって媒介される抗腫瘍有効性が、腫瘍におけるＴ細胞の存在と相関があるかどうかを決定するために、動物に１ｍｇ／ｋｇ用量のマスクされたＴＣＢまたは活性化ＴＣＢを与えてから１週間後に腫瘍を採取し、ＣＤ３に対する免疫組織化学的検査を実施した。図１０Ｂに示されるように、ビヒクルまたは切断可能でないＣＩ０２０での処置後に腫瘍組織において最小数のＴ細胞が観察された。対照的に、ＴＣＢ　ＣＩ０４０またはインビトロプロテアーゼ活性化ＴＣＢ　ＣＩ０４８での処理時に増加した数のＴ細胞が観察された。ここでもまた、より高いプロテアーゼ感受性を有するＴＣＢ（ＣＩ０４０）は、腫瘍においてより多数のＴ細胞をもたらした。

【０２３８】
まとめると、これらのデータは、ＴＣＢが、ＥＧＦＲ結合ドメインマスク及びＣＤ３結合ドメインマスクのプロテアーゼ切断に対する感受性と相関して、腫瘍内Ｔ細胞及びインビボでの抗腫瘍有効性をもたらし得ることを示唆する。

【０２３９】

ＣＩ１０７での処置は、樹立された異種移植腫瘍の用量依存的退縮を誘導する。

インビボでの腫瘍増殖に対するＣＩ１０７の効果を評価した。ＮＳＧマウスにＨＴ２９細胞を皮下移植し、続いてＰＢＭＣのＩＰ注射を行い、ＰＢＭＣをおよそ１１日間生着させた。次いで動物をビヒクル、０．５ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７、または１．５ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７で週１回、３週間にわたって処置した。図１１Ａに示されるように、処置開始からおよそ１週間後に始まって、０．５ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７での処理は腫瘍静止をもたらし、１．５ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７は腫瘍退縮をもたらした。

【０２４０】

ＣＩ１０７のインビボ有効性をＨＣＴ１１６腫瘍においても評価した。腫瘍及びＰＢＭＣの移植後、動物をビヒクル、０．３ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７、１ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７、または０．３ｍｇ／ｋｇの活性化ＴＣＢで処置した。図１１Ｂに示されるように、０．３ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７はＨＣＴ１１６腫瘍増殖を遅延させた一方で、１ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７及び０．３ｍｇの活性化ＴＣＢは、処置の継続期間にわたって同様のレベルの腫瘍退縮及び静止をもたらした。

【０２４１】

これらのデータは、ＣＩ１０７がＨＴ２９異種移植腫瘍及びＨＣＴ１１６異種移植腫瘍における腫瘍増殖及び退縮の用量依存的阻害を誘導すること、ならびに３倍高い用量のＣＩ１０７の抗腫瘍活性が活性化ＴＣＢのそれと同様であることを実証する。

【０２４２】

マスクされたＣＩ１０７は、カニクイザルにおいて活性化ＣＩ１０７と比べて増加した安全性を提供する。

カニクイザル試験においてＣＩ１０７の前臨床忍容性を評価した。動物に０．０６ｍｇ／ｋｇまたは０．１８ｍｇ／ｋｇの活性化ＣＩ１０７（すなわち、ａｃｔ－ＴＣＢ）及び０．６ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ、４．０ｍｇ／ｋｇ、または６．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７の単回投与を与え、動物を臨床観察のために追跡した。０．１８ｍｇ／ｋｇの活性化ＴＣＢで処置した動物は、嘔吐、食欲不振、弱々しい外見、猫背の姿勢、及びやせた外見を含めた重度の臨床作用を経験し、有害作用は投与後２時間ほどの早期から１０日まで認められた。０．０６ｍｇ／ｋｇの活性化ＴＣＢで処置した動物は、投与後１日目に嘔吐及び猫背の姿勢を含めた中程度の一過性の臨床作用を経験した。これらの作用の迅速な消失に基づいて、活性化ＴＣＢについて０．０６ｍｇ／ｋｇを最大耐量（ＭＴＤ）と定義した。対照的に、２．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７で処置した動物は、ほんの一過性で軽度の臨床作用（２日目の嘔吐）を経験し、０．６ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７で処置した動物は、いずれの有害作用も経験しなかった。４．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７で処置した動物は、中程度の臨床作用（投与後４、８、及び２４時間での嘔吐ならびに２日目の食欲不振を含む）を経験した。６．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７で処置した動物は、２日目に死亡が確認された。死亡前に認められた臨床徴候には、投与後の猫背の姿勢、弱々しい外見、嘔吐、及び液状便が含まれた。したがって、ＣＩ１０７については４．０ｍｇ／ｋｇをＭＴＤとみなした。全体として、マスクされたＣＩ１０７は、活性化ＴＣＢと比較して６０倍超の忍容性の改善を達成した。

【０２４３】

活性化ＣＩ１０７またはマスクされたＣＩ１０７での処理後のサイトカインレベルもまた調査した。図１２に示されるように、ＩＬ－６（１２Ａ）及びＩＦＮ－γ（１２Ｂ）のレベルは、活性化ＴＣＢで処置した動物において投与後８時間で上昇した。対照的に、０．６ｍｇ／ｋｇまたは２．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７での処置後にはＩＬ－６またはＩＦＮ－γにおいて最小の変化が観察された。これらのサイトカインのレベルの上昇は、４．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７での処置後にのみ見られた。臨床観察と一致するように、ＣＩ１０７は、サイトカイン放出の用量応答を６０倍超移行させる。

【０２４４】

血清生化学の分析においてもまた、活性化ＴＣＢとＣＩ１０７との間の差異が実証された。図１２Ｃに示されるように、活性化ＴＣＢでの処置は、投与後４８時間で肝細胞損傷

のマーカーであるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）の用量依存的増加をもたらした。対照的に、ＣＩ１０７での処置後には、耐量レベルのうちのいずれでもＡＳＴの変化は何ら観察されず、このマスクされたＴＣＢでの改善された忍容性が実証された。

【０２４５】

ＥＧＦＲ結合ドメイン及びＣＤ３結合ドメインのマスキングが薬物動態に影響を及ぼすかどうかに取り組むために、活性化ＴＣＢ（すなわち、活性化ＣＩ１０７）及びマスクされたＣＩ１０７の投与後の血漿中濃度を測定した。図１２Ｄに示されるように、活性化ＴＣＢは、投与後２４時間以内に血液循環から迅速に除去された。対照的に、ＣＩ１０７は投与後最大７日間にわたって血漿中に維持され、このことは、マスキングが活性化ＴＣＢと比べて曝露量を増加させる可能性があることを示唆する。０．０６ｍｇ／ｋｇの活性化ＴＣＢの単回投与後のＡＵＣ（０～７）は０．０４ｎＭ×日（ｎ＝１）であった一方で、２ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７の投与後のＡＵＣ（０～７）は３３１．７ｎＭ×日（ｎ＝３の平均）であり、忍容曝露量の８，０００倍超の増加が実証された。

【０２４６】

このことは、マスクされたＣＩ１０７で観察された忍容性及び薬物動態の改善が、正常組織環境におけるＥＧＦＲ及びＣＤ３への結合の予想される減弱と一致することを実証する。

【表１５】

表１１．配列表

配列番号	説明	配列
1	MM1-複合体-67	VSTTCWWDPPCTPNT
2	CM1	GLSGRSDDH
3	VH CDR1 複合体-67	KYAMN
4	VH CDR2 複合体-67	RIRSKYNNYATYYADSVKD
5	VH CDR3 複合体-67	HGNFGNSYISYWAY
6	VL CDR1 複合体-67	GSSTGAVTSGNYPN
7	VL CDR2 複合体-67	GTKFLAP
8	VL CDR3 複合体-67	VLWYSNRWV
9	VH1 複合体 67	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS
10	VL1 複合体-67	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
11	scFv 複合体-67	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
12	リンカー	GSSGGSGGSG

13	MM2 複合体-67 複合体-57	LSCEGWAMNREQCRA
14	CM2	ISSGLLSGRSDQH
15	VH2 CDR1 複合体-67 複合体-57	NYGVH
16	VH2 CDR2 複合体-67 複合体-57	VIWSGGNTDYNTPFTS
17	VH2 CDR3 複合体-67 複合体-57	ALTYYDYEFAY
18	VL2 CDR1 複合体-67 複合体-57	RASQSIGTNIH
19	VL2 CDR2 複合体-67 複合体-57	YASESIS
20	VL2 CDR3 複合体-67 複合体-57	QQNNNWPTT
21	VH2 ドメイン 複合体-67 複合体-57 CI106(対照)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK GLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQ SQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
22	VL2 ドメイン 複合体-67 複合体-57 CI106(対照)	QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPR LLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGAGTKLELK
23	Fc1 複合体-67 複合体-57	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLK SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
24	末端リジンを有する Fc1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLK SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK

25	CL ドメイン 複合体-67 複合体-57 CI106(対照)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
26	CH1-ヒト IgG1- 複合体-67 複合体-57	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKV
27	ブランク	
28	C 末端リジンを 有しない Fc2 複合体-67 複合体-57	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLD SDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
29	C 末端リジンを 有する Fc2	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLD SDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
30	第 1 の ポリペプチド 複合体-67	[QGQSGS]VSTTCWWDPPCTPNT**GSSGGSGGSGG***LSGRSDDH***G GGS***EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS**GGGGSGG GGSGGGGS***QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNW VQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL**GGGGS**QVQLKQSGPGL VQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSG GNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCAR ALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
31	第 2 の ポリペプチド 複合体-67 複合体-57 CI106(対照)	[QGQSGQG]LSCEGWAMNREQCRA**GGGSSGGS***ISSGLLSGRSD QH***GGGS**QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQ RTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIAD YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC

32	第3のポリペプチド 複合体-67 複合体-57	**DKTHTCPPC**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
33	スペーサー	QGQSGS
34	ヒンジ-1 複合体-67 複合体-57 CI106(対照)	EPKSCDKTHTCPPC
35	ヒンジ-2 複合体-67 複合体-57	DKTHTCPPC
36	末端リジンを有する第3のポリペプチド 複合体-67 複合体-57	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY DTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
37	複合体-67、 複合体-57 スペーサーを有しない第2のポリペプチド	LSCEGWAMNREQCRAGGGSSGGSISSGLLSGRSDQHGGGSQIL LTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLI KYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNN WPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
38	複合体-57 末端リジンを有しない第1のポリペプチド。	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGG GSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT PGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADD ESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGK GLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSG GGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQ SPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKM NSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP*C*EEQ Y*G*STYR*C*VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSR*K*EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVL*K*SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
39	リンカー	GGGS

40	リンカー	$(GGGS)_n$
41	リンカー	(GSGGS)n
42	リンカー	GGSG
43	リンカー	GGSGG
44	リンカー	GSGSG
45	リンカー	GSGGG
46	リンカー	GGGSG
47	リンカー	GSSSG
48	リンカー	GGGGSGGGGSGGGGSGS
49	リンカー	GGGGSGS
50	リンカー	GGGGSGGGGSGGGGS
51	リンカー	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
52	リンカー	GGGGS
53	リンカー	GGGGSGGGGS
54	リンカー	GGGS
55	リンカー	GGGSGGGS
56	リンカー	GGGSGGGSGGGS
57	リンカー	GSSGGSGGSGG
58	リンカー	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
59	リンカー	GSTSGSGKPGSSEGST
60	リンカー	SKYGPPCPPCPAPEFLG
61	リンカー	GGSLDPKGGGGS
62	リンカー	PKSCDKTHTCPPCPAPELLG
63	リンカー	GKSSGSGSESKS
64	リンカー	GSTSGSGKSSEGKG
65	リンカー	GSTSGSGKSSEGSGSTKG
66	リンカー	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
67	MM1	MMYCGGNEVLCGPRV
68	MM1	GYRWGCEWNCGGITT
69	MM1	MMYCGGNEIFCEPRG
70	MM1	GYGWGCEWNCGGSSP
71	MM1	MMYCGGNEIFCGPRG
72	MM1	GYLWGCEWNCGGITT
73	CM1 複合体-67 複合体-57 CI106	LSGRSDDH
74	CM	ISSGLLSGRSDQH

75	CM	LSGRSDNH
76	CM	TSTSGRSANPRG
77	CM	VHMPLGFLGP
78	CM	AVGLLAPP
79	CM	QNQALRMA
80	CM	ISSGLLSS
81	CM	ISSGLLSGRSDNH
82	CM	LSGRSGNH
83	CM	LSGRSDIH
84	CM	LSGRSDQH
85	CM	LSGRSDTH
86	CM	LSGRSDYH
87	CM	LSGRSDNP
88	CM	LSGRSANP
89	CM	LSGRSANI
90	CM	LSGRSDNI
91	CM	ISSGLLSGRSANPRG
92	CM	AVGLLAPPTSGRSANPRG
93	CM	AVGLLAPPSGRSANPRG
94	CM	ISSGLLSGRSDDH
95	CM	ISSGLLSGRSDIH
96	CM	ISSGLLSGRSDTH
97	CM	ISSGLLSGRSDYH
98	CM	ISSGLLSGRSDNP
99	CM	ISSGLLSGRSANP
100	CM	ISSGLLSGRSANI
101	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
102	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
103	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
104	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
105	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
106	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNP
107	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANP
108	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANI
109	CM	ISSGLLSGRSDNI
110	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
111	CM	ISSGLLSGRSGNH

112	複合体-67 第1の ポリペプチドを コードするポリ ヌクレオチド	CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGGGA CCCTCCATGCACACCTAATACCGGCAGCTCTGGTGGCTCTG GCGGAAGCGGAGGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCACGGC GGAGGATCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGACT GGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCTGTGCCGCCA GCGGCTTCACCTTCAACAAATACGCCATGAACTGGGTCCGA CAGGCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGCCAGAATCAG AAGCAAGTACAACAACTATGCCACCTACTACGCCGACAGCG TGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAA CACCGCCTACCTGCAGATGAACAACCTGAAAACCGAGGAC ACCGCCGTGTACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAA CAGCTACATCAGCTACTGGGCCTATTGGGGCCAGGGCACAC TGGTCACAGTTTCTAGTGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGT GGAAGTGGCGGCGGAGGTTCTCAAACAGTGGTCACCCAAG AGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAACCGTGACACTG ACATGCGGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCAGCGGCAACTA CCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGAG GACTGATCGGCGGCACAAAGTTTCTGGCTCCCGGAACACCA GCCAGATTCAGCGGTTCTCTGCTCGGAGGAAAGGCCGCTCT GACACTTTCTGGCGTGCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGTACT ATTGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCGGCGGA GGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGTGGCGGTAGCCAGGT CCAGCTGAAACAATCTGGACCCGGACTCGTGCAGCCAAGCC AGAGCCTGTCTATCACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAGCCTGA CCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCTCCCGGCAAG GGACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAACAC CGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGAGCATCAACA AGGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCC CTGCAGAGCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGC CCTGACCTACTATGACTACGAGTTTGCCTACTGGGGACAGG GAACCCTCGTGACAGTGTCTGCTGCTAGCACAAAGGGCCCT AGCGTTTTCCCACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCGGT GGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCC CGAGCCAGTGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACAT CTGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGC CTGTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCTCT CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCC TAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGC TGCGATAAGACACACACCT

		GTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCG TGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCA GCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCC CACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGG CGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCGAGGAA CAGTACGGCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAAC CATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTG TACACACTGCCTCCAAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATC AGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCG ATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAA CAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGAAGTCCGACGGCT CATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGA TGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGA GGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGA GCCCCGGCAAA
113	第2の ポリペプチドを コードするポリ ヌクレオチド 複合体-57 複合体-67 CI106	CAAGGCCAGTCTGGCCAAGGTCTTAGTTGTGAAGGTTGGGC GATGAATAGAGAACAATGTCGAGCCGGAGGTGGCTCGAGC GGCGGCTCTATCTCTTCCGGACTGCTGTCCGGCAGATCCGA CCAGCACGGCGGAGGATCCCAAATCCTGCTGACACAGTCTC CTGTCATACTGAGTGTCTCCCCCGGCGAGAGAGTCTCTTTCT CATGTCGGGCCAGTCAGTCTATTGGGACTAACATACACTGG TACCAGCAACGCACCAACGGAAGCCCGCGCCTGCTGATTAA ATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTA GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAAC AGCGTGGAAAGCGAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCA GAACAACAACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAAAC TGGAACTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACT CCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG AGTGT

114	第3のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド 複合体-57 複合体-67	GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACT GCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAA GGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCG TGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGA CAAAGCCCTGCGAGGAACAGTACGGCAGCACCTACAGATG CGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACG GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCT GCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGGAA GAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAA GGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCA ATGGACAGCCCGAGAACAACTACGACACCACACCTCCAGTG CTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCGACCTGAC CGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA GAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAA
115	軽鎖/第2のポリペプチド 複合体-57 複合体-67 CI106	CAAGGACAATCTGGACAGGGCCTGAGCTGTGAAGGCTGGG CCATGAATAGAGAGCAGTGCAGAGCTGGCGGCGGATCTTCT GGCGGCTCTATCTCTTCTGGACTGCTGAGCGGCAGAAGCGA TCAACACGGCGGAGGCTCTCAGATCCTGCTGACACAGAGCC CCGTGATCCTGTCTGTGTCTCCTGGCGAGAGAGTGTCCTTCA GCTGTAGAGCCAGCCAGTCCATCGGCACCAACATCCACTGG TATCAGCAGCGGACCAACGGCAGCCCCAGACTGCTGATTAA GTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGCATCCCCAGCAGATTTT CTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAGCATCAAC AGCGTGGAAAGCGAGGATATCGCCGACTACTACTGCCAGCA GAACAACAACTGGCCCACCACCTTTGGAGCCGGCACCAAGC TGGAACTGAAGAGAACAGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATC TTCCCACCTTCCGACGAGCAGCTGAAAAGCGGCACAGCCTC TGTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGAGAAGCCA AGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA TAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACACTGAGCAAGGCCGA CTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACC AGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGC GAGTGT
116	スペーサー	QGQSGS
117	スペーサー	QGQSGQG
118	スペーサー	QGQSGS
119	スペーサー	QGQSGQG

120	スペーサーを有せず、かつ末端リジンを有する第1のポリペプチド 複合体-67	VSTTCWWDPPCTPNT**GSSGGSGGSGG***LSGRSDDH***GGGS***EVQL VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTA VYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS***GGGGSGGGGSGG GGS***QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKP GQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL***GGGGS**QVQLKQSGPGLVQPSQS LSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDY NTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYY DYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
121	ブランク	
122	抗CD3 scFv V16 複合体-57 CI106	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPG QAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGL EWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNS LKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
123	CI106-重鎖 CRF41-2008-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v16sc-H-N	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGG GSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT PGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADD ESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGK GLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSG GGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQ SPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKM NSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
124	Fc CI106	PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS

		DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
125	CI106 重鎖- CRF41-2008- C225v5Fcmt4- h20GG-0011- v16sc-H-N	CAAGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTTGCGAGTG GAATTGCGGAGGGATCACTACAGGCTCGAGCGGTGGCAGC GGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCGATGATCATGG CGGCGGTTCTCAAACTGTAGTAACTCAAGAACCAAGCTTCT CCGTCTCCCCTGGGGGAACAGTCACACTTACCTGCCGAAGT AGTACAGGTGCTGTTACGACCAGTAACTATGCCAATTGGGT ACAACAAACGCCTGGTCAGGCTCCGCGCGGATTGATAGGAG GCACGAATAAACGGGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTCAGC GGAAGCATACTCGGTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACTGG GGCCCAAGCTGATGATGAAAGTGATTATTATTGTGCGCTCT GGTACAGCAACCTCTGGGTGTTTGGGGGTGGCACGAAACTT ACTGTCTTGGGCGGCGGCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGG AGGAGGAGGCTCAGAAGTCCAACTGGTCGAATCCGGGGGA GGGCTCGTACAGCCGGGTGGGTCCCTCAAACTCTCTTGTGC GGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTACATACGCGATGAATTGGG TCCGGCAGGCCAGTGGGAAAGGGCTCGAATGGGTAGGACG AATCCGATCAAAATACAACAACTACGCTACTTATTACGCTG ATTCCGTGAAGGACAGATTCACAATATCCCGCGACGATAGC AAGAATACGGCATATCTTCAGATGAATTCTCTTAAAACTGA GGATACCGCTGTGTATTACTGCACAAGACATGGTAATTTTG GAAACTCATATGTCTCTTGGTTCGCTTATTGGGGACAGGGC ACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGGATCCCAGGT GCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAGC CAGAGCCTGAGCATTACCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCT GACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCCGGGCA AAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAAC ACCGATTATAACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAA CAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAATGAACA GCCTGCAAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGC GCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAG GGCACCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGG GGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGG ACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT CTTGTGACAAAACTCACACATGCCCA

		CCGTGCCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCTCAATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA
126	リンカー	(GGGGS)n
127	リンカー	GGGSSGGS
128	VH1 CDR1 複合体-57 CI106(対照)	TYAMN
129	VH1 CDR2 複合体-57 CI106(対照)	RIRSKYNNYATYYADSVKD
130	VH1 CDR3 複合体-57 CI106(対照)	HGNFGNSYVSWFAY
131	VL1 CDR1 複合体-57 CI106(対照)	RSSTGAVTTSNYAN
132	VL1 CDR2 複合体-57 CI106(対照)	GTNKRAP
133	VL1 CDR3 複合体-57 CI106(対照)	ALWYSNLWV
134	VH1 ドメイン 複合体-57 CI106(対照)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
135	VL1 ドメイン 複合体-57 CI106(対照)	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPG QAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

136	複合体-57 末端リジンを有する第1のポリペプチド	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGG GSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT PGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADD ESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGK GLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSG GGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQ SPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKM NSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP<u>C</u>EEQ Y<u>*G*</u>STYR<u>C</u>VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSR<u>*K*</u>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVL<u>*K*</u>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
137	末端リジンを有する第1のポリペプチド 複合体-67	[QGQSGS]<u>VSTTCWWDPPCTPNT</u>**GSSGGSGGSGG***LSGRSDDH***GGGS***<u>*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP*</u> <u>*GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN*</u> <u>*LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS****GGGGSGG***</u> <u>***GGSGGGGS****QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNW*</u> <u>*VQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQP*</u> <u>*EDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL*</u>**GGGGS**QVQLKQSGPGL VQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSG GNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCAR ALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
138	ブランク	

139	末端リジンを有しない第1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド 複合体-67	CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGGGA CCCTCCATGCACACCTAATACCGGCAGCTCTGGTGGCTCTG GCGGAAGCGGAGGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCACGG CGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGAC TGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCTGTGCCGCC AGCGGCTTCACCTTCAACAAATACGCCATGAACTGGGTCCG ACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGCCAGAATCA GAAGCAAGTACAACAACTATGCCACCTACTACGCCGACAGC GTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGA ACACCGCCTACCTGCAGATGAACAACCTGAAAACCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCA ACAGCTACATCAGCTACTGGGCCTATTGGGGCCAGGGCACA CTGGTCACAGTTTCTAGTGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGG TGGAAGTGGCGGCGGAGGTTCTCAAACAGTGGTCACCCAAG AGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAACCGTGACACTG ACATGCGGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCAGCGGCAACTA CCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGAG GACTGATCGGCGGCACAAAGTTTCTGGCTCCCGGAACACCA GCCAGATTCAGCGGTTCTCTGCTCGGAGGAAAGGCCGCTCT GACACTTTCTGGCGTGCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGTACT ATTGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCGGCGGA GGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGTGGCGGTAGCCAGGT CCAGCTGAAACAATCTGGACCCGGACTCGTGCAGCCAAGCC AGAGCCTGTCTATCACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAGCCTGA CCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCTCCCGGCAAG GGACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAACA CCGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGAGCATCAAC AAGGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTC CCTGCAGAGCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGG CCCTGACCTACTATGACTACGAGTTTGCCTACTGGGGACAG GGAACCCTCGTGACAGTGTCTGCTGCTAGCACAAAGGGCCC TAGCGTTTTCCCACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCG GTGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTT CCCGAGCCAGTGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGAC ATCTGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCG GCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCT CTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAG CCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGA GCTGCGATAAGACACACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCA GAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAG CCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGAC CTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGA AGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGGAAGT

		GCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACGGC AGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAA GGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTG CCTCCAAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCT GACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGT GGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACTACAAG ACAACCCCTCCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTG TACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGG GCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCAC AACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGC
140	C 末端リジンを有する第 3 のポリペプチド 複合体-67 複合体-57	**DKTHTCPPC**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
141	C 末端リジンをコードするコドンを有しない、第 3 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド 複合体-67 複合体-57	GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACT GCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAA GGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCG TGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGA CAAAGCCCTGCGAGGAACAGTACGGCAGCACCTACAGATG CGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACG GCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCT GCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGGAA GAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAA GGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCA ATGGACAGCCCGAGAACAACTACGACACCACACCTCCAGTG CTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCGACCTGAC CGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGC TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA GAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGC

142	第1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(C末端リジンに対するコドンを有しない)複合体-57	CAAGGACAATCTGGATCCGGCTATCTGTGGGGCTGCGAGTG GAATTGTGGCGGCATCACAACAGGCTCTAGCGGCGGAAGC GGAGGATCTGGTGGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCATGG CGGCGGATCCCAGACCGTGGTCACACAAGAGCCTAGCTTCT CCGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACATGCAGATCT TCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAATTGGGT GCAGCAGACCCCTGGACAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCG GCACCAACAAAAGAGCCCCTGGCGTCCCAGATAGATTCAGC GGCTCTATCCTGGGCAACAAGGCCGCACTGACAATCACAGG CGCCCAGGCCGATGACGAGAGCGATTACTATTGCGCCCTGT GGTACAGCAACCTGTGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAGCTG ACAGTTCTTGGCGGAGGCGGAAGTGGTGGTGGCGGATCTGG TGGCGGTGGATCTGAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAG GACTTGTTCAGCCAGGCGGCTCTCTGAAGCTGTCTTGTGCCG CCTCCGGCTTCACCTTTAGCACCTACGCCATGAACTGGGTCC GACAGGCCTCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTCGGACGGAT CAGAAGCAAGTACAACAATTACGCCACCTACTACGCCGACA GCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAA GAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGACACGGCAACTTCGG CAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCA CACTGGTCACAGTTAGTTCTGGCGGCGGAGGTTCTCAGGTG CAGCTGAAACAGTCTGGCCCTGGACTGGTGCAGCCTAGCCA GTCTCTGAGCATCACCTGTACCGTGTCCGGCTTCTCCCTGAC CAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCCCCAGGCAAGG GACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACC GACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGTCCATCAACAA GGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCC TGCAGAGCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCC CTGACCTACTATGACTACGAGTTCGCCTATTGGGGACAGGG AACCCTCGTGACAGTGTCTGCCGCTAGCACAAAGGGCCCTA GCGTTTTCCCACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCGGT GGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCC CGAGCCAGTGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACAT CTGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGC CTGTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCTCT CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCC TAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGC TGCGATAAGACACACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGA GCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCC TAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCT GCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAG TTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAA GACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACGGCAGCACCTACAGA TGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGAT

		TGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA AGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCC AAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC AAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACC TGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGA ATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACA ACCCCTCCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTAC AGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCA ACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGC
143	第1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(C末端リジンに対するコドンを有する) 複合体-57	CAAGGACAATCTGGATCCGGCTATCTGTGGGGCTGCGAGTG GAATTGTGGCGGCATCACAACAGGCTCTAGCGGCGGAAGCG GAGGATCTGGTGGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCATGGC GGCGGATCCCAGACCGTGGTCACACAAGAGCCTAGCTTCTC CGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACATGCAGATCTT CTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAATTGGGTG CAGCAGACCCCTGGACAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGG CACCAACAAAAGAGCCCCTGGCGTCCCAGATAGATTCAGCG GCTCTATCCTGGGCAACAAGGCCGCACTGACAATCACAGGC GCCCAGGCCGATGACGAGAGCGATTACTATTGCGCCCTGTG GTACAGCAACCTGTGGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGA CAGTTCTTGGCGGAGGCGGAAGTGGTGGTGGCGGATCTGGT GGCGGTGGATCTGAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGG ACTTGTTCAGCCAGGCGGCTCTCTGAAGCTGTCTTGTGCCGC CTCCGGCTTCACCTTTAGCACCTACGCCATGAACTGGGTCCG ACAGGCCTCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTCGGACGGATCA GAAGCAAGTACAACAATTACGCCACCTACTACGCCGACAGC GTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGA ACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAACCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCACCAGACACGGCAACTTCGGCA ACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACA CTGGTCACAGTTAGTTCTGGCGGCGGAGGTTCTCAGGTGCA GCTGAAACAGTCTGGCCCTGGACTGGTGCAGCCTAGCCAGT CTCTGAGCATCACCTGTACCGTGTCCGGCTTCTCCCTGACCA ATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCCCCAGGCAAGGGA CTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGA CTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGTCCATCAACAAGG ACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTG CAGAGCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCT GACCTACTATGACTACGAGTTCGCCTATTGGGGACAGGGAA CCCTCGTGACAGTGTCTGCCGCTAGCACAAAGGGCCCTAGC GTTTTCCCACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCGGTGG AACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCG AGCCAGTGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCT GGCGTGCACACAT

		TTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCTGTACTCTCTGTCCA GCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACAC ACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCT TCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATG ATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGT GTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCG ACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCGA GGAACAGTACGGCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGA CAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAA GTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGA AAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCA GGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGAAAGAGATGACCAAG AATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCT TCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGA GAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGAAGTCCGACG GCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGC AGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTC TGAGCCCCGGCAAA
144	複合体-67 スペーサーを有せず、かつ末端リジンを有しない第1のポリペプチド	VSTTCWWDPPCTPNTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGS QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK GLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQ SQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

145	複合体-57 スペーサーを有せず、かつ末端リジンを有しない第1のポリペプチド	GYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGGGSQTVV TQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAPR GLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYC ALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKT EDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSQ VQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKG LEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQS QDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
146	CM	ALAHGLF
147	CM	APRSALAHGLF
148	CM	ISSGLLSGRSNI
149	CM	LSGRSNI

【０２４７】
本開示は、本明細書に記載の態様によって範囲を限定されない。実際、上述の説明及び添付の図から、記載されるものに加えて本開示の種々の修飾が当業者には明らかとなろう。かかる修飾は、添付の特許請求の範囲内に入ることが意図される。
【０２４８】
本明細書で引用された全ての参考文献（例えば、刊行物または特許もしくは特許出願）は、あたかもそれぞれ個々の参考文献（例えば、刊行物または特許もしくは特許出願）が、参照によりその全体があらゆる目的で援用されることが明確かつ個別に示された場合と同じ程度に、参照によりそれらの全体があらゆる目的で本明細書に援用される。
【０２４９】
一部の態様は、以下の特許請求の範囲内にある。

【図面】

【図１】

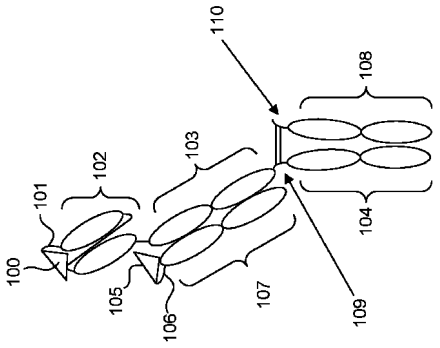
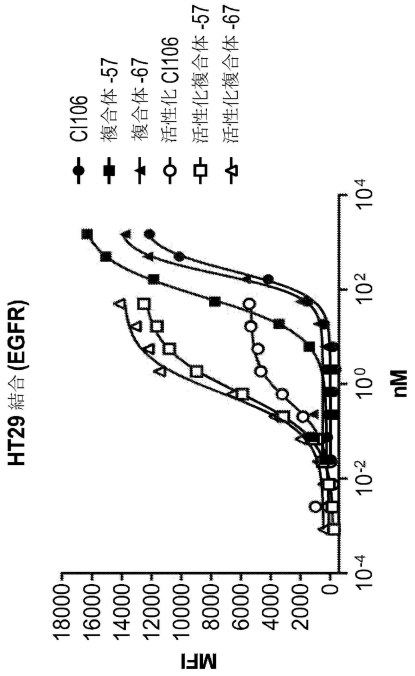
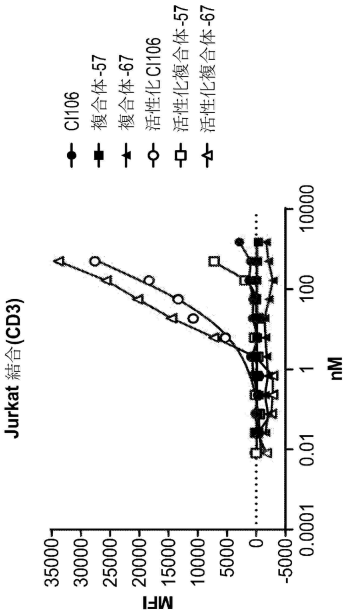


FIG. 1

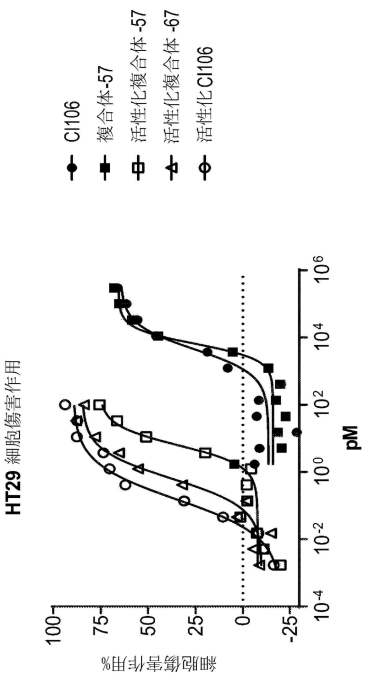
【図２Ａ】



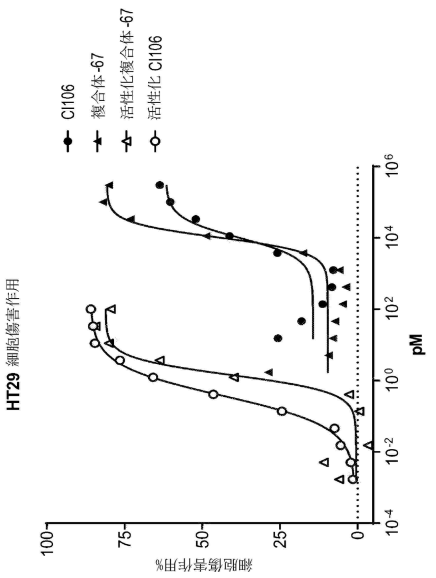
【図２Ｂ】



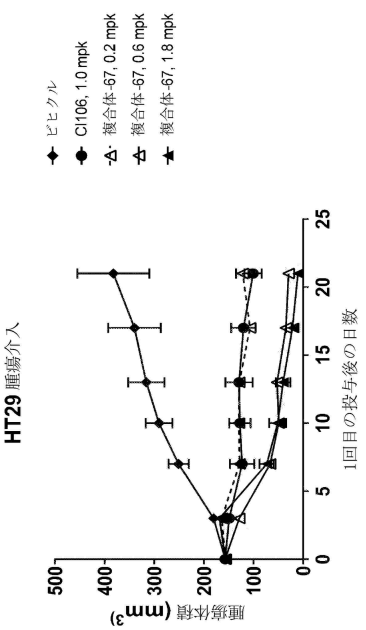
【図３Ａ】



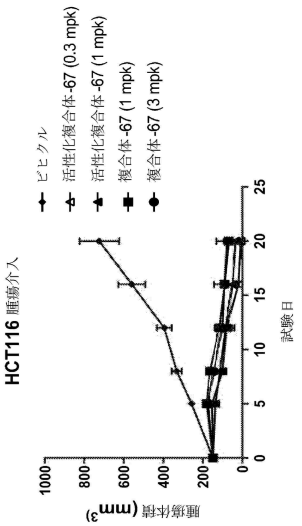
【図３Ｂ】


HT29 細胞傷害作用
細胞傷害作用%
pM
Cl106
複合体-67
活性化複合体-67
活性化 Cl106

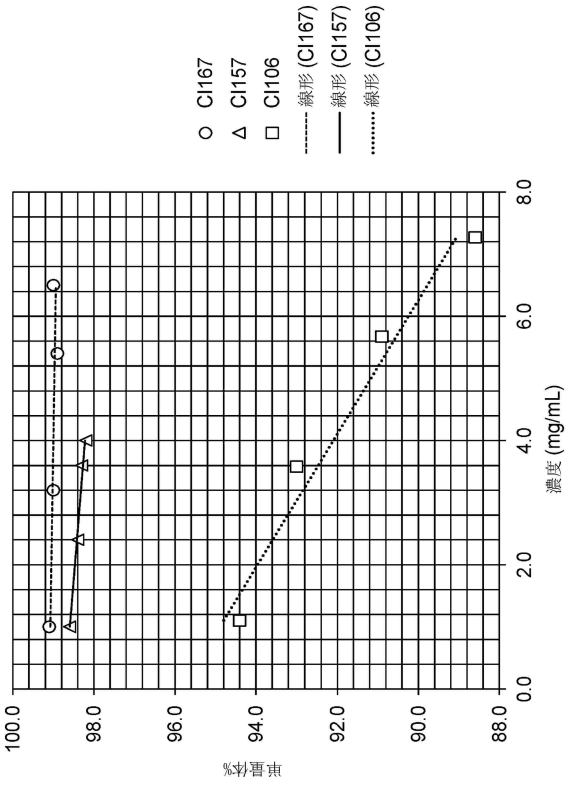
【図４】


HT29 腫瘍介入
腫瘍体積 (mm3)
1回目の投与後の日数
ビヒクル
Cl106, 1.0 mpk
複合体-67, 0.2 mpk
複合体-67, 0.6 mpk
複合体-67, 1.8 mpk

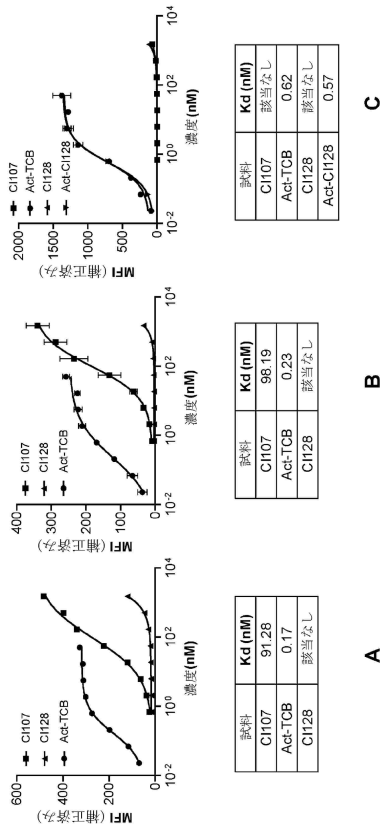
【図５】


HCT116 腫瘍介入
腫瘍体積 (mm3)
試験日
ビヒクル
活性化複合体-67 (0.3 mpk)
活性化複合体-67 (1 mpk)
複合体-67 (1 mpk)
複合体-67 (3 mpk)

【図６】


Cl167
Cl157
Cl106
線形 (Cl167)
線形 (Cl157)
線形 (Cl106)
単量体%
濃度 (mg/mL)

【図７】



試料	Kd (nM)
Cl107	91.28
Act-TCB	0.17
Cl128	該当なし

A

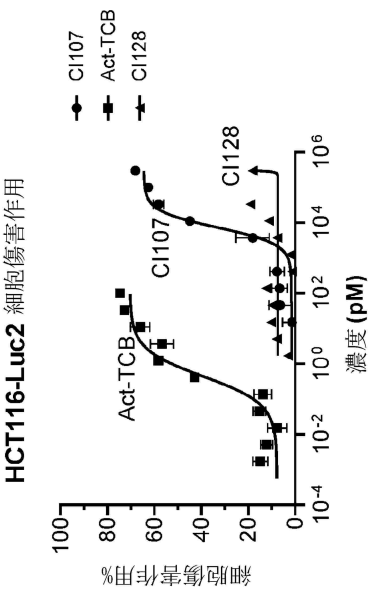
試料	Kd (nM)
Cl107	98.19
Act-TCB	0.23
Cl128	該当なし

B

試料	Kd (nM)
Cl107	該当なし
Act-TCB	0.62
Cl128	該当なし
Act-Cl128	0.57

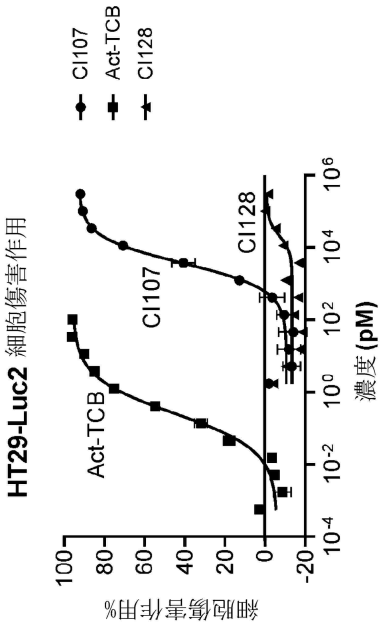
C

【図８Ａ】



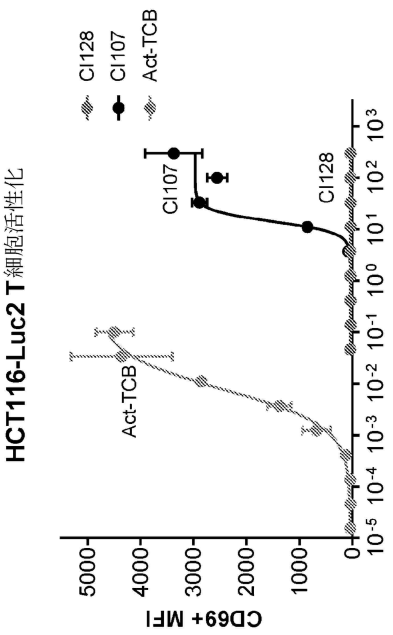
試料	EC50 (pM)
Cl107	7297
Act-TCB	0.44

【図８Ｂ】



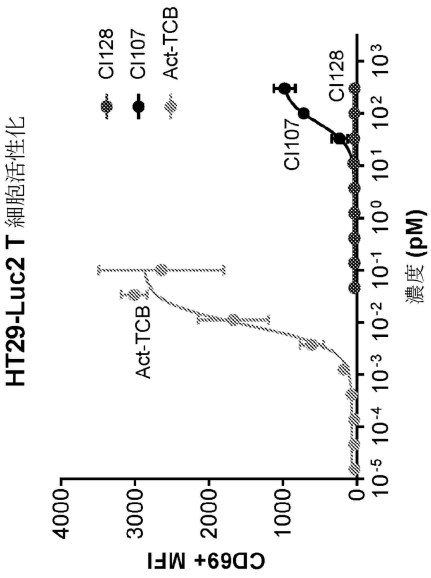
試料	EC50 (pM)
Cl107	3678
Act-TCB	0.23

【図８Ｃ】



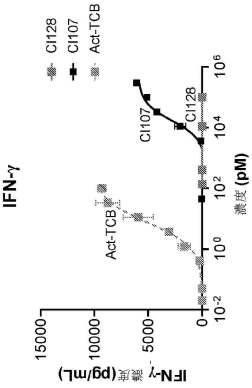
試料	EC50 (pM)
Cl107	14178
Act-TCB	7.65

【図８Ｄ】

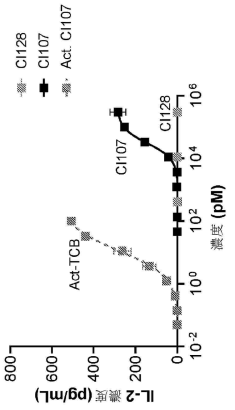


試料	EC50 (pM)
Cl107	65971
Act-TCB	8.75

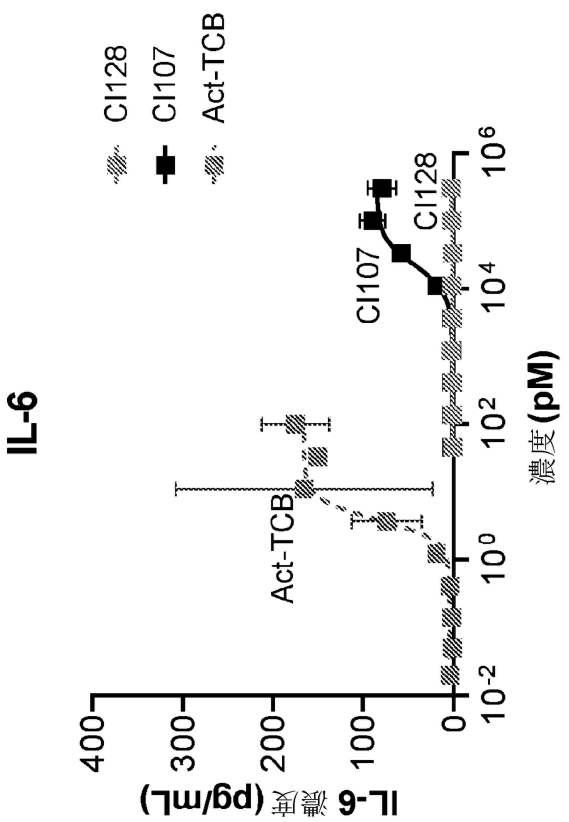
【図９Ａ】



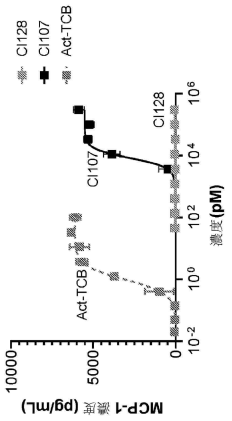
【図９Ｂ】



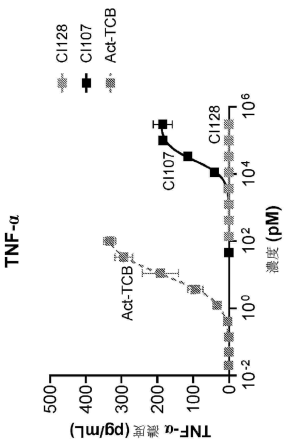
【図９Ｃ】



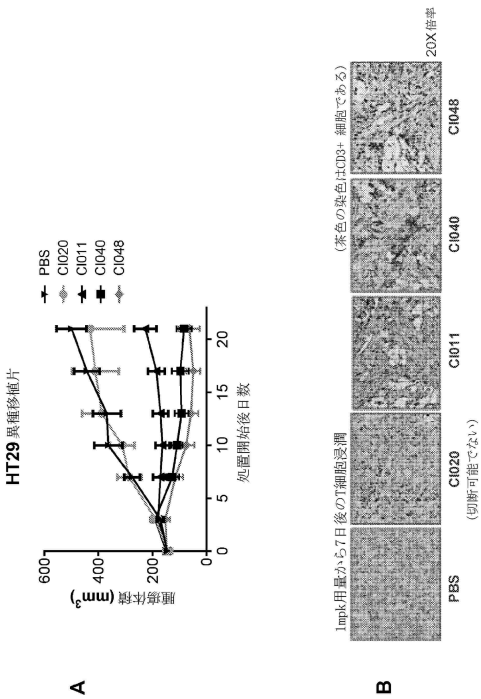
【図９Ｄ】



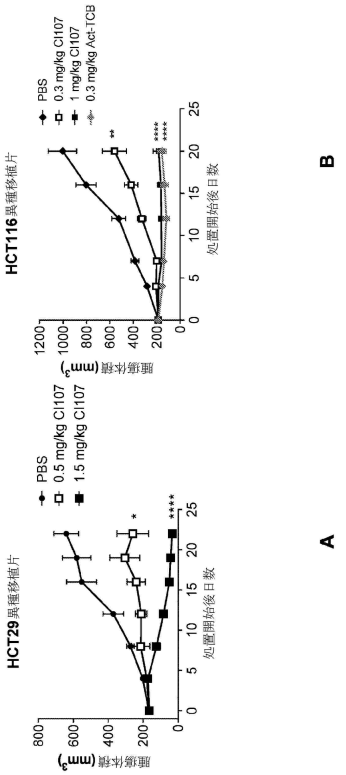
【図９Ｅ】



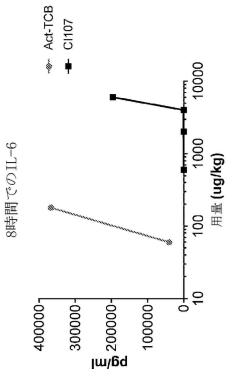
【図１０】



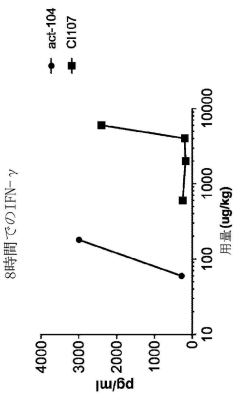
【図１１】



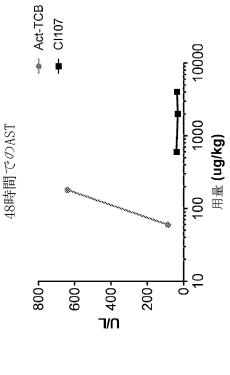
【図１２Ａ】



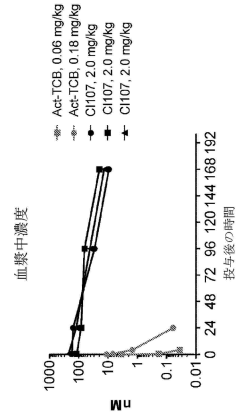
【図１２Ｂ】



【図１２Ｃ】



【図１２Ｄ】



【配列表】

<u>２０２４５３９６５０００００００１．ｘｍｌ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/078157

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/144722 A2 (AMGEN INC [US]) 18 September 2014 (2014-09-18) the whole document in particular, pages 2, 4 and 5	1-65
Y	WO 2018/045110 A1 (XENCOR INC [US]) 8 March 2018 (2018-03-08) the whole document in particular, figure 2D and page 99	1-65
Y	WO 2017/162587 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 28 September 2017 (2017-09-28) the whole document in particular, figure 1A	1-65

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 January 2023	02/02/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Pérez-Mato, Isabel

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/078157

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/075405 A1 (CYTOMX THERAPEUTICS INC [US]) 18 April 2019 (2019-04-18) cited in the application the whole document in particular, pages 2-3, 11, 33, 44, 56-62 and 71-72	1-65
Y	WO 2018/035084 A1 (EPIMAB BIOTHERAPEUTICS INC [CN]) 22 February 2018 (2018-02-22) the whole document in particular, pages 3 and 27, figure 1A	1-65
Y	WO 2021/202770 A2 (HUTCHINSON FRED CANCER RES [US]) 7 October 2021 (2021-10-07) the whole document in particular, page 37, SEQ ID NOs:161 and 162	3-5
Y	US 2017/029512 A1 (RAUM TOBIAS [DE] ET AL) 2 February 2017 (2017-02-02) the whole document in particular, page 44, SEQ ID NOs:144 and 145	10,11, 24,25
A	PHILIP D. BARDWELL ET AL: "Potent and conditional redirected T cell killing of tumor cells using Half DVD-Ig", PROTEIN & CELL, vol. 9, no. 1, 5 June 2017 (2017-06-05), pages 121-129, XP055575472, Beijing, CN ISSN: 1674-800X, DOI: 10.1007/s13238-017-0429-z the whole document in particular, pages 122-125 and figure 2A	1-65
A	JOSHUA M. DONALDSON ET AL: "Design and development of masked therapeutic antibodies to limit off-target effects: Application to anti-EGFR antibodies", CANCER BIOLOGY & THERAPY, vol. 8, no. 22, 15 November 2009 (2009-11-15), XP055274198, US ISSN: 1538-4047, DOI: 10.4161/cbt.8.22.9765 the whole document in particular, pages 2145-2146 and figure 1	1-65

-/--

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/078157

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BUSHRA HUSAIN ET AL: "Expanding the Boundaries of Biotherapeutics with Bispecific Antibodies", BIODRUGS, vol. 32, no. 5, 21 August 2018 (2018-08-21), pages 441-464, XP055678494, NZ ISSN: 1173-8804, DOI: 10.1007/s40259-018-0299-9 the whole document	1-65

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/078157

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

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

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/078157

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014144722 A2	18-09-2014	AU 2014228829 A1	10-09-2015
		BR 112015023431 A2	28-11-2017
		CA 2902961 A1	18-09-2014
		CL 2015002756 A1	15-04-2016
		CN 105229031 A	06-01-2016
		CR 20150573 A	19-11-2015
		EA 201591814 A1	31-03-2016
		EP 2970477 A2	20-01-2016
		HK 1214275 A1	22-07-2016
		JP 6535654 B2	26-06-2019
		JP 6732988 B2	29-07-2020
		JP 2016516056 A	02-06-2016
		JP 2019151634 A	12-09-2019
		KR 20150139531 A	11-12-2015
		MA 38400 A1	29-09-2017
		PE 20151998 A1	03-02-2016
		PH 12015502083 A1	18-01-2016
		SG 11201506647S A	29-09-2015
		TN 2015000379 A1	03-01-2017
		US 2014302037 A1	09-10-2014
		US 2016145340 A1	26-05-2016
		US 2018230220 A1	16-08-2018
		US 2019002568 A1	03-01-2019
		WO 2014144722 A2	18-09-2014
WO 2018045110 A1	08-03-2018	NONE	
WO 2017162587 A1	28-09-2017	AR 107946 A1	28-06-2018
		AR 120543 A2	23-02-2022
		AU 2017237376 A1	02-08-2018
		BR 112018016281 A2	02-01-2019
		CA 3012422 A1	28-09-2017
		CN 108884170 A	23-11-2018
		CO 2018007556 A2	31-07-2018
		CR 20180453 A	05-12-2018
		EP 3433280 A1	30-01-2019
		KR 20180128407 A	03-12-2018
		PE 20181891 A1	11-12-2018
		SG 11201808085W A	30-10-2018
		WO 2017162587 A1	28-09-2017
WO 2019075405 A1	18-04-2019	AU 2018347607 A1	26-03-2020
		BR 112020007309 A2	29-09-2020
		CA 3078911 A1	18-04-2019
		CN 111247171 A	05-06-2020
		EP 3694885 A1	19-08-2020
		IL 273937 A	31-05-2020
		JP 2020536549 A	17-12-2020
		KR 20200064096 A	05-06-2020
		SG 11202002384V A	29-04-2020
		TW 201927816 A	16-07-2019
		US 2019135943 A1	09-05-2019
		WO 2019075405 A1	18-04-2019
WO 2018035084 A1	22-02-2018	AU 2017312974 A1	21-02-2019
		BR 112019002579 A2	21-05-2019
		CA 3032430 A1	22-02-2018
		CN 109803682 A	24-05-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/078157

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 7033328 B2	10-03-2022
		JP 2019533985 A	28-11-2019
		RU 2019103230 A	18-09-2020
		TW 201808999 A	16-03-2018
		US 2019177439 A1	13-06-2019
		WO 2018035084 A1	22-02-2018
WO 2021202770 A2	07-10-2021	CA 3173205 A1	07-10-2021
		CN 115397515 A	25-11-2022
		EP 4126248 A2	08-02-2023
		WO 2021202770 A2	07-10-2021
US 2017029512 A1	02-02-2017	AU 2016302683 A1	04-01-2018
		BR 112018001374 A2	11-09-2018
		CA 2991278 A1	09-02-2017
		CL 2018000263 A1	05-10-2018
		CN 107922495 A	17-04-2018
		CO 2018000887 A2	19-04-2018
		CR 20180065 A	29-05-2018
		DK 3328892 T3	14-06-2021
		EP 3328892 A1	06-06-2018
		EP 3912999 A1	24-11-2021
		ES 2876348 T3	12-11-2021
		HK 1249523 A1	02-11-2018
		HU E054384 T2	28-09-2021
		IL 256872 A	29-03-2018
		JO 3788 B1	31-01-2021
		JP 6986008 B2	22-12-2021
		JP 2018524997 A	06-09-2018
		KR 20180034430 A	04-04-2018
		LT 3328892 T	10-06-2021
		MY 185953 A	14-06-2021
		PE 20181013 A1	26-06-2018
		PH 12018500156 A1	23-07-2018
		PL 3328892 T3	27-09-2021
		PT 3328892 T	14-06-2021
		SG 10202109625Y A	28-10-2021
		SI 3328892 T1	31-08-2021
		TN 2017000548 A1	12-04-2019
		TW 201716441 A	16-05-2017
		UA 124417 C2	15-09-2021
		US 2017029512 A1	02-02-2017
		US 2020140558 A1	07-05-2020
		US 2022064308 A1	03-03-2022
		WO 2017021370 A1	09-02-2017
		ZA 201708306 B	29-01-2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*1/19 (2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*1/21 (2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*5/10 (2006.01)*	C12N	5/10		
C12P	*21/08 (2006.01)*	C12P	21/08		
A61P	*35/00 (2006.01)*	A61P	35/00		
A61K	*39/395 (2006.01)*	A61K	39/395	N	
		A61K	39/395	T	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

弁理士　小田 直
(74)代理人　100202751
弁理士　岩堀 明代
(74)代理人　100208580
弁理士　三好 玲奈
(74)代理人　100191086
弁理士　高橋 香元
(72)発明者　ブースタニー，レイラ エム．
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サン フランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード，シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド内
(72)発明者　ペイドフンガット，マダン エム．
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サン フランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード，シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド内
(72)発明者　フォックス，エレイン アン マリアーノ
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サン フランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード，シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド内
(72)発明者　ミトラ，サヤンタン
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サン フランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード，シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド内
(72)発明者　カバナー，ダブリュー．マイケル
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サン フランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード，シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド内
(72)発明者　ブリアンテ，ラファエラ
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サン フランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード，シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド内

(72)発明者　スティーブンス，ジェニッテ リーアン
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９１３２０，サウザンド オークス，ワン アムジェン センター ドライブ，アムジェン インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考）　4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C085 AA16 BB11 CC23
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 FA72 FA74