(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2024-512741
(P2024-512741A)
(43)公表日　令和6年3月19日(2024.3.19)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）	
C12N 15/13	*(2006.01)*	C12N	15/13	ZNA	4B065
C12N 15/63	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4C076
C12N 1/15	*(2006.01)*	C12N	1/15		4C085
C12N 1/19	*(2006.01)*	C12N	1/19		4H045
C12N 1/21	*(2006.01)*	C12N	1/21		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全152頁）　最終頁に続く

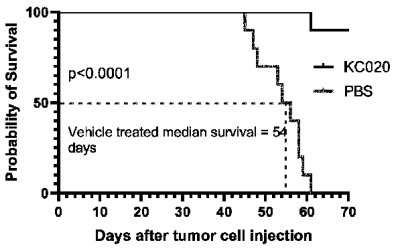
(21)出願番号　特願2023-560694(P2023-560694)
(86)(22)出願日　令和4年3月25日(2022.3.25)
(85)翻訳文提出日　令和5年11月28日(2023.11.28)
(86)国際出願番号　PCT/CA2022/050442
(87)国際公開番号　WO2022/204793
(87)国際公開日　令和4年10月6日(2022.10.6)
(31)優先権主張番号　63/168,606
(32)優先日　令和3年3月31日(2021.3.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/249,784
(32)優先日　令和3年9月29日(2021.9.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/301,305
最終頁に続く

(71)出願人　522245477
キソジ・バイオテクノロジー・インコーポレイテッド
カナダ・ケベック・Ｈ２Ｘ・３Ｐ９・モントリオール・アヴニュ・デュ・パルク・３５７６・スイート・４３１０
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広 信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部 達彦
(72)発明者　シュガン・ヤオ
カナダ・ケベック・Ｈ２Ｘ・３Ｐ９・モントリオール・アヴニュ・デュ・パルク
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　腫瘍及び／又は免疫細胞を標的化する結合剤

(57)【要約】
本開示は、概しては、腫瘍細胞及び/又は免疫細胞を標的化する能力を有する結合剤に関する。本開示の結合剤は、DR2、PD-1及び/又はCD47に結合する能力を有する重鎖抗体(HcAb)の1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む。本開示の結合剤は、単量体又は多量体の形態であってよく、単一特異性又は多特異性であってよい。

Figure 27



【特許請求の範囲】
【請求項１】
1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、
a.配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域1(CDRH1)、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域2(CDRH2)及び配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域3(CDRH3);
b.配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号5に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
c.配列番号8に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号9に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
d.配列番号11に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号12に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号13に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
e.配列番号15に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号16に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号17に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
f.配列番号18に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号19に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号20に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
g.配列番号22に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号23に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号24に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
h.配列番号25に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号26に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号27に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
i.配列番号29に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号30に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号31に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
j.配列番号32に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号33に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号34に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
k.配列番号36に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号37に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号38に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
l.配列番号39に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号40に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号41に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
m.配列番号43に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号44に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号45に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
n.配列番号46に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号47に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号48に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
o.配列番号50に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号51に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号52に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
p.配列番号53に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号54に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号55に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3;
q.配列番号7に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
r.配列番号14に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
s.配列番号21に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
t.配列番号28に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
u.配列番号35に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
v.配列番号42に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
w.配列番号49に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%

、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖;又は
　ｘ.配列番号５６に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖
を含む、結合剤。
【請求項２】
　１つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも１つが、抗原結合性ドメイン２(ＡＢＤ２)であり、
　ａ.配列番号５７に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域１(ＣＤＲＨ１)、配列番号５８に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域２(ＣＤＲＨ２)及び配列番号５９に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域３(ＣＤＲＨ３);
　ｂ.配列番号６０に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号６１に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号６２に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;又は
　ｃ.配列番号６３に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖
を含む、結合剤。
【請求項３】
　１つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも１つが、抗原結合性ドメイン３(ＡＢＤ３)であり、
　ａ.配列番号６４に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域１(ＣＤＲＨ１)、配列番号６５に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域２(ＣＤＲＨ２)及び配列番号６６に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域３(ＣＤＲＨ３);
　ｂ.配列番号６７に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号６８に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号６９に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;又は
　ｃ.配列番号７０に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖
を含む、結合剤。
【請求項４】
　１つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも１つが、
　ａ.請求項１に規定の抗原結合性ドメイン１(ＡＢＤ１)、
　ｂ.請求項２に規定の抗原結合性ドメイン２(ＡＢＤ２)、又は
　ｃ.請求項３に規定の抗原結合性ドメイン３(ＡＢＤ３)
から選択される、結合剤。
【請求項５】
　ａ.配列番号１に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域１(ＣＤＲＨ１)、配列番号２に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域２(ＣＤＲＨ２)及び配列番号３に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域３(ＣＤＲＨ３);
　ｂ.配列番号４に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号５に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号６に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
　ｃ.配列番号８に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号９に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号１０に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
　ｄ.配列番号１１に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号１２に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号１３に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
　ｅ.配列番号１５に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号１６に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号１７に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
　ｆ.配列番号１８に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号１９に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号２０に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
　ｇ.配列番号２２に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号２３に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号２４に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
　ｈ.配列番号２５に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号２６に示されるアミ

ノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号２７に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
i.配列番号２９に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号３０に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号３１に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
j.配列番号３２に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号３３に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号３４に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
k.配列番号３６に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号３７に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号３８に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
l.配列番号３９に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号４０に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号４１に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
m.配列番号４３に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号４４に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号４５に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
n.配列番号４６に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号４７に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号４８に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
o.配列番号５０に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号５１に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号５２に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
p.配列番号５３に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号５４に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号５５に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
q.配列番号７に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
r.配列番号１４に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
s.配列番号２１に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
t.配列番号２８に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
u.配列番号３５に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
v.配列番号４２に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
w.配列番号４９に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
x.配列番号５６に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
y.配列番号５７に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域１(ＣＤＲＨ１)、配列番号５８に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域２(ＣＤＲＨ２)及び配列番号５９に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域３(ＣＤＲＨ３);
z.配列番号６０に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号６１に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号６２に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
aa.配列番号６３に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖;
bb.配列番号６４に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域１(ＣＤＲＨ１)、配列番号６５に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域２(ＣＤＲＨ２)及び配列番号６６に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域３(ＣＤＲＨ３);
cc.配列番号６７に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ１、配列番号６８に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ２及び配列番号６９に示されるアミノ酸配列を有するＣＤＲＨ３;
dd.配列番号７０に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖;又は
ee.a.～dd.のいずれか１つの組合せ
を含む結合剤。

【請求項６】

1つより多くの抗原結合性ドメインを含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項７】
2個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８】
3個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９】
4個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１０】
5個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１１】
6個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む、請求項1から10のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１２】
1～12個の抗原結合性ドメインを含む、請求項1から11のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１３】
前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、腫瘍細胞に結合する能力を有する、請求項1から12のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１４】
前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、免疫調節因子に結合する能力を有する、請求項1から13のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１５】
前記免疫調節因子が免疫チェックポイントタンパク質である、請求項14に記載の結合剤。
【請求項１６】
前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、免疫細胞に結合する能力を有する、請求項1から15のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１７】
前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、免疫細胞の表面に発現されるタンパク質に結合する能力を有する、請求項1から16のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１８】
前記免疫細胞が、T細胞、NK細胞、単球又はマクロファージを含む、請求項16又は17に記載の結合剤。
【請求項１９】
1つより多くの抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが請求項1に規定の抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、且つ前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、免疫チェックポイントタンパク質に結合する能力を有する抗原結合性ドメインである、結合剤。
【請求項２０】
1つより多くの抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが請求項1に規定の抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、免疫チェックポイントタンパク質に結合する能力を有する抗原結合性ドメインであり、且つ前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、免疫細胞の表面に発現されるタンパク質に結合する能力を有する抗原結合性ドメインである、結合剤。

【請求項２１】
免疫チェックポイントタンパク質がPD-1である、請求項15から20のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２２】
免疫細胞の表面に発現されるタンパク質がCD47である、請求項17、18、20又は21のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２３】
免疫細胞の表面に発現されるタンパク質がCD3である、請求項17、18、20又は21のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２４】
少なくとも1つの抗原結合性ドメイン1(ABD1)及び少なくとも1つの抗原結合性ドメイン2(ABD2)を含む、請求項4から23のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２５】
少なくとも1つの抗原結合性ドメイン1(ABD1)及び少なくとも1つの抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含む、請求項4から23のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２６】
少なくとも1つの抗原結合性ドメイン2(ABD2)及び少なくとも1つの抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含む、請求項4から23のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２７】
少なくとも1つの抗原結合性ドメイン1(ABD1)、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン2(ABD2)及び少なくとも1つの抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含む、請求項4から23のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項２８】
1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号7に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む、結合剤。
【請求項２９】
1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号14に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む、結合剤。
【請求項３０】
1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号21に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む、結合剤。
【請求項３１】
1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号28に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む、結合剤。

【請求項３２】
1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号35に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む、結合剤。
【請求項３３】
1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号42に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む、結合剤。
【請求項３４】
1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号49に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む、結合剤。
【請求項３５】
1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む結合剤であって、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号56に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む、結合剤。
【請求項３６】
二量体化ドメインを含む、請求項1から35のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項３７】
前記二量体化ドメインが抗体又はその部分の定常領域を含む、請求項36に記載の結合剤。
【請求項３８】
前記二量体化ドメインがCH3ドメインを含む、請求項36に記載の結合剤。
【請求項３９】
前記CH3ドメインが天然CH3ドメイン又は変異型CH3ドメインである、請求項38に記載の結合剤。
【請求項４０】
前記二量体化ドメインがCH2ドメインも含む、請求項38又は39に記載の結合剤。
【請求項４１】
前記CH2ドメインが天然CH2ドメイン又は変異型CH2ドメインである、請求項40に記載の結合剤。
【請求項４２】
前記二量体化ドメインが天然CH2ドメイン及び天然CH3ドメインを含む、請求項41に記載の結合剤。
【請求項４３】
前記二量体化ドメインが天然CH2ドメイン及び変異型CH3ドメインを含む、請求項41に記載の結合剤。
【請求項４４】

前記二量体化ドメインが変異型CH2ドメイン及び天然CH3ドメインを含む、請求項41に記載の結合剤。

【請求項４５】

前記二量体化ドメインが変異型CH2ドメイン及び変異型CH3ドメインを含む、請求項41に記載の結合剤。

【請求項４６】

ヒンジ領域も含む、請求項36から45のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項４７】

前記ヒンジ領域が天然のヒンジ領域又は変異型ヒンジ領域である、請求項46に記載の結合剤。

【請求項４８】

前記抗原結合性ドメインが1つ又は複数のポリペプチド鎖上にある、請求項1から47のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項４９】

前記抗原結合性ドメインが同じポリペプチド鎖上にある、請求項1から48のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５０】

少なくとも2つのポリペプチド鎖を含む、請求項1から49のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５１】

前記結合剤が、アセンブルして二量体を形成する能力を有する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖が1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む、請求項1から50のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５２】

前記結合剤が、アセンブルして二量体を形成する能力を有する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖が異なる抗原結合性ドメインを含む、請求項1から51のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５３】

前記結合剤が、アセンブルして二量体を形成する能力を有する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖が同じ抗原結合性ドメインを含む、請求項1から52のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５４】

前記結合剤が、アセンブルして二量体を形成する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖が同一の抗原結合性ドメイン1(ABD1)を含む、請求項4から53のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５５】

前記結合剤が、アセンブルして二量体を形成する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖が同一の抗原結合性ドメイン2(ABD2)を含む、請求項4から53のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５６】

前記結合剤が、アセンブルして二量体を形成する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖が同一の抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含む、請求項4から53のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５７】

前記結合剤が、アセンブルして二量体を形成する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖が同一の抗原結合性ドメイン1(ABD1)及び同一の抗原結合性ドメイン2(ABD2)を含む、請求項4から53のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項５８】

前記結合剤が、アセンブルして二量体を形成する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖が同一の抗原結合性ドメイン1(ABD1)及び同一の抗原結

合性ドメイン3(ＡＢＤ３)を含む、請求項4から53のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項５９】
前記結合剤が、アセンブルして二量体を形成する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖が同一の抗原結合性ドメイン2(ＡＢＤ２)及び同一の抗原結合性ドメイン3(ＡＢＤ３)を含む、請求項4から53のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６０】
前記結合剤が、アセンブルして二量体を形成する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖が、同一の抗原結合性ドメイン1(ＡＢＤ１)、同一の抗原結合性ドメイン2(ＡＢＤ２)及び同一の抗原結合性ドメイン3(ＡＢＤ３)を含む、請求項4から53のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６１】
前記結合剤が、アセンブルして二量体を形成する能力を有する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖が同じである、請求項1から60のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６２】
ポリペプチド鎖の各々が、独立して、N末端からC末端への様式において式I:

$$X\text{-}[(Ab_a)\text{-}(L_b)]_m\text{-}(DD)\text{-}[(L_c)\text{-}(Ab_d)]_n\text{-}Y$$

のアミノ酸配列を含み;
mが、0、1、2又は2より大きい整数であり;
nが、0、1、2又は2より大きい整数であり;
m及びnが同時に0ではなく;
Ab_a、Ab_dが各々、抗原結合性ドメインを表し、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン1(ＡＢＤ１)、抗原結合性ドメイン2(ＡＢＤ２)又は抗原結合性ドメイン3(ＡＢＤ３)であり;
X又はYが独立して存在するか又は存在せず、アミノ酸配列を含み;
L_b、L_cが各々独立して1つ又は複数のリンカーを含み;且つ
DDが二量体化ドメインを表す、
請求項48から61のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６３】
ポリペプチド鎖が1個の抗原結合性ドメインを含む、請求項48から62のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６４】
ポリペプチド鎖が、1個より多くの抗原結合性ドメインを含む、請求項48から62のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６５】
ポリペプチド鎖が、2個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む、請求項48から62のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６６】
ポリペプチド鎖が、3個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む、請求項48から62のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６７】
ポリペプチド鎖が、4個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む、請求項48から62のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６８】
ポリペプチド鎖が、5個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む、請求項48から62のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項６９】
ポリペプチド鎖が、6個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む、請求項48から62のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項７０】

ポリペプチド鎖が、1～12個の抗原結合性ドメインを含む、請求項48から62のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項７１】

mが2又は2より大きい整数である場合、[(Ab$_a$)-(L$_b$)]単位が同じである、請求項62から70のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項７２】

mが2又は2より大きい整数である場合、[(Ab$_a$)-(L$_b$)]単位が異なる、請求項62から70のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項７３】

mが2より大きい整数である場合、[(Ab$_a$)-(L$_b$)]単位が同じ及び異なる単位を含む、請求項62から70のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項７４】

nが2又は2より大きい整数である場合、[(L$_c$)-(Ab$_d$)]単位が同じである、請求項62から73のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項７５】

nが2又は2より大きい整数である場合、[(L$_c$)-(Ab$_d$)]単位が異なる、請求項62から73のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項７６】

nが2又は2より大きい整数である場合、[(L$_c$)-(Ab$_d$)]単位が同じ及び異なる単位を含む、請求項62から73のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項７７】

mが2又は2より大きい整数である場合、各々のAb$_a$が同じ又は異なる、請求項62から70のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項７８】

nが2又は2より大きい整数である場合、各々のAb$_d$が同じ又は異なる、請求項62から70又は77のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項７９】

Ab$_a$がABD1を表す、請求項62から78のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項８０】

Ab$_d$がABD2を表す、請求項62から78のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項８１】

Ab$_d$がABD3を表す、請求項62から78のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項８２】

mが1であり、且つAb$_a$がABD1を表す、請求項62から78のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項８３】

nが2であり、且つAb$_d$のうちの1つがABD2を表す、請求項62から78のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項８４】

nが2であり、且つAb$_d$のうちの1つがABD3を表す、請求項62から78のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項８５】

nが2であり、Ab$_d$のうちの1つがABD2を表し、且つ他のAb$_d$がABD3を表す、請求項62から78のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項８６】

mが、2、3、4、5又は5より大きい整数である、請求項62から85のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項８７】

nが、3、4、5又は5より大きい整数である、請求項62から86のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項８８】
Lbが抗体又はその抗原結合性断片のヒンジ領域である、請求項62から87のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項８９】
Lcが剛性リンカーである、請求項62から88のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９０】
ポリペプチド鎖の各々が、独立して、N末端からC末端への様式において以下:
$X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y$ (式II);
$X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$ (式III);
$X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y$ (式IV);
$X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$ (式V)
$X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y$ (式VI);
$X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$ (式VII);
$X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y$ (式VIII)
のいずれか1つのアミノ酸配列を含み;
Ab_{a1}、Ab_{a2}、Ab_{a3}、Ab_{d1}、Ab_{d2}、Ab_{d3}の各々が抗原結合性ドメインを表し、前記抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つが、抗原結合性ドメイン1(ABD1)、抗原結合性ドメイン2(ABD2)又は抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり;
L_{b1}が、1つ若しくは複数のリンカー及び/又は抗体若しくはその抗原結合性断片のヒンジ領域を含み;
L_{b2}、L_{b3}、L_{c1}、L_{c2}、及びL_{c3}が、各々独立して、1つ又は複数のリンカーを含み;
且つ
DDが二量体化ドメインを表す、
請求項48から89のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９１】
ポリペプチド鎖の各々が、独立して、N末端からC末端への様式において式III
$X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$ (式III)
のアミノ酸配列を含み;
Ab_{a1}、Ab_{d1}又はAb_{d2}のうちの1つが抗原結合性ドメイン1(ABD1)を表す、
請求項48から90のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９２】
ポリペプチド鎖の各々が、独立して、N末端からC末端への様式において式III
$X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$ (式III)
のアミノ酸配列を含み;
Ab_{a1}、Ab_{d1}又はAb_{d2}のうちの1つが抗原結合性ドメイン2(ABD2)を表す、
請求項48から90のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９３】
ポリペプチド鎖の各々が、独立して、N末端からC末端への様式において式III
$X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$ (式III)
のアミノ酸配列を含み;
Ab_{a1}、Ab_{d1}又はAb_{d2}のうちの1つが抗原結合性ドメイン3(ABD3)を表す、
請求項48から90のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９４】
ポリペプチド鎖の各々が、独立して、N末端からC末端への様式において式III
$X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$ (式III)
のアミノ酸配列を含み;
Ab_{a1}、Ab_{d1}又はAb_{d2}のうちの1つが抗原結合性ドメイン1(ABD1)を表し、Ab_{a1}、

Ab_{d1}又はAb_{d2}のうちの1つが抗原結合性ドメイン2(ABD2)を表し、且つAb_{a1}、Ab_{d1}又はAb_{d2}のうちの1つが抗原結合性ドメイン3(ABD3)を表す、
請求項48から90のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９５】
ポリペプチド鎖の各々が、独立して、N末端からC末端への様式において式III
$X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$ (式III)
のアミノ酸配列を含み;
Ab_{a1}が抗原結合性ドメイン1(ABD1)を表し、Ab_{d1}が抗原結合性ドメイン2(ABD2)を表し、且つAb_{d2}が抗原結合性ドメイン3(ABD3)を表す、
請求項48から90のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９６】
ポリペプチド鎖の各々が、独立して、N末端からC末端への様式において式IIIa:
$X-(ABD1)-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(ABD2)-(L_{c2})-(ABD3)-Y$ (式IIIa)
のアミノ酸配列を含む、
請求項48から90のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９７】
ポリペプチド鎖の各々が、独立して、N末端からC末端への様式において式IIIb:
$X-(ABD1)-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(ABD3)-(L_{c2})-(ABD2)-Y$ (式IIIb)
のアミノ酸配列を含む、
請求項48から90のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９８】
二量体化ドメインが天然ヒトIgG1 CH2及び変異型IgG1 CH3を含む、請求項36から97のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項９９】
変異型IgG1 CH3が、EUナンバリングにしたがってD399、D/E356及び/若しくはK370に対応する位置における1つ若しくは複数のアミノ酸置換又はD399、E357及び/若しくはK439に対応する位置における1つ若しくは複数の変異を含む、請求項97に記載の結合剤。
【請求項１００】
前記変異型IgG1 CH3ドメインが、EUナンバリングにしたがってY349、T350、L351、P352、S354、R/Q355、T394及び/又はP395に対応する位置における1つ又は複数のアミノ酸置換を更に含む、請求項99に記載の結合剤。
【請求項１０１】
前記変異型CH3ドメインが、
d.変異D399N、D/E356Q、K370E;
e.変異D399N、K439E、E357Q;
f.変異D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及びS354K;
g.変異D399N、D/E356Q、K370E及びL351W;
h.変異D399N、D/E356Q、K370E及びS354M;
i.変異D399N、D/E356Q、K370E及びT350I;
j.変異D399N、D/E356Q、K370E及びT350V;
k.変異D399N、D/E356Q、K370E及びP352R;
l.変異D399N、D/E356Q、K370E及びP352E;
m.変異D399Q、D/E356Q及びK370E;
n.変異D399N、D/E356Q、K370E及びL351Y;
o.変異D399N、D/E356Q、K370E、及びL351H;
p.変異D399N、D/E356Q、K370E、及びR355K;
q.変異D399N、D/E356Q、K370E、及びQ355K;
r.変異D399N、D/E356Q、K370E及びS354K;
s.変異D399N、D/E356Q、K370E及びT350L;

t.変異D399N、D/E356Q、K370E及びT394N;
u.変異D399N、D/E356Q、K370E及びP352Y;
v.変異D399N、D/E356Q、K370E及びP352V;
w.変異D399N、D/E356Q、K370E及びP352T;
x.変異D399N、D/E356Q、K370E及びP352L;
y.変異D399N、D/E356Q、K370E及びP352G;
z.変異D399N、D/E356Q、K370E及びP352C;
aa.変異D399N、D/E356Q、K370E及びL351T;
bb.変異D399N、D/E356Q、K370E及びL351A;
cc.変異D399Q、E357Q、K439E、Y349D及びS354D;
dd.変異D399N、E357Q、K439E及びL351R;
ee.変異 In D399N、E357Q、K439E及びL351Y;
ff.変異D399N、E357Q、K439E及びT350I;
gg.変異D399N、E357Q、K439E及びT350V;
hh.変異D399Q、K439E、E357Q;
ii.変異D399N、K439E、E357Q、S354K;
jj.変異D399N、K439E、E357Q、S354W;
kk.変異D399N、K439E、E357Q、Y349R;
ll.変異D399N、K439E、E357Q、T350L;
mm.変異D399N、K439E、E357Q、R355W;
nn.変異D399N、K439E、E357Q、Q355W;
oo.変異D399N、K439E、E357Q、P395I;
pp.変異D399N、K439E、E357Q、P395G;
qq.変異D399N、K439E、E357Q、P395E;
rr.変異D399N、K439E、E357Q、P352K;
ss.変異D399N、K439E、E357Q、P352D;並びに
tt.変異D399N、K439E、E357Q、L351D
から選択される変異を含む、請求項99又は100に記載の結合剤。

【請求項１０２】

リンカーの各々が、独立して、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45又は50アミノ酸残基の長さを有する、請求項62から101のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１０３】

リンカーの各々が、独立して、柔軟性リンカー、らせん状リンカー、又は剛性リンカーである、請求項62から102のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１０４】

前記リンカーが柔軟性リンカーを含む、請求項103に記載の結合剤。

【請求項１０５】

前記リンカーが剛性リンカーを含む、請求項103に記載の結合剤。

【請求項１０６】

L_{c1}、L_{c2}及び/又はL_{c3}が剛性リンカーである、請求項90から105のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１０７】

前記1つ又は複数のポリペプチド鎖が抗体又はその抗原結合性断片のヒンジ領域を更に含む、請求項62から106のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１０８】

前記ヒンジ領域が二量体化ドメインのN末端にある、請求項107に記載の結合剤。

【請求項１０９】

前記ヒンジ領域が、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4からのものである、請求項107又は108に記載の結合剤。

【請求項１１０】
各々の抗原結合性ドメインが、異なるエピトープに特異的に結合する能力を有する、請求項1から109のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１１１】
各々の抗原結合性ドメインが、異なる抗原に特異的に結合する能力を有する、請求項1から110のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１１２】
各々の抗原結合性ドメインが、異なるタンパク質に特異的に結合する能力を有する、請求項1から111のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１１３】
2つのポリペプチド鎖のうちの1つが、EUナンバリングにしたがってD399、D/E356及び/又はK370に対応する位置における1つ又は複数のアミノ酸置換を含む変異型CH3ドメインを含む第1の二量体化ドメイン(DD_1)を含み;
且つ
前記2つのポリペプチド鎖のうちの他方が、EUナンバリングにしたがってD399、E357及び/又はK439に対応する位置における1つ又は複数のアミノ酸置換を含む変異型CH3ドメインを含む第2の二量体化ドメイン(DD_2)を含む、
請求項50から112のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１１４】
前記第1の二量体化ドメイン(DD_1)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q及びK370Eを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ前記第2の二量体化ドメイン(DD_2)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q及びK439Eを含む変異型CH3ドメインを含む、請求項113に記載の結合剤。
【請求項１１５】
前記第1の二量体化ドメイン(DD_1)及び/又は第2の二量体化ドメイン(DD_2)が、EUナンバリングにしたがってY349、T350、L351、P352及び/又はS354に対応する位置におけるアミノ酸置換を更に含む変異型CH3ドメインを含む、請求項113又は114に記載の結合剤。
【請求項１１６】
前記第1の二量体化ドメイン(DD_1)が、EUナンバリングにしたがって変異D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及びS354Kを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ前記第2の二量体化ドメイン(DD_2)が、EUナンバリングにしたがって変異D399Q、E357Q、K439E、Y349D及びS354Dを含む変異型CH3ドメインを含む、請求項115に記載の結合剤。
【請求項１１７】
前記第1の二量体化ドメイン(DD_1)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q、K370E及びL351Wを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ前記第2の二量体化ドメイン(DD_2)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q、K439E及びL351Rを含む変異型CH3ドメインを含む、請求項115に記載の結合剤。
【請求項１１８】
前記第1の二量体化ドメイン(DD_1)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q、K370E及びS354Mを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ前記第2の二量体化ドメイン(DD_2)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q、K439E及びL351Yを含む変異型CH3ドメインを含む、請求項115に記載の結合剤。
【請求項１１９】
前記第1の二量体化ドメイン(DD_1)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q、K370E及びT350Iを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ前記第2の二量体化ドメイン(DD_2)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q、K439E及びT350Iを含む変異型CH3ドメインを含む、請求項115に記載の結合剤。
【請求項１２０】

前記第1の二量体化ドメイン(DD_1)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q、K370E及びT350Vを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ前記第2の二量体化ドメイン(DD_2)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q、K439E及びT350Vを含む変異型CH3ドメインを含む、請求項115に記載の結合剤。

【請求項１２１】

前記第1の二量体化ドメイン(DD_1)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q、K370E及びP352Rを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ前記第2の二量体化ドメイン(DD_2)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q、K439E及びL351Rを含む変異型CH3ドメインを含む、請求項115に記載の結合剤。

【請求項１２２】

前記第1の二量体化ドメイン(DD_1)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q、K370E及びP352Eを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ前記第2の二量体化ドメイン(DD_2)が、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q、K439E及びL351Rを含む変異型CH3ドメインを含む、請求項115に記載の結合剤。

【請求項１２３】

多特異性である、請求項1から122のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１２４】

二特異性、三特異性又は四特異性である、請求項123に記載の結合剤。

【請求項１２５】

多価である、請求項1から124のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１２６】

ポリペプチド鎖が同じ価数及び特異性を有する、請求項48から124のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１２７】

ポリペプチド鎖が異なる価数及び特異性を有する、請求項48から125のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１２８】

ポリペプチド鎖の各々が抗体重鎖である、請求項48から127のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１２９】

二特異性抗体である、請求項48から128のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１３０】

前記二特異性抗体が第1の抗体軽鎖及び第2の抗体軽鎖を更に含む、請求項129に記載の結合剤。

【請求項１３１】

1つ又は複数の抗原結合性ドメインがヒト化されている、請求項1から130のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１３２】

X又はYが、リンカー、サイトカイン、ケモカイン、タグ、マスキングドメイン、ファージコートタンパク質(pIII、pVI、pV、pVII若しくはpIX)、抗原結合性ドメイン又はこれらの組合せから独立して選択される、請求項62から131のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１３３】

抗体又はその抗原結合性断片である、請求項1から132のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１３４】

抗体様分子である、請求項1から133のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１３５】

タンパク質スキャフォールドを含む、請求項1から134のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１３６】
免疫細胞調節剤を含む、請求項1から135のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１３７】
1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む結合剤であって、前記ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つが、配列番号77に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する、結合剤。
【請求項１３８】
1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む結合剤であって、前記ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つが、配列番号78に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する、結合剤。
【請求項１３９】
1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む結合剤であって、前記ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つが、配列番号79に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する、結合剤。
【請求項１４０】
1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む結合剤であって、前記ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つが、配列番号80に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する、結合剤。
【請求項１４１】
1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む結合剤であって、前記ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つが、配列番号81に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する、結合剤。
【請求項１４２】
1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む結合剤であって、前記ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つが、配列番号82に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する、結合剤。
【請求項１４３】
1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む結合剤であって、前記ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つが、配列番号83に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する、結合剤。
【請求項１４４】
1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む結合剤であって、前記ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つが、配列番号85に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する、結合剤。
【請求項１４５】
1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む結合剤であって、前記ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つが、配列番号86に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する、結合剤。
【請求項１４６】
1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む結合剤であって、前記ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つが、配列番号87に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する、結合剤。
【請求項１４７】
1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む結合剤であって、前記ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つが、配列番号88に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する、結合剤。
【請求項１４８】
前記ポリペプチド鎖が、相補性決定領域の外側にアミノ酸置換、付加又は欠失を含む、請求項137から147のいずれか一項に記載の結合剤。
【請求項１４９】

前記結合剤が、アセンブルして二量体を形成する能力を有する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖が異なる、請求項1から148のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１５０】

前記2つのポリペプチド鎖が、アセンブルしてホモ二量体を形成する能力を有する、請求項149に記載の結合剤。

【請求項１５１】

前記2つのポリペプチド鎖が、アセンブルしてヘテロ二量体を形成する能力を有する、請求項149に記載の結合剤。

【請求項１５２】

a.配列番号77に示されるアミノ酸配列を各々が有する2つのポリペプチド鎖を含む結合剤;

b.配列番号78に示されるアミノ酸配列を各々が有する2つのポリペプチド鎖を含む結合剤;

c.配列番号79に示されるアミノ酸配列を各々が有する2つのポリペプチド鎖を含む結合剤;

d.配列番号80に示されるアミノ酸配列を各々が有する2つのポリペプチド鎖を含む結合剤;

e.配列番号81に示されるアミノ酸配列を各々が有する2つのポリペプチド鎖を含む結合剤;

f.配列番号82に示されるアミノ酸配列を各々が有する2つのポリペプチド鎖を含む結合剤;

g.配列番号83に示されるアミノ酸配列を各々が有する2つのポリペプチド鎖を含む結合剤;

h.配列番号85に示されるアミノ酸配列を各々が有する2つのポリペプチド鎖を含む結合剤;

i.配列番号86に示されるアミノ酸配列を各々が有する2つのポリペプチド鎖を含む結合剤;

j.配列番号87に示されるアミノ酸配列を各々が有する2つのポリペプチド鎖を含む結合剤、又は

k.配列番号88に示されるアミノ酸配列を各々が有する2つのポリペプチド鎖を含む結合剤

から選択される結合剤。

【請求項１５３】

治療用部分にコンジュゲートされている、請求項1から152のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１５４】

検出可能な部分にコンジュゲートされている、請求項1から153のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１５５】

延長された半減期を可能とするタンパク質にコンジュゲートされている、請求項1から154のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１５６】

ナノ粒子に取り付けられている、請求項1から155のいずれか一項に記載の結合剤。

【請求項１５７】

請求項1から156のいずれか一項に記載の結合剤を含む組成物。

【請求項１５８】

単量体、二量体及びこれらの混合物を含む、請求項157に記載の組成物。

【請求項１５９】

前記組成物の70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%

より多くが二量体を含む、請求項158に記載の組成物。
【請求項１６０】
前記組成物の70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、又は99％より多くがホモ二量体を含む、請求項158に記載の組成物。
【請求項１６１】
前記組成物の70％、75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、又は99％より多くがヘテロ二量体を含む、請求項158に記載の組成物。
【請求項１６２】
請求項1から161のいずれか一項に記載の結合剤及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。
【請求項１６３】
80.0％～99.9％の純度レベルを有する結合剤を含む、請求項162に記載の医薬組成物。
【請求項１６４】
請求項1から163のいずれか一項に記載の結合剤をコードする核酸又は核酸のセット。
【請求項１６５】
請求項164に記載の核酸を含むベクター。
【請求項１６６】
請求項1から165のいずれか一項に記載の結合剤を発現する細胞。
【請求項１６７】
請求項164に記載の核酸又は請求項165に記載のベクターを含む細胞。
【請求項１６８】
請求項1から156のいずれか一項に記載の結合剤を含むキット。
【請求項１６９】
請求項164に記載の核酸、又は請求項165に記載のベクター又は請求項166若しくは167に記載の細胞を含むキット。
【請求項１７０】
請求項1から156のいずれか一項に記載の結合剤、請求項157から161のいずれか一項に記載の組成物又は請求項162若しくは163に記載の医薬組成物を投与する工程を含む、障害又は疾患を処置する方法。
【請求項１７１】
前記障害又は疾患ががんである、請求項170に記載の方法。
【請求項１７２】
前記障害又は疾患が固形腫瘍である、請求項170又は171に記載の方法。
【請求項１７３】
前記障害又は疾患が進行性転移性固形がんである、請求項170から172のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７４】
前記障害又は疾患が血液がんである、請求項170から172のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７５】
前記障害又は疾患が肺がんである、請求項170から173のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７６】
前記肺がんが小細胞肺がんである、請求項175に記載の方法。
【請求項１７７】
前記肺がんが非小細胞肺がんである、請求項175に記載の方法。
【請求項１７８】
前記肺がんが転移性である、請求項175から177のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７９】
前記障害又は疾患が骨髄腫である、請求項170から173のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１８０】
請求項164に記載の核酸又は核酸のセットを含む1つ又は複数のベクターを用いて細胞を形質転換する工程を含む、請求項1から152のいずれか一項に記載の結合剤を製造する方法。
【請求項１８１】
前記結合剤が前記細胞から精製される、請求項180に記載の方法。
【請求項１８２】
前記結合剤の純度レベルが80.0％～99.9％である、請求項181に記載の方法。
【請求項１８３】
前記結合剤を、治療用部分、検出可能な部分、延長された半減期を可能とするタンパク質とコンジュゲートするか、又はナノ粒子に取り付ける工程を更に含む、請求項180から182のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本開示は、概しては、腫瘍細胞及び/又は免疫細胞を標的化する能力を有する結合剤に関する。本開示の結合剤は、DR2、PD-1及び/又はCD47に結合する能力を有するVHH抗体の1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む。本開示の結合剤は、単量体又は多量体の形態であってよく、単一特異性又は多特異性であってよい。
【背景技術】
【０００２】
ラクダ科動物及び軟骨魚は、機能的なホモ二量体重鎖のみの抗体(HCAb)から構成される抗体を天然に産生する(Hamers-Castermanら、1993;Muyldermans及びSmider、2016)。HCAbの重鎖は第1の定常ドメイン(CH1)を欠いており、軽鎖対合に通常関与するわずか数アミノ酸の置換により古典的な抗体とは異なる(Muyldermansら、1994; Vuら、1997)。これらの置換(Val37Phe/Tyr、Gly44Glu、Leu45Arg、及びTrp47Gly)はフレームワーク領域2(FR2)中に存在する。HCAbの抗原結合性断片は、VHH又はナノボディ(登録商標)と称される。VHHは約15kDaの分子量を有し、これによりそれらは、増強された組織透過又は迅速なクリアランスを要求する適用、例えば放射性同位体ベースのイメージングに適したものとなる。しかしながら、治療適用のために、VHHの半減期は、通常、腎臓クリアランスを最小化し、且つ治療有効性を最適化するように増加させる必要がある(De Vliegerら、Antibodies 8(1)、1～22頁、2019)。VHHの半減期を増加させる方法、例えばPEG化、N-グリコシル化、HSA又は他のキャリアタンパク質との融合が活用されているが、そのような構築物は免疫原性を導入し得るか、又は成功は限定的となり得る。
【０００３】
VHHは、二特異性及び多特異性抗体を作製するためのビルディングブロックとして活用されている。一部の研究において、二価構築物は、一価形態と比較して増加したアビディティ又は親和性を有することが示されている(Conrathら、2001; Coppietersら、2006; Hmilaら、2008; Simmonsら、2006及びHultbergら、2011、Jahnichenら(2010)、Fridyら、2014)。
【０００４】
多数のVHHベースの治療剤が現在、後期治験ステージにあるか、又はFDAにより承認されている。これらとしては、血栓性血小板減少性紫斑病に対して承認された抗原vWFに対する二価単一特異性抗体カプラシズマブが挙げられる(Duggan、2018)。RSVに対する三価ナノボディ複合体、ALX-0171は、呼吸器合胞体ウイルス感染症に対して後期開発ステージにある(Detalleaら、2015)。ALX-0061は、抗原IL-6Rに対して一価であるが、半減期を延長させるためにHSAナノボディに取り付けられており、RA及びSLE適応症に対して臨床開発ステージにある(Van Royら、2015)。治験薬物ALX-0761は、抗原IL-17A、IL-17F及びHASに対する3つのナノボディを含有し、乾癬に対して開

発されている(Svecovaら、2019)。抗RANKL、ALX-0141は、抗原RANKLに対して二価であり、半減期を延長させるためにHSAに取り付けられている(Schoenら、2013)。オゾラリズマブは、抗原TNFαに対する二価ナノボディであり、半減期を延長させるためにHSAに取り付けられている(Fleischmannら、2012)。

【０００５】

本出願人は、1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含有する腫瘍細胞及び/又は免疫細胞を標的化する新規の結合剤を開発した。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００６】

【特許文献１】米国特許出願公開第2019/0010242号明細書

【特許文献２】米国特許出願公開第20110076275号明細書

【非特許文献】

【０００７】

【非特許文献１】De Vliegerら、Antibodies 8(1)、1～22頁、2019

【非特許文献２】Vincke C.ら(J. Biol Chem. 2009、284(5):3273～3284頁)

【非特許文献３】Kovalenko OVら(J Biol Chem. 2013、288:17408～17419頁)

【非特許文献４】Saunders K.O.(Front. Immunol. 10:1296頁、2019)

【非特許文献５】Ha, J-Hら(Front Immunol、2016;7:394頁)

【非特許文献６】Godar Mら(Expert Opinion on Therapeutic patents、2018;28(3):251～276頁)

【非特許文献７】Chen Xら(Adv Drug Deliv Rev. 2013;65(10):1357～1369頁)

【非特許文献８】Angal, S.ら、Mol Immunol 30、105～108頁、1993

【非特許文献９】Tatiana A. Tatusova、Thomas L. Madden (1999)、「Blast2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences」、FEMS Microbiol Lett. 174:247～250頁

【非特許文献１０】Vandesompele J.ら、Genome Biology 2002

【非特許文献１１】Hellemansら、Genome Biology, 2007

【発明の概要】

【０００８】

本開示は、概しては、特に、腫瘍細胞及び/又は免疫細胞を標的化する能力を有する結合剤に関する。

【０００９】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は、DR2、PD-1及び/又はCD47に結合する能力を有する。本開示の他の実施形態では、結合剤は、DR2を発現する細胞、PD-1を発現する細胞及び/又はCD47を発現する細胞に結合してよい。

【００１０】

一部の実施形態では、DR2を発現する細胞は腫瘍細胞を含む。

【００１１】

一部の実施形態では、PD-1を発現する細胞は免疫細胞を含む。

【００１２】

一部の実施形態では、CD47を発現する細胞は免疫細胞又は腫瘍細胞を含む。

【００１３】

よって、一部の実施形態では、結合剤は、DR2若しくはDR2を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメイン、PD-1若しくはPD-1を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメイン及び/又はCD47若しくはCD47を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメインを含んでよい。本開示によれば、結合剤はまた、追加の抗原結合性ドメインを含んでよい。

【００１４】

一部の実施形態では、DR2又はDR2を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合

性ドメインは、本明細書に記載されるような抗原結合性ドメイン1(ABD1)である。一部の実施形態では、DR2又はDR2を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメインは抗原結合性ドメイン1(ABD1)に限定されない。

【００１５】

よって、一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン1(ABD1)を含んでよい。

【００１６】

一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン1(ABD1)及び少なくとも1つの他の抗原結合性ドメインを含んでよい。

【００１７】

一部の事例では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン1(ABD1)を含んでよく、且つまた免疫細胞に結合してよい。よって、一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン1(ABD1)及び免疫細胞に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００１８】

一部の実施形態では、PD-1又はPD-1を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメインは、本明細書に記載されるような抗原結合性ドメイン2(ABD2)である。一部の実施形態では、PD-1又はPD-1を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメインは抗原結合性ドメイン2(ABD2)に限定されない。

【００１９】

よって、一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン2(ABD2)を含んでよい。

【００２０】

一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン2(ABD2)及び少なくとも1つの他の抗原結合性ドメインを含んでよい。

【００２１】

一部の事例では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン2(ABD2)を含んでよく、且つまた腫瘍細胞に結合してよい。よって、一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン2(ABD2)及び腫瘍細胞に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００２２】

一部の実施形態では、CD47又はCD47を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメインは、本明細書に記載されるような抗原結合性ドメイン3(ABD3)である。一部の実施形態では、CD47又はCD47を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメインはABD3に限定されない。

【００２３】

よって、一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含んでよい。

【００２４】

一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン3(ABD3)及び少なくとも1つの他の抗原結合性ドメインを含んでよい。

【００２５】

一部の事例では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含んでよく、且つまた腫瘍細胞に結合してよい。よって、一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン3(ABD3)及び腫瘍細胞に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。他の事例では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含んでよく、且つまた免疫細胞に結合してよい。一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン3(ABD3)及び免疫細胞に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００２６】

一部の事例では、結合剤は、DR2及びPD-1に結合する能力を有する。よって、一部の実施形態では、結合剤は、DR2に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及びPD-1に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００２７】

一部の事例では、結合剤は、DR2及びCD47に結合する能力を有する。よって、一部の実施形態では、結合剤は、DR2に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及びCD47に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００２８】

一部の事例では、結合剤は、DR2、PD-1及びCD47に結合する能力を有する。よって、一部の実施形態では、結合剤は、DR2に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン、PD-1に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及びCD47に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００２９】

一部の事例では、結合剤は、PD-1及びCD47に結合する能力を有する。よって、一部の実施形態では、結合剤は、PD-1に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及びCD47に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００３０】

一部の事例では、結合剤は、PD-1、CD47及び腫瘍細胞に結合する能力を有する。よって、一部の実施形態では、結合剤は、PD-1に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン、CD47に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及び腫瘍細胞に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００３１】

一部の事例では、結合剤は、PD-1及び腫瘍細胞に結合する能力を有する。よって、一部の実施形態では、結合剤は、PD-1に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及び腫瘍細胞に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００３２】

一部の事例では、結合剤は、CD47及び腫瘍細胞に結合する能力を有する。よって、一部の実施形態では、結合剤は、CD47に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及び腫瘍細胞に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００３３】

一部の事例では、結合剤は、CD47及び免疫細胞に結合する能力を有する。よって、一部の実施形態では、結合剤は、CD47に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及び免疫細胞に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００３４】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは抗原結合性ドメイン1(ABD1)である。

【００３５】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは抗原結合性ドメイン2(ABD2)である。

【００３６】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは抗原結合性ドメイン3(ABD3)である。

【００３７】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、

抗原結合性ドメイン1(ABD1)、

抗原結合性ドメイン2(ABD2)又は

抗原結合性ドメイン3(ABD3)

から選択される。

【００３８】

一部の実施形態では、結合剤は、ＡＢＤ１、ＡＢＤ２及びＡＢＤ３によりカバーされるもの以外のエピトープを標的化する抗原結合性ドメインを含んでよい。結合剤はそのため、ＡＢＤ１、ＡＢＤ２及び/又はＡＢＤ３の特異性と同じ又は異なる特異性を有する抗原結合性ドメインを含んでよい。

【００３９】

一部の実施形態では、結合剤は、1つより多くの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【００４０】

例えば、一部の実施形態では、結合剤は、2個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン、3個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン、4個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン、5個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン、6個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン、7個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン、8個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン、9個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン、10個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【００４１】

一部の実施形態では、結合剤は1～12個の抗原結合性ドメインを含んでよい。

【００４２】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は単一特異性であってよい。

【００４３】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は多特異性であってよい。

【００４４】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は一価であってよい。

【００４５】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は多価であってよい。

【００４６】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は単量体の形態であってよい。

【００４７】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は、二量体の形態又はより高次の形態、例えば三量体、四量体及び五量体等(例えば、多量体)であってよい。

【００４８】

一部の事例では、結合剤の抗原結合性ドメインは重鎖抗体を起源とする。一部の事例では、重鎖抗体は、ラクダ科動物又はトランスジェニック動物の免疫化により得られてよい。

【００４９】

一部の実施形態では、結合剤は、ＤＲ2に結合し、且つ本明細書に記載の相補性決定領域を含む、少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００５０】

一部の実施形態では、結合剤は、ＰＤ-1に結合し、且つ本明細書に記載の相補性決定領域を含む、少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００５１】

一部の実施形態では、結合剤は、ＣＤ47に結合し、且つ本明細書に記載の相補性決定領域を含む、少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【００５２】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは1つ又は複数のポリペプチド鎖上にある。

【００５３】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは同じポリペプチド鎖上にある。

【００５４】

一部の実施形態では、結合剤は単一のポリペプチド鎖を含む。

【００５５】

一部の実施形態では、結合剤は2つのポリペプチド鎖を含む。よって、結合剤は二量体の形態であってよい。

【００５６】
一部の実施形態では、結合剤は、2個より多くのポリペプチド鎖、例えば3個又はそれより多くのポリペプチド鎖、4個又はそれより多くのポリペプチド鎖、5個又はそれより多くのポリペプチド鎖、6個又はそれより多くのポリペプチド鎖、7個又はそれより多くのポリペプチド鎖、8個又はそれより多くのポリペプチド鎖、9個又はそれより多くのポリペプチド鎖、10個又はそれより多くのポリペプチド鎖を含む。よって、結合剤は多量体の形態であってよい。例えば、3個のポリペプチド鎖を含む結合剤は本明細書において三量体として参照され、4個のポリペプチド鎖を含む結合剤は本明細書において四量体として参照される、等である。
【００５７】
一部の実施形態では、結合剤は、アセンブルして二量体を形成する能力を有する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む。
【００５８】
一部の実施形態では、2つのポリペプチド鎖は、アセンブルして二量体を形成する能力を有し、且つ各々のポリペプチド鎖は異なる抗原結合性ドメインを含む。
【００５９】
一部の実施形態では、2つのポリペプチド鎖は、アセンブルして二量体を形成する能力を有し、且つ各々のポリペプチド鎖は同じ抗原結合性ドメインを含む。
【００６０】
一部の実施形態では、各々のポリペプチド鎖は同一の抗原結合性ドメイン1(ABD1)を含む。
【００６１】
一部の実施形態では、各々のポリペプチド鎖は同一の抗原結合性ドメイン2(ABD2)を含む。
【００６２】
一部の実施形態では、各々のポリペプチド鎖は同一の抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含む。
【００６３】
一部の例示的な実施形態では、結合剤は、アセンブルして二量体を形成する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖は同一の抗原結合性ドメイン1(ABD1)及び同一の抗原結合性ドメイン2(ABD2)を含む。
【００６４】
他の例示的な実施形態では、結合剤は、アセンブルして二量体を形成する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖は同一の抗原結合性ドメイン1(ABD1)及び同一の抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含む。
【００６５】
更なる例示的な実施形態では、結合剤は、アセンブルして二量体を形成する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖は同一の抗原結合性ドメイン2(ABD2)及び同一の抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含む。
【００６６】
いっそう更なる例示的な実施形態では、結合剤は、アセンブルして二量体を形成する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含み、且つ各々のポリペプチド鎖は、同一の抗原結合性ドメイン1(ABD1)、同一の抗原結合性ドメイン2(ABD2)及び同一の抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含む。
【００６７】
一部の事例では、抗原結合性ドメイン1(ABD1)、抗原結合性ドメイン2(ABD2)及び抗原結合性ドメイン3(ABD3)は、2つのポリペプチド鎖の各々における同じ位置を占有してよい。
【００６８】

一部の事例では、抗原結合性ドメイン1(ABD1)、抗原結合性ドメイン2(ABD2)及び抗原結合性ドメイン3(ABD3)は、2つのポリペプチド鎖の各々における異なる位置を占有してよい。

【００６９】

一部の実施形態では、結合剤の各々のポリペプチド鎖は同じである。

【００７０】

一部の実施形態では、結合剤の各々のポリペプチド鎖は異なる。

【００７１】

一部の実施形態では、2つのポリペプチド鎖は、アセンブルしてホモ二量体を形成する能力を有する。

【００７２】

一部の実施形態では、2つのポリペプチド鎖は、アセンブルしてヘテロ二量体を形成する能力を有する。

【００７３】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインはアミノ酸配列により分離されている。

【００７４】

一部の実施形態では、アミノ酸配列はリンカーである。

【００７５】

本開示の結合剤は、例えば、本明細書に開示される抗原結合性ドメイン、本明細書に開示される単一のポリペプチド鎖、本明細書に開示されるポリペプチド鎖の二量体又は本明細書に開示されるポリペプチド鎖の多量体を包含する。

【００７６】

よって、本開示の結合剤は、抗体及びその抗原結合性断片、抗体様分子(Fc、CH3融合物等)、タンパク質スキャフォールド及び免疫細胞調節剤等との融合物のフォーマットを有してよい。

【００７７】

有利には、本開示の結合剤は、2020年12月18日に出願されたPCT/CA2020/051753(その全内容は参照により本明細書に組み込まれる)において式Ia、式Ib、式Ic、式II、式III、式IV、式V、式VI、式VII若しくは式VIII等として、又は本明細書において式I、式II、式III、式IIIa及び式IIIb、式IV、式V、式VI、式VII若しくは式VIIIとして開示されるようなフォーマットを有してよい。

【００７８】

一部の実施形態では、結合剤は、1つ又は複数の抗原結合性ドメイン及び少なくとも2つのポリペプチド鎖が二量体を形成することを可能とする二量体化ドメインを含むポリペプチド鎖から構成される。

【００７９】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は、N末端からC末端への様式において式I:

$$X\text{-}[(Ab_a)\text{-}(L_b)]_m\text{-}(DD)\text{-}[(L_c)\text{-}(Ab_d)]_n\text{-}Y$$

のアミノ酸配列を各々独立して含む1つ又は複数のポリペプチド鎖を含んでよく、

mは、0、1、2又は2より大きい整数であり;

nは、0、1、2又は2より大きい整数であり;

m及びnは同時に0ではなく;

Ab_a、Ab_dは各々、抗原結合性ドメインを表し、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)、抗原結合性ドメイン2(ABD2)又は抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり;

X又はYは独立して存在するか又は存在せず、アミノ酸配列を含み;

L_b、L_cは各々独立して1つ又は複数のリンカーを含み;且つ

DDは二量体化ドメインを表す。

【００８０】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、2個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン

、3個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン、4個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン、5個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン、6個又はそれより多くの抗原結合性ドメイン等を含む。

【００８１】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は1～12個の抗原結合性ドメインを含む。

【００８２】

一部の実施形態では、結合剤は1個のポリペプチド鎖を含む。

【００８３】

一部の実施形態では、結合剤は、2個のポリペプチド鎖、3個のポリペプチド鎖、4個のポリペプチド鎖、5個のポリペプチド鎖、6個のポリペプチド鎖、7個のポリペプチド鎖、8個のポリペプチド鎖、9個のポリペプチド鎖、10個のポリペプチド鎖又は10個より多くのポリペプチド鎖を含む。

【００８４】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は共有結合的に連結されてよい。

【００８５】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は非共有結合的に連結されてよい。

【００８６】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、静電相互作用を介して会合してよい。

【００８７】

mが2又は2より大きい整数である一部の実施形態では、$[(Ab_a)-(L_b)]$単位は同じ又は異なる。

【００８８】

nが2又は2より大きい整数である一部の実施形態では、$[(L_c)-(Ab_d)]$単位は同じ又は異なる。

【００８９】

mが2又は2より大きい整数である一部の実施形態では、各々のAb_aは同じ又は異なる。

【００９０】

nが2又は2より大きい整数である一部の実施形態では、各々のAb_dは同じ又は異なる。

【００９１】

一部の実施形態では、Ab_aは、ABD1、ABD2又はABD3を表す。

【００９２】

一部の実施形態では、Ab_dは、ABD1、ABD2又はABD3を表す。

【００９３】

一部の実施形態では、Ab_dは、ABD1、ABD2又はABD3を表す。

【００９４】

実施形態では、1つ又は複数のポリペプチド鎖は抗体又はその抗原結合性断片のヒンジ領域を更に含む。例えば、一部の実施形態では、L_bは抗体又はその抗原結合性断片のヒンジ領域である。

【００９５】

一部の実施形態では、ヒンジ領域は、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4からの天然のヒンジ領域である。

【００９６】

一部の実施形態では、ヒンジ領域は、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4からの天然のヒンジ領域と少なくとも70％の同一性を有する変異型ヒンジ領域である。

【００９７】

一部の実施形態では、1つ又は複数のリンカーの各々は、独立して、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45又は50個のアミノ酸残基の長さを有する。

【００９８】

一部の実施形態では、1つ又は複数のリンカーの各々は、独立して、柔軟性リンカー、らせん状リンカー、又は剛性リンカーである。

【００９９】
一部の実施形態では、柔軟性リンカーはGSリンカーである。一部の実施形態では、柔軟性リンカーは、本明細書に記載されるような1つ又は複数のGGGGS単位を含む。
【０１００】
一部の実施形態では、剛性リンカーは本明細書に記載されるような複数のPAリピートを含む。
【０１０１】
一部の実施形態では、らせん状リンカーは本明細書に記載されるような1つ又は複数のEAAAK単位を含む。
【０１０２】
一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、式II: X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y(式II)を含む。
【０１０３】
一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、式III: X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式III)を含む。
【０１０４】
一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、式IV: X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y(式IV)を含む。
【０１０５】
一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、式V: X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式V)を含む。
【０１０６】
一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、式VI: X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y(式VI)を含む。
【０１０７】
一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、式VII: X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式VII)を含む。
【０１０８】
一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、式VIII: X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y(式VIII)を含む。
【０１０９】
一部の実施形態では、Ab_{a1}、Ab_{a2}、Ab_{a3}、Ab_{d1}、Ab_{d2}、又はAb_{d3}は、各々独立して、抗原結合性ドメインを含む。
【０１１０】
一部の実施形態では、Ab_{a1}、Ab_{a2}、Ab_{a3}、Ab_{d1}、Ab_{d2}、又はAb_{d3}は、各々独立して、抗原結合性ドメインを表す。
【０１１１】
一部の実施形態では、Ab_{a1}、Ab_{a2}、Ab_{a3}、Ab_{d1}、Ab_{d2}、又はAb_{d3}のうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)、抗原結合性ドメイン2(ABD2)又は抗原結合性ドメイン3(ABD3)である。
【０１１２】
一部の実施形態では、Ab_{a1}、Ab_{a2}、Ab_{a3}、Ab_{d1}、Ab_{d2}、又はAb_{d3}のうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)、抗原結合性ドメイン2(ABD2)又は抗原結

合性ドメイン3(ABD3)のいずれでもない。

【０１１３】

一部の実施形態では、L_{b1}は1つ若しくは複数のリンカー及び/又は抗体若しくはその抗原結合性断片のヒンジ領域を含む。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、本明細書に開示されるような天然のヒンジ領域である。他の実施形態では、ヒンジ領域は、本明細書に開示されるような変異型ヒンジ領域である。

【０１１４】

一部の実施形態では、L_{b2}、L_{b3}、L_{c1}、L_{c2}、及びL_{c3}は、各々独立して、本明細書に開示されるような1つ又は複数のリンカーを含む。

【０１１５】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、本明細書に開示されるような抗原結合性ドメインABD1及び免疫細胞に結合する抗原結合性ドメインを含む。

【０１１６】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、本明細書に開示されるような抗原結合性ドメインABD2及び腫瘍細胞に結合する抗原結合性ドメインを含む。

【０１１７】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、本明細書に開示されるような抗原結合性ドメインABD3及び腫瘍細胞に結合する抗原結合性ドメインを含む。

【０１１８】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、本明細書に開示されるような抗原結合性ドメインABD3及び免疫細胞に結合する抗原結合性ドメインを含む。

【０１１９】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、本明細書に開示されるようなABD1、ABD2及びABD3から選択される少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含む。

【０１２０】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、本明細書に開示されるようなABD1、ABD2及びABD3から選択される少なくとも2つの抗原結合性ドメインを含む。

【０１２１】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、本明細書に開示されるようなABD1、ABD2及びABD3から選択される少なくとも3つの抗原結合性ドメインを含む。

【０１２２】

一部の実施形態では、二量体化ドメインは免疫グロブリン二量体化ドメインを含む。ロイシンジッパー等を含む、当業者に公知の他の二量体化ドメインが本明細書において想定される。

【０１２３】

一部の実施形態では、二量体化ドメインは、IgG、IgM、IgA、IgD又はIgE二量体化ドメイン(ヒト又は動物IgG、IgM、IgA、IgD又はIgEからのもの)を含む。

【０１２４】

一部の実施形態では、二量体化ドメインは抗体のCH3ドメインを含む。二量体化ドメインはまた、抗体のCH2ドメインを含んでよい。

【０１２５】

一部の例示的な実施形態では、二量体化ドメインは天然CH3ドメインを含む。

【０１２６】

一部の例示的な実施形態では、二量体化ドメインは変異型CH3ドメインを含む。

【０１２７】

一部の実施形態では、二量体化ドメインは天然CH2及び天然CH3ドメインを含む。

【０１２８】

一部の実施形態では、二量体化ドメインは天然CH2及び変異型CH3ドメインを含む。

【０１２９】

一部の実施形態では、二量体化ドメインは変異型CH2及び変異型CH3ドメインを含む。

【０１３０】
一部の実施形態では、二量体化ドメインは変異型CH2及び天然CH3ドメインを含む。
【０１３１】
一部の実施形態では、二量体化ドメインはCH1ドメインを含まない。
【０１３２】
一部の実施形態では、二量体化ドメインはCH4ドメインを含まない。
【０１３３】
一部の実施形態では、二量体化ドメインは抗体又はその部分のFc領域を含む。
【０１３４】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、少なくとも2つ又は少なくとも3つの抗原結合性ドメイン並びに2つのポリペプチド鎖のアセンブリーにより多価及び/又は多特異性結合剤を形成することを可能とする二量体化ドメインを含む。
【０１３５】
実施形態では、抗原結合性ドメインは単一ドメイン抗体(sdAb)の抗原結合性ドメインを含む又はからなる。
【０１３６】
実施形態では、抗原結合性ドメインは重鎖可変領域(VH又はVHH)を含む。
【０１３７】
一部の実施形態では、VHHは、ヒト、マウス、ラット等に由来する。
【０１３８】
一部の実施形態では、VHHは、ラクダ化マウス若しくはラットVHH、他の種(例えば、ヒト等)からのVHH又は他の種からのラクダ化VHH(例えば、ラクダ化ヒトVHH等)を発現する能力を有するトランスジェニックマウス又はラットからのものである。
【０１３９】
一部の実施形態では、結合剤は軽鎖可変領域(VL又はVLL)を含まない。
【０１４０】
実施形態では、結合剤は軽鎖可変領域(VL又はVLL)を含む。
【０１４１】
実施形態では、抗原結合性ドメインは単鎖可変断片(ScFv)である。
【０１４２】
実施形態では、抗原結合性ドメインはV_{NAR}断片からのものである。
【０１４３】
他の実施形態では、ポリペプチド鎖の抗原結合性ドメインは、単一ドメイン抗体(sdAb)、重鎖可変領域(VH若しくはVHH)、軽鎖可変領域(VL若しくはVLL)、単鎖可変断片(ScFv)及び/又はV_{NAR}断片のいずれかの抗原結合性ドメインの組合せを含む。
【０１４４】
一部の実施形態では、sdAb又はVHHはラクダ科動物抗体からのものである。
【０１４５】
実施形態では、ラクダ科動物抗体は、ヒトコブラクダ、ラクダ、ラマ、アルパカ等からのものである。
【０１４６】
他の実施形態では、sdAb又はVHHは軟骨魚抗体からのものである。
【０１４７】
実施形態では、軟骨魚抗体はサメ抗体である。
【０１４８】
一部の実施形態では、各々の抗原結合性ドメインは、異なるエピトープに特異的に結合する。
【０１４９】
他の実施形態では、各抗原結合性ドメインは異なる抗原に特異的に結合する。
【０１５０】

更に他の実施形態では、各抗原結合性ドメインは異なるタンパク質に特異的に結合する。

【０１５１】

一部の実施形態では、結合剤は、腫瘍により発現されるタンパク質に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、腫瘍により発現されるタンパク質に結合し、その活性をモジュレートする少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１５２】

一部の実施形態では、結合剤は、免疫チェックポイントタンパク質に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、免疫チェックポイントタンパク質に結合し、その活性をモジュレートする少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１５３】

一部の実施形態では、結合剤は、免疫細胞タンパク質に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、免疫細胞タンパク質に結合し、その活性をモジュレートする少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、免疫細胞に結合又はエンゲージメントし、免疫細胞を動員又は再方向付けする少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１５４】

一部の実施形態では、結合剤は、末梢血単核細胞(ＰＢＭＣ)に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、ＰＢＭＣに結合し、その活性をモジュレートする少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、ＰＢＭＣに結合し、ＰＢＭＣを動員又は再方向付けする少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１５５】

一部の実施形態では、結合剤は、T細胞タンパク質に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、T細胞タンパク質に結合してよく、その活性をモジュレートしてよい。更に他の実施形態では、結合剤は、T細胞タンパク質に結合してよく、T細胞を動員又は再方向付けしてよい。一部の実施形態では、結合剤は、活性化T細胞に結合してよく、且つ/又は活性化T細胞の活性をモジュレートしてよい。

【０１５６】

一部の実施形態では、結合剤は、腫瘍により発現されるタンパク質に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及び免疫細胞に結合し、免疫細胞を動員又は再方向付けする少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１５７】

一部の実施形態では、結合剤は、腫瘍により発現されるタンパク質に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン、免疫チェックポイントタンパク質に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及び免疫細胞に結合し、免疫細胞を動員又は再方向付けする少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１５８】

一部の実施形態では、結合剤は、免疫チェックポイント阻害剤をモジュレートする少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１５９】

一部の実施形態では、結合剤は、腫瘍抗原に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン、免疫チェックポイントタンパク質に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及びT細胞に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１６０】

一部の実施形態では、結合剤は、腫瘍抗原に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメ

インCD47に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１６１】

一部の実施形態では、結合剤は、CD47の機能をモジュレートする少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１６２】

一部の実施形態では、結合剤は、CD47に結合し、SIRPα/CD47相互作用を遮断することによりマクロファージ機能を増強する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１６３】

一部の実施形態では、結合剤は、受容体に特異的に結合する抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１６４】

一部の実施形態では、結合剤は、腫瘍抗原に特異的に結合する抗原結合性ドメイン及び免疫調節因子に特異的に結合する抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０１６５】

一部の実施形態では、腫瘍抗原に特異的に結合する抗原結合性ドメインは二量体化ドメインのN末端側にあり、且つ免疫調節因子に特異的に結合する抗原結合性ドメインは二量体化ドメインのC末端側にある。

【０１６６】

一部の実施形態では、免疫調節因子は、免疫チェックポイントタンパク質、サイトカイン、ケモカイン又は免疫受容体若しくは補助受容体である。

【０１６７】

所与の抗原結合性ドメインは、異なるタンパク質中に存在するエピトープに結合してよいことが本明細書において理解されるべきである。そのため、一部の実施形態では、抗原結合性ドメイン、又はそれを含む結合剤は、1つより多くのタンパク質に結合してよい。一部の実施形態では、抗原結合性ドメイン、又は結合剤は、1つより多くのタンパク質に対して親和性を有してよい。

【０１６８】

一部の実施形態では、結合剤は、二量体を形成する能力を有する少なくとも2つのポリペプチド鎖を含む。

【０１６９】

一部の実施形態では、2つのポリペプチド鎖は同じである。

【０１７０】

一部の実施形態では、2つのポリペプチド鎖は異なる。

【０１７１】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は同じであり、且つ結合剤はホモ二量体である。

【０１７２】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は異なり、且つ結合剤はヘテロ二量体である。

【０１７３】

一部の実施形態では、結合剤は多特異性である。

【０１７４】

一部の実施形態では、結合剤は、二特異性、三特異性又は四特異性である。

【０１７５】

一部の実施形態では、結合剤は、多特異性である1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む。

【０１７６】

一部の実施形態では、結合剤は、二特異性、三特異性又は四特異性である1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む。

【０１７７】
一部の実施形態では、1つ又は複数のポリペプチド鎖は同じ価数及び特異性を有する。
【０１７８】
一部の実施形態では、1つ又は複数のポリペプチド鎖は異なる価数及び特異性を有する。
【０１７９】
一部の実施形態では、1つ又は複数のポリペプチド鎖の各々は抗体重鎖である。
【０１８０】
抗体又はその抗原結合性断片である、先行する請求項のいずれか一項に記載の結合剤。
【０１８１】
一部の実施形態では、結合剤は二特異性抗体である。
【０１８２】
一部の実施形態では、二特異性抗体は第1の抗体軽鎖及び第2の抗体軽鎖を更に含む。
【０１８３】
一部の実施形態では、抗原結合性ドメインのうちの1つ又は複数はヒト化されている。
【０１８４】
一部の実施形態では、抗原結合性ドメインのうちの1つ又は複数は部分的にヒト化されている。
【０１８５】
一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは1つ又は複数のヒトフレームワークを含む。
【０１８６】
一部の実施形態では、X又はYは、リンカー、サイトカイン、ケモカイン、タグ、マスキングドメイン、ファージコートタンパク質(pIII、pVI、pV、pVII若しくはpIX)、抗原結合性ドメイン又はこれらの組合せから独立して選択される。
【０１８７】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、治療用部分にコンジュゲートされている。
【０１８８】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、検出可能な部分にコンジュゲートされている。
【０１８９】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、延長された半減期を可能とするタンパク質にコンジュゲートされている。
【０１９０】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖はナノ粒子に取り付けられている。
【０１９１】
本開示の他の態様及び実施形態は、本明細書に開示される結合剤のうちの少なくとも1つを含む組成物に関する。
【０１９２】
一部の実施形態では、組成物は、単量体、二量体及びこれらの混合物を含む。
【０１９３】
一部の実施形態では、第1及び第2のポリペプチド鎖の70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%より多くは組成物中で二量体として存在する。
【０１９４】
一部の実施形態では、第1及び第2のポリペプチド鎖の70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%より多くは組成物中でホモ二量体として存在する。
【０１９５】
一部の実施形態では、第1及び第2のポリペプチド鎖の70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%より多くは組成物中でヘテロ二量体として存在

する。
【０１９６】
本開示の他の態様及び実施形態は、本明細書に開示される結合剤及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。
【０１９７】
本開示の更に他の態様及び実施形態は、本明細書に開示されるポリペプチド鎖及び/又は結合剤をコードする核酸又は核酸のセットに関する。
【０１９８】
核酸は、本明細書に開示されるＤＮＡセグメントの形態であってよい。
【０１９９】
本開示の追加の態様及び実施形態は、本明細書に開示される核酸を含むベクター又は本明細書に開示される核酸を各々が含むベクターのセットに関する。
【０２００】
本開示の更なる態様及び実施形態は、本明細書に開示されるポリペプチド鎖又は結合剤を発現する細胞に関する。
【０２０１】
本開示の追加の態様及び実施形態は、本明細書に開示される核酸又はベクターを含む細胞に関する。
【０２０２】
本開示の更なる態様及び実施形態は、本明細書に開示される結合剤を含むキットに関する。
【０２０３】
本開示のいっそう更なる態様及び実施形態は、本明細書に開示される核酸を含むキットに関する。
【０２０４】
本開示のいっそう更なる態様及び実施形態は、本明細書に開示されるベクターを含むキットに関する。
【０２０５】
本開示のいっそう更なる態様及び実施形態は、本明細書に開示される細胞を含むキットに関する。
【０２０６】
追加の態様及び実施形態では、本開示は、本明細書に開示される結合剤を投与することを含む、障害又は疾患を処置する方法に関する。
【０２０７】
更なる態様及び実施形態では、本開示は、本明細書に開示される組成物を投与することを含む、障害又は疾患を処置する方法に関する。
【０２０８】
更なる態様及び実施形態では、本開示は、本明細書に開示される医薬組成物を投与する工程を含む、障害又は疾患を処置する方法に関する。
【０２０９】
一部の実施形態では、障害又は疾患はがんである。
【０２１０】
一部の実施形態では、障害又は疾患は固形腫瘍である。
【０２１１】
一部の実施形態では、障害又は疾患は進行性転移性固形がんである。
【０２１２】
一部の実施形態では、障害又は疾患は血液がん(hematogenous cancer)である。
【０２１３】
一部の実施形態では、障害又は疾患は肺がんである。
【０２１４】

一部の実施形態では、肺がんは転移性である。
【０２１５】
一部の実施形態では、障害又は疾患は小細胞肺がんである。
【０２１６】
一部の実施形態では、障害又は疾患は非小細胞肺がんである。
【０２１７】
一部の実施形態では、障害又は疾患は骨髄腫である。
【０２１８】
一部の実施形態では、障害又は疾患は前立腺がんである。
【０２１９】
一部の実施形態では、障害又は疾患は乳がんである。
【０２２０】
一部の実施形態では、障害又は疾患は直腸がんである。
【０２２１】
一部の実施形態では、障害又は疾患は膵臓がんである。
【０２２２】
一部の実施形態では、障害又は疾患は神経膠芽腫である。
【０２２３】
一部の実施形態では、障害又は疾患は感染症である。
【０２２４】
一部の実施形態では、障害又は疾患は免疫調節異常である。
【０２２５】
他の態様及び実施形態では、本開示は、本明細書に開示される核酸を含む1つ又は複数のベクターを用いて細胞を形質転換させる工程を含む、本明細書に開示される結合剤を製造する方法に関する。
【０２２６】
一部の実施形態では、方法は、結合剤を不純物から単離及び/又は精製することを更に含んでよい。
【０２２７】
他の実施形態では、方法は、ヘテロ二量体を単量体及び/又はホモ二量体から単離及び/又は精製することを更に含んでよい。
【０２２８】
他の実施形態では、方法は、ホモ二量体を単量体及び/又はヘテロ二量体から単離及び/又は精製することを更に含んでよい。
【０２２９】
一部の実施形態では、方法は、結合剤を、治療用部分、検出可能な部分、若しくは延長された半減期を可能とするタンパク質と、又はナノ粒子にコンジュゲートする工程を更に含む。
【０２３０】
本開示の更なる範囲、応用可能性及び利点は、以下に与えられる非制限的な詳細な説明から明らかとなるであろう。しかしながら、この詳細な説明は、本開示の例示的な実施形態を指し示すが、添付の図面を参照して、単なる例として与えられることが理解されるべきである。
【図面の簡単な説明】
【０２３１】
【図１】D2プロテオリポソームに関するD2特異的結合剤(VHH-ヒンジ-CH2-CH3)の結合曲線を表すグラフ。Mockプロテオリポソームを陰性対照として含めた。
【図２】様々なGタンパク質センサーをトランスフェクトしたGPCR BRETアッセイにおけるD2特異的結合剤(VHH-ヒンジ-CH2-CH3)のEC50を列記する表。Gαz、Gαi2、GαoA、及びBarr2を含むGタンパク質を用いたGPCR応答を示すためにドーパミンを陽性

対照として使用した。陰性対照は、配列番号114に示される抗原結合性ドメインを含む4HEM特異的結合剤(VHH-ヒンジ-CH2-CH3)(KC018)である。
【図３】D2特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(VHH-ヒンジ-CH2-CH3)(KC013;配列番号73)を用いた処理でのNCI-H69細胞における遺伝子発現の変化を示すヒートマップ。陰性対照は、配列番号114に示される抗原結合性ドメインを含む4HEM特異的結合剤(VHH-ヒンジ-CH2-CH3)(KC018)である。
【図４】図3のRNAseq結果のPANTHER解析からの下方調節されたシグナル伝達経路及びタンパク質クラスを表すグラフ。
【図５】D2特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(VHH-ヒンジ-CH2-CH3)(KC013;配列番号73)を用いた処理でのNCI-H69(図5A)、NCI-H82(図5B)、及びHEK-D2(図5C)におけるqRT-PCRにより検証された下方調節された遺伝子を表すグラフ。
【図６】単回用量注射(図6A: IV注射)(図6B: IP注射)を用いたSCIDマウスにおけるD2特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(VHH-ヒンジ-CH2-CH3)(KC013;配列番号73)及びトラスツズマブの薬物動態を表すグラフ。
【図７】NCI-H727腫瘍予防モデル(図7A)、NCI-H69腫瘍予防モデル(図7B)又はNCI-H510A腫瘍予防モデル(図7C)における、アイソタイプ対照(破線)と比較した小細胞肺がん(SCLC)異種移植片モデルを有するNCGマウスにおけるD2特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(VHH-ヒンジ-CH2-CH3、実線)(KC013;配列番号73)の腫瘍動態及びin vivo有効性を示すグラフ。陰性対照は、配列番号114に示される抗原結合性ドメインを含む4HEM特異的結合剤(VHH-ヒンジ-CH2-CH3)(KC018)である。
【図８】配列番号71(KC011)、配列番号72(KC012)、配列番号73(KC013)、又は配列番号74(KC014)に示されるアミノ酸配列を含むD2特異的結合剤(VHH-ヒンジ-CH2-CH3)を用いた処置でのSCIDマウスにおける様々な腫瘍予防SCLC腫瘍モデルにおける腫瘍増殖阻害のパーセンテージを列記する表。
【図９Ａ】ヒト、カニクイザル、及びラット組換えPD1タンパク質又は対照タンパク質(BSA)に関するPD-1特異的結合剤(KC036;配列番号94)の結合曲線を示すグラフ。陰性対照は、HEWL特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC035:配列番号93)である。
【図９Ｂ】抗PD-1抗体ペムブロリズマブ(陽性対照)と比較したヒト組換えPD1タンパク質に関するPD-1特異的結合剤(KC036;配列番号94)の結合曲線を示すグラフ。陰性対照は、HEWL特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC035:配列番号93)である。
【図９Ｃ】ヒト組換えCD47タンパク質に関するCD47特異的結合剤(KC015;配列番号75)の結合曲線を示すグラフ。KC015の陰性対照は、HEWL特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC016:配列番号76)である。陽性対照はモノクローナル抗体クローンB6H12である。クローンB6H12のアイソタイプ対照をマウスIgGアイソタイプ対照抗体として使用している。
【図９Ｄ】カニクイザルCD47タンパク質に関するCD47特異的結合剤KC015の結合曲線を示すグラフ。陰性対照KC016は、HEWL特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤である。陽性対照はモノクローナル抗体クローンB6H12である。クローンB6H12のアイソタイプ対照をマウスIgGアイソタイプ対照抗体として使用している。
【図９Ｅ】T細胞、単球、顆粒球、赤血球細胞(RBC)、及び血小板を含む様々な血液細胞サブタイプに関するCD47特異的結合剤KC015の結合曲線を表すグラフ。
【図１０】フローサイトメトリーにより得られたCHO-PD1細胞(図10B)及びCHO親細胞(図10A)に関するPD-1特異的結合剤(KC036;配列番号94)の細胞結合活性を表すグラフ。商業的に入手可能なPD-1抗体を陽性対照として使用している。陰性対照は、HEWL特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC035:配列番号93)である。
【図１１】CD3サブユニットを介してT細胞を活性化させるために使用されたインキュベーションの48時間後のCD33 BiTEの存在下で又は対照BiTEの存在下でPD-1特異的結合剤(KC036;配列番号94)により誘導されたPBMC媒介性THP-1死の細胞傷害性データを表すグラフ。陰性対照は、HEWL特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC031:配列番号89)である。陽性対照はペムブロリズマブ及びニボルマブを含む。

【図１２】PD-1/PD-L1遮断バイオアッセイシステムを使用したPD-1特異的結合剤(KC036;配列番号94)のチェックポイント阻害活性を示すグラフ。このシステムは、NFATプロモーター下でルシフェラーゼレポーターを発現する操作されたJurkat細胞株である。陰性対照は、HEWL特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC035:配列番号93)である。抗PD-1抗体ペムブロリズマブを陽性対照として使用している。

【図１３】HEK293T細胞及びHEK293T-CD47 KO細胞(CD47ノックアウト細胞)に対する抗D2、抗PD-1及び抗CD47抗原結合性ドメインを含む三特異性結合剤(KC020;配列番号77)の他に、同じ抗CD47抗原結合性ドメインを含む単一特異性結合剤(KC015:配列番号75、VHH-ヒンジ-CH2-CH3)の結合データを表すグラフ。陰性対照は、抗HEWL抗原結合性ドメインを含む対応するフォーマット(KC016(配列番号76)及びKC039(配列番号97))を含む。商業的に入手可能な抗ヒトCD47抗体(クローンCC2C6)を陽性対照として使用している。

【図１４】抗HEWL抗原結合性ドメイン(KC035:配列番号93)又は抗CD3及び抗HEWL抗原結合性ドメイン(KC034;配列番号92)を含む対照結合剤と比較したヒトT細胞に関する抗D2、及び抗CD47抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC040:配列番号84)の結合を表すグラフ。

【図１５】ヒトT細胞に関する抗D2、及び抗CD47抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC040:配列番号84)により誘導された5:1のE:T比でのT細胞活性化(図15A)及びT細胞依存性細胞傷害性(図15B)を表すグラフ。対照は、培地単独(陰性対照)、抗HEWL抗原結合性ドメイン及び同じ抗D2抗原結合性ドメインを含む結合剤(陰性対照KC032;配列番号90)並びにOKT3(陽性対照)を含む。

【図１６】コンカナバリンAの存在下又は非存在下でのD2及びCD47特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC040:配列番号84)を用いた処理でのT細胞活性化を図示するグラフ。対照は、HEWL特異的抗原結合性ドメイン(KC035:配列番号93)若しくは抗CD3及び抗HEWL抗原結合性ドメイン(陽性対照KC034;配列番号92)を含む結合剤又はOKT3(陽性対照)を含む。

【図１７】Promega社CD47/SIRPα遮断バイオアッセイシステムを使用したCD47特異的結合剤(KC015;配列番号75)のチェックポイント阻害活性を示すグラフ。このシステムは、FcγRをエンゲージメントするFcγRタンパク質により誘導されるルシフェラーゼレポーターを発現する操作されたTHP-1細胞株である。陰性対照は、HEWL特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC016:配列番号76)である。陽性対照はモノクローナル抗体クローンB6H12である。クローンB6H12のアイソタイプ対照はマウスIgGアイソタイプ対照抗体である。

【図１８】NCGマウスにおける確立されたNCI-H82異種移植片モデルにおける抗D2、抗PD-1及び抗CD47抗原結合性ドメインを含む三特異性結合剤(KC021:配列番号78)を用いた処置での腫瘍体積を表すグラフ。陰性対照は、HEWL特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC031:配列番号89)を含む。

【図１９】抗D2及び抗PD-1抗原結合性ドメイン(KC037;配列番号95)、抗PD-1及び抗CD47抗原結合性ドメイン(KC038;配列番号96)を含む結合剤若しくは同じ抗D2、抗PD1及び抗CD47抗原結合性ドメインを含む三特異性結合剤(KC020;配列番号77及びKC021:配列番号78)を用いた処理でのNCI-H69細胞クラスター中へのT細胞浸潤(図19A)又は同じ剤を用いたT細胞活性化(図19B)を表すプロット。対照は、HEWL特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC035:配列番号93)を含む。

【図２０】異なる抗D2、並びに同じ抗PD-1及び抗CD47抗原結合性ドメインを含む三特異性結合剤(KC020;配列番号77、KC022;配列番号79、KC023;配列番号80、KC024;配列番号81、KC025;配列番号82、KC026;配列番号83)を用いた処置での腫瘍体積を表すグラフ(図20A)及び腫瘍増殖阻害を表す表(図20B)。

【図２１Ａ】NCGマウスにおけるPBMC予備移植NCI-H82異種移植片モデルにおけるCD47特異的結合剤(KC015;配列番号75)を用いた処置での腫瘍体積を表すグラフ。1000万個のPBMCを腫瘍細胞移植の3日前にNCGマウスに移植した。処置をPBMC移植の10

日後に開始し、週当たり2回で全部で8用量とした。研究において使用された陰性対照はPBSであった。
【図２１Ｂ】異なるモデルにおいてNCI-H69、NCI-H82、SCLC-21H及びRKOを含む様々な腫瘍細胞を使用したKC020(配列番号77)のin vivo有効性を示す表。
【図２１Ｃ】SCIDマウスにおける確立されたMDA-MB-231異種移植片モデルにおける抗CD47特異的結合剤KC015を用いた処置での腫瘍体積を表すグラフ。研究において使用された陰性対照はPBSであった。500万個のMDA-MB-231細胞をSCIDマウスの右脇腹の皮下(s.c.)に注射した。マウスに週1回、全部で8用量の、腹腔内(i.p.)による結合剤(8mg/kg)処置を与えた。
【図２２】抗D2、抗PD-1及び抗CD47抗原結合性ドメインを含むIgG1又はIgG4アイソフォームの結合剤(KC028;配列番号86; KC029;配列番号87、KC027:配列番号85)を用いた処置での腫瘍体積を表すグラフ。対照は、抗HEWL抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC031:配列番号89)を含む。
【図２３】NCGマウスにおけるNCI-H82(上パネル)及びNCI-H69(下パネル)異種移植片モデルにおける抗D2、抗PD-1及び抗CD47抗原結合性ドメインを含む三特異性結合剤(KC021;配列番号78)の蓄積を示す体内分布実験の図解(図23A)及び写真(図23B)。
【図２４Ａ】PBS又はKC020(配列番号77)のいずれかを用いて処置された確立されたNCI-H69腫瘍を有するhCD34+ヒト化NCGマウスからの肝臓の転移を表すグラフ(図24A)及び黒ボックスに示されるようにPBS群からの播種性腫瘍細胞を指し示すがKC020(配列番号77)群からの播種性腫瘍細胞を指し示さない腫瘍のH&E染色写真(図24B)。
【図２４Ｂ】PBS又はKC020(配列番号77)のいずれかを用いて処置された確立されたNCI-H69腫瘍を有するhCD34+ヒト化NCGマウスからの肝臓の転移を表すグラフ(図24A)及び黒ボックスに示されるようにPBS群からの播種性腫瘍細胞を指し示すがKC020(配列番号77)群からの播種性腫瘍細胞を指し示さない腫瘍のH&E染色写真(図24B)。
【図２４Ｃ】NCGマウスにおける1:5のE:T比でのNCI-H82/PBMC共移植モデルにおける腫瘍動態及びKC020のin vivo有効性を表すグラフ。
【図２５】ELISAアッセイにより測定された場合のD2プロテオリポソーム(図25A)、ヒト組換えPD-1タンパク質(図25B)、及びヒト組換えCD47タンパク質(図25C)に関するストレス条件に供されたKC020(配列番号77)の結合を表すグラフ。ストレス負荷条件は、3日間の撹拌、5回の凍結及び解凍、並びに40℃で2週間の貯蔵を含む。
【図２６】ELISAアッセイにより測定された場合のD2プロテオリポソーム(図26A)、ヒト組換えPD-1タンパク質(図26B)、及びヒト組換えCD47タンパク質(図26C)に関する低pHストレスに供されたKC020(配列番号77)の結合を表すグラフ。ストレス負荷条件は、pH 3.5での4時間及び48時間の処理を含む。
【図２７】NCI-H82 SCLC尾静脈転移モデルを移植されたKC020処置動物の生存曲線を表すグラフ。NCGマウスに50,000個のNCI-H82細胞を接種し、続いて翌日にKC020処置を行った。KC020での処置を隔週毎に行った。研究において使用された陰性対照はPBSであった。
【発明を実施するための形態】
【０２３２】
詳細な説明
定義
他に指し示されなければ、二量体化ドメインのために指し示されるアミノ酸ナンバリングはEUナンバリングシステムによるものである。
【０２３３】
実施形態を記載する文脈(特に請求項の文脈)における「a」及び「an」及び「the」という用語並びに類似した参照語の使用は、本明細書において他に指し示されなければ又は文脈に明確に矛盾しなければ、単数及び複数の両方をカバーすると解釈されるべきである。
【０２３４】

特に記載されなければ又は文脈から自明でなければ、本明細書において使用される場合、「又は」という用語は、包含的であると理解され、「又は」及び「及び」の両方をカバーする。

【０２３５】

「及び/又は」という用語は、本明細書において使用される場合、他方を伴う又は伴わない指定される特色又は構成要素の各々の特有の開示として解釈されるべきである。

【０２３６】

「含む」(comprising)、「有する」、「含む」(including)、及び「含有する」という用語は、他に記載されなければ、オープンエンドの用語として解釈されるべきである(即ち、「含むがそれに限定されない」を意味する)。「からなる」という用語はクローズエンドとして解釈されるべきである。

【０２３７】

「処置」という用語は、本開示の目的のために、治療的処置及び予防的又は腫瘍防止措置の両方を指す。処置を必要とする者としては、障害を既に有する者の他に、障害を有する素因を有する者又は障害が予防されるべき者が挙げられる。

【０２３８】

所与の値に関する「約」又は「おおよそ」という用語は、値における変動が想定されることを意味する。一部の実施形態では、「約」又は「おおよそ」という用語は、所与の値又は範囲の+/-10パーセント以内、+/-5パーセント以内、+/-4パーセント以内、+/-3パーセント以内、+/-2パーセント以内又は+/-1パーセント以内の範囲を一般に意味する。

【０２３９】

抗原結合性ドメインに関する「機能的に活性の」という用語は、抗原結合性ドメインがその標的に結合する能力を有すること及び任意選択で抗原結合性ドメインが1つ又は複数の生物学的活性を有することを意味する。

【０２４０】

本明細書において使用される場合、「柔軟性リンカー」という用語は、隣接するモジュールが互いに対して相対的に動くことを可能とする柔軟なアミノ酸残基から構成される少なくとも部分を含むペプチドを指す。

【０２４１】

本明細書において使用される場合、「剛性リンカー」という用語は、剛性の構造を呈し且つ2つのモジュールの間の距離を保つアミノ酸から構成される少なくとも部分を含むペプチドを指す。

【０２４２】

本明細書において使用される場合、「らせん状リンカー」という用語は、α-ヘリックスコンホメーションをとるアミノ酸残基から構成されるリンカーを意味する。

【０２４３】

本明細書において使用される場合、「切断可能なリンカー」という用語は、ADAMS、ADAMTS、アスパラギン酸プロテアーゼ、カスパーゼ、システインカテプシン、システインプロテイナーゼ、メタロプロテイナーゼ、セリンプロテアーゼ、凝固因子プロテアーゼ、II型膜貫通セリンプロテアーゼ(TTSP)及びこれらの組合せから選択されるプロテアーゼに対して感受性の酵素切断部位を含むペプチドを指す。

【０２４４】

本明細書において使用される場合、ポリペプチド鎖又は結合剤に関する「単一特異性」という用語は、単一の抗原又はエピトープに結合するポリペプチド鎖又は結合剤を指す。単一特異性ポリペプチド鎖又は結合剤はそのため、1つの抗原結合性ドメイン又は所与の抗原若しくはエピトープに対して同じ特異性を有する1つより多くの結合性ドメイン(同じ若しくは異なる)を有してよい。

【０２４５】

本明細書において使用される場合、ポリペプチド鎖又は結合剤に関する「多特異性」と

いう用語は、1つより多くの抗原又はエピトープに結合するポリペプチド鎖又は結合剤を指す。

【０２４６】

「多特異性」という用語は、「二特異性」、「三特異性」、「四特異性」、「五特異性」及び「六特異性」等を包含する。

【０２４７】

本明細書において使用される場合、結合剤の文脈において、「二特異性」という用語は、2つの異なる抗原若しくはタンパク質又は同じ抗原若しくはタンパク質の2つのエピトープに結合する結合剤を呼称する。

【０２４８】

本明細書において使用される場合、例えば「結合剤は少なくとも2つのポリペプチド鎖を含む」等の表現における「少なくとも2つのポリペプチド鎖」等の表現は、ある個数のポリペプチド鎖種を指し、絶対的な数値を指すものではない。

【０２４９】

「A～B」等の形式において値の範囲に言及する表現は、そのような範囲に含まれる及び該範囲を構成する各個々の値及び任意の部分的範囲を含むことが本明細書において理解されるべきである。例えば、「1～10」という表現は、限定なく、「2～10」、「2～9」、「3～6」、「5～7」等の部分的範囲、並びに1及び10を含めて1～10に含まれる任意の個々の値、即ち、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10を含む。

【０２５０】

所与の値に関する「少なくとも」という用語は、該値及びより大きい値を含む意図であることが本明細書において理解されるべきである。例えば、「少なくとも80%」という用語は、「少なくとも81%」、「少なくとも82%」、「少なくとも83%」、「少なくとも84%」、「少なくとも85%」、「少なくとも86%」、「少なくとも87%」、「少なくとも88%」,「少なくとも89%」、「少なくとも90%」、「少なくとも91%」、「少なくとも92%」、「少なくとも93%」、「少なくとも94%」、「少なくとも95%」、「少なくとも96%」、「少なくとも97%」、「少なくとも98%」、「少なくとも99%」、「少なくとも99.1%」、「少なくとも99.2%」、「少なくとも99.3%」、「少なくとも99.4%」、「少なくとも99.5%」、少なくとも99.6%」、「少なくとも99.7%」、「少なくとも99.8%」、「少なくとも99.9%」、及び100%を含む。

【０２５１】

抗原結合性ドメイン(Ab)

本明細書に開示されるように、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよい。本開示の抗原結合性ドメインは、特異的な標的に結合するそれらの能力について選択されてよい。抗原結合性ドメインはまた、例えば、細胞プロセス、例えば遺伝子発現、シグナル伝達、細胞増殖、及び細胞生存等をモジュレートする能力を含むin vivo及び/又はin vitroでの機能的特性又は生物学的効果のために選択されてよい。

【０２５２】

例えば、本開示の結合剤は、抗体の1つ又は複数の相補性決定領域(CDR)を各々独立して含む1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含む。

【０２５３】

本開示の結合剤の特異性は、そのため、それらの抗原結合性ドメインにより付与されてよい。

【０２５４】

本開示の結合剤は、DR2若しくはDR2を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメイン、PD-1若しくはPD-1を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメイン及び/又はCD47若しくはCD47を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０２５５】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、DR2又はDR2を発現する細胞に結合す

る能力を有する抗原結合性ドメインであり、例えば、抗原結合性ドメイン1(ABD1)を含む。

【０２５６】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、PD-1又はPD-1を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメインであり、例えば、抗原結合性ドメイン2(ABD2)を含む。

【０２５７】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、CD47又はCD47を発現する細胞に結合する能力を有する抗原結合性ドメインであり、例えば、抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含む。

【０２５８】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、ABD1、ABD2及び/又はABD3と同じエピトープ又は抗原を標的化する。一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、ABD1、ABD2及び/又はABD3と、それらのそれぞれのエピトープ又は抗原への結合について競合する。

【０２５９】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、DR2、PD-1又はCD47の中から選択されるものではない少なくとも1つの抗原に結合する。

【０２６０】

一部の実施形態では、結合剤は、1つより多くの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０２６１】

例えば、一部の実施形態では、結合剤は、2個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０２６２】

一部の実施形態では、結合剤は、3個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０２６３】

一部の実施形態では、結合剤は、4個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０２６４】

一部の実施形態では、結合剤は、5個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０２６５】

一部の実施形態では、結合剤は、6個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０２６６】

一部の実施形態では、結合剤は、1～12個、例えば1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、2～3、2～4、2～5、2～6、2～7、2～8、2～9、2～10、2～11、2～12、3～4、3～5、3～6、3～7、3～8、3～9、3～10、3～11、3～12、4～5、4～6、4～7、4～8、4～9、4～10、4～11、4～12、5～6、5～7、5～8、5～9、5～10、5～11、5～12、6～7、6～8、6～9、6～10、6～11、6～12、7～8、7～9、7～10、7～11、7～12、8～9、8～10、8～11、8～12、9～10、9～11、9～12、10～11、10～12、又は11～12個の抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０２６７】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は、1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、腫瘍細胞に結合する能力を有する。

【０２６８】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は、1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んで

よく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、免疫調節因子に結合する能力を有する。一部の実施形態では、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、免疫チェックポイントタンパク質に結合する能力を有する。一部の実施形態では、免疫チェックポイントタンパク質はPD-1である。

【０２６９】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は、1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、免疫細胞に結合する能力を有する。一部の実施形態では、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、免疫細胞(例えば、T細胞、NK細胞、単球、マクロファージ等)の表面に発現されるタンパク質に結合する能力を有する。

【０２７０】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は多価であってよく、腫瘍細胞に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及び免疫細胞に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０２７１】

一部の実施形態では、免疫細胞の表面に発現されるタンパク質は、CD47又はCD3から選択される。

【０２７２】

一部の実施形態では、免疫細胞の表面に発現されるタンパク質はCD47である。

【０２７３】

一部の実施形態では、免疫細胞の表面に発現されるタンパク質はCD3である。

【０２７４】

抗原結合性ドメインは、(ヒト若しくは動物起源の)天然抗体又は合成抗体に由来してよい。

【０２７５】

一部の実施形態では、天然抗体の抗原結合性ドメインは、単鎖を形成するように操作される。

【０２７６】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、IgG、例えばIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4から得られてよい。特定の実施形態では、抗原結合性ドメインはヒトIgG重鎖に由来する。

【０２７７】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、重鎖のみの抗体(HCAb)から得られてよい。

【０２７８】

抗原結合性ドメインの例示的な実施形態としては、限定なく例えば、単一ドメイン抗体(sdAb)、重鎖可変領域(VH又はVHH)、軽鎖可変領域(VL又はVLL)、単鎖可変断片(scFv)、V_{NAR}断片、及びこれらの組合せが挙げられる。

【０２７９】

一部の実施形態では、本明細書に開示される結合剤の抗原結合性ドメインはVHHである。

【０２８０】

一部の実施形態では、本明細書に開示される結合剤の抗原結合性ドメインは、本明細書に開示されるVHHの相補性決定領域を含むVHHである。

【０２８１】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるVHHの相補性決定領域(CDR)はKabat CDRに対応する。

【０２８２】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるVHHの相補性決定領域(CDR)はIMGT CDRに対応する。

【０２８３】
特定の実施形態では、本開示の結合剤は、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c若しくはIgG3又はこれらの組合せの、ヒト若しくはマウス若しくはラット、若しくはマウス若しくはラットVHHがラクダ化されているトランスジェニックマウス若しくはラットに由来する抗原結合性ドメインVHH、ヒトVHH、ラクダ化されているヒトVHHを含んでよい。抗体は、その重鎖、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c若しくはIgG3若しくはこれらの組合せ、又は上記のVHHの組合せのいずれかにおいて機能的なCH1ドメインを欠いたマウス若しくはラット又はトランスジェニックマウス若しくはラットを、目的の抗原で免疫化することにより得られてよい。
【０２８４】
特定の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は、ラクダ科動物抗体の抗原結合性ドメイン、例えばIgG2又はIgG3のVHHを含んでよい。ラクダ科動物抗体は、ヒトコブラクダ、ラクダ、ラマ又はアルパカを目的の抗原で免疫化することにより得られてよい。
【０２８５】
一部の実施形態では、ラクダ科動物抗体は、いわゆる旧世界ラクダ科動物、例えばフタコブラクダ(Camelus bactrianus)、ヒトコブラクダ(Camelus dromedarius)又は新世界ラクダ科動物、例えばアルパカ(Lama pacos)、ラマ(Lama glama)及びビクーニャ(Lama vicugna)を起源としてよい。
【０２８６】
別の特定の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は、軟骨魚の抗原結合性ドメイン、例えばIgNARのV_{NAR}断片を含んでよい。V_{NAR}断片はサメ抗体を起源としてよい。
【０２８７】
所望の場合、非ヒト抗体の抗原結合性ドメインはヒト化されてよい。例えば、非ヒトVH、VHH又はHCAbのフレームワーク領域は、それらをよりヒト様とするように改変されてよい。ラクダ科動物抗体のヒト化は、例えば、Vincke C.ら(J. Biol Chem. 2009、284(5):3273～3284頁)において議論されており、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。ヒト化されたラクダ科動物抗体は、例えば、ユニバーサルヒト化ナノボディスキャフォールド(例えば、Vincke C.らにおいて開示されるh-NbBcII10$_{FGLA}$)へのCDRグラフトにより得られてよい。V_{NAR}抗体は、Kovalenko OVら(J Biol Chem. 2013、288:17408～17419頁)(その全内容は参照により本明細書に組み込まれる)において議論されるように非CDR残基をヒト生殖系列Vκ1配列DPK9の残基に変換することによりヒト化されうる。本開示のポリペプチド鎖は、したがって、ヒト化された抗原結合性ドメインを包含する。
【０２８８】
更に別の特定の実施形態では、抗原結合性ドメインは、ヒトVH(改変されたもの又はそうでないもの)を含んでよい。ヒトVHは、例えば、合成ヒトVHライブラリーから得られてよい。改変されたヒトVHとしては、一部のアミノ酸残基が、それらをよりラクダ様とするために改変されているもの(即ち、ラクダ化によるもの)が挙げられる。
【０２８９】
抗原結合性ドメインは、単一ドメイン抗体(sdAb)、VHH、従来型抗体又はその抗原結合性断片、二特異性抗体、単鎖Fv-CH3(scFv-CH3)融合物、タンデム-scFv-CH3(TaFv-CH3)融合物、ダイアボディ-CH3(Db-CH3)融合物、タンデムDb-CH3(TaDb-CH3)融合物、単鎖Db-CH3融合物(scDb-CH3)、Fab-CH3融合物、単鎖Fab-CH3融合物、Fab-scFv-CH3融合物、二重親和性再標的化(DART)-CH3融合物、Fab-DART-CH3融合物、単鎖Fv-Fc(scFv-Fc)融合物、タンデム-scFv-Fc(TaFv-Fc)融合物、ダイアボディ-Fc(Db-Fc)融合物、タンデムDb-Fc(TaDb-Fc)融合物、単鎖Db-Fc融合物(scDb-Fc)、Fab-Fc融合物、単鎖Fab-Fc融合物、Fab-scFv-Fc融合物、二重親和性再標的化(DART)-Fc融合物、Fab-DART-Fc融合物等を限定なしに含む抗体、抗原結合性断片又は抗体様分子に組み込まれうることを当業者は理解する。これらの抗体フォーマットは、本明細書に開示される天然CH3、変異型CH3ドメイン、天然CH2-CH3ドメイン又は変異型CH

2-CH3ドメインを有してよい。

【０２９０】

ABD1の例示的な実施形態

抗原結合性ドメイン1(ABD1)は、例えば、DR2に結合する抗原結合性ドメインから選択されてよく、その一部の非限定的な例示的な実施形態は本明細書において提供される。

【０２９１】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域1(CDRH1)、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域2(CDRH2)及び配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域3(CDRH3)を含む。

【０２９２】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号4に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号5に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０２９３】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号8に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号9に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０２９４】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号11に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号12に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号13に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０２９５】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号15に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号16に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号17に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０２９６】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号18に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号19に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号20に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０２９７】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号22に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号23に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号24に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０２９８】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(AB

D1)であり、配列番号25に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号26に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号27に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０２９９】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号29に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号30に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号31に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０３００】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号32に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号33に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号34に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０３０１】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号36に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号37に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号38に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０３０２】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号39に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号40に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号41に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０３０３】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号43に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号44に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号45に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０３０４】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号46に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号47に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号48に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０３０５】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号50に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号51に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号52に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。

【０３０６】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号53に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号54に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号55に示されるアミノ酸配列を有するCD

RH3を含む。

【０３０７】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号7に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。一部の実施形態では、アミノ酸バリエーションは、配列番号7の1つ又は複数のフレームワーク領域中に位置してよい。

【０３０８】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号7に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号7のKabat CDRと同一のCDRを含む。

【０３０９】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号7に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号7のIMGT CDRと同一のCDRを含む。

【０３１０】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号7に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０３１１】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号14に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。一部の実施形態では、アミノ酸バリエーションは、配列番号14の1つ又は複数のフレームワーク領域中に位置してよい。

【０３１２】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号14に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号14のKabat CDRと同一のCDRを含む。

【０３１３】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号14に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号14のIMGT CDRと同一のCDRを含む。

【０３１４】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号14に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０３１５】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号21に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。一部の実施形態では、アミノ酸バリエーションは、配列番号21の1つ又は複数のフレームワーク領域中に位置してよい。

【０３１６】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号21に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号21のKabat CDRと同一のCDRを含む。

【０３１７】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号21に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号21のIMGT CDRと

同一のCDRを含む。

【０３１８】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号21に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０３１９】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号28に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。一部の実施形態では、アミノ酸バリエーションは、配列番号28の1つ又は複数のフレームワーク領域中に位置してよい。

【０３２０】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号28に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号28のKabat CDRと同一のCDRを含む。

【０３２１】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号28に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号28のIMGT CDRと同一のCDRを含む。

【０３２２】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号28に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０３２３】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号35に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。一部の実施形態では、アミノ酸バリエーションは、配列番号35の1つ又は複数のフレームワーク領域中に位置してよい。

【０３２４】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号35に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号35のKabat CDRと同一のCDRを含む。

【０３２５】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号35に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号35のIMGT CDRと同一のCDRを含む。

【０３２６】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号35に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０３２７】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号42に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。一部の実施形態では、アミノ酸バリエーションは、配列番号42の1つ又は複数のフレームワーク領域中に位置してよい。

【０３２８】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号42に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号42のKabat CDRと

同一のCDRを含む。

【０３２９】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号42に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号42のIMGT CDRと同一のCDRを含む。

【０３３０】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号42に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０３３１】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号49に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。一部の実施形態では、アミノ酸バリエーションは、配列番号49の1つ又は複数のフレームワーク領域中に位置してよい。

【０３３２】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号49に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号49のKabat CDRと同一のCDRを含む。

【０３３３】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号49に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号49のIMGT CDRと同一のCDRを含む。

【０３３４】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号49に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０３３５】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号56に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。一部の実施形態では、アミノ酸バリエーションは、配列番号56の1つ又は複数のフレームワーク領域中に位置してよい。

【０３３６】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号56に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号56のKabat CDRと同一のCDRを含む。

【０３３７】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号56に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号56のIMGT CDRと同一のCDRを含む。

【０３３８】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号56に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０３３９】

ABD2の例示的な実施形態

抗原結合性ドメイン2(ABD2)は、例えば、PD-1に結合する抗原結合性ドメインから選択されてよく、その一部の非限定的な例示的な実施形態は本明細書において提供される。

【０３４０】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号57に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域1(CDRH1)、配列番号58に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域2(CDRH2)及び配列番号59に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域3(CDRH3)を含む。
【０３４１】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号60に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号61に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号62に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。
【０３４２】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。一部の実施形態では、アミノ酸バリエーションは、配列番号63の1つ又は複数のフレームワーク領域中に位置してよい。
【０３４３】
一部の実施形態では、重鎖は、配列番号63に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号63のKabat CDRと同一のCDRを含む。
【０３４４】
一部の実施形態では、重鎖は、配列番号63に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号63のIMGT CDRと同一のCDRを含む。
【０３４５】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。
【０３４６】
ABD3の例示的な実施形態
抗原結合性ドメイン3(ABD3)は、例えば、CD47に結合する抗原結合性ドメインから選択されてよく、その一部の非限定的な例示的な実施形態は本明細書において提供される。
【０３４７】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号64に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域1(CDRH1)、配列番号65に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域2(CDRH2)及び配列番号66に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域3(CDRH3)を含む。
【０３４８】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号67に示されるアミノ酸配列を有するCDRH1、配列番号68に示されるアミノ酸配列を有するCDRH2及び配列番号69に示されるアミノ酸配列を有するCDRH3を含む。
【０３４９】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン3(AB

D3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖を含む。一部の実施形態では、アミノ酸バリエーションは、配列番号70の1つ又は複数のフレームワーク領域中に位置してよい。

【０３５０】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号70に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号70のKabat CDRと同一のCDRを含む。

【０３５１】

一部の実施形態では、重鎖は、配列番号70に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列及び配列番号70のIMGT CDRと同一のCDRを含む。

【０３５２】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０３５３】

他の抗原結合性ドメインの例示的な実施形態

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)、抗原結合性ドメイン2(ABD2)又は抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、少なくとも1つの抗原結合性ドメインは異なる抗原に結合する。

【０３５４】

一部の実施形態では、結合剤はそのため、CD3に結合する抗原結合性ドメインを含んでよい。そのような抗原結合性ドメインは、当業者に公知のものを含む。CD3に結合する抗原結合性ドメインの例示的な実施形態は配列番号115に提供される。

【０３５５】

よって、一部の実施形態では、結合剤は、DR2、PD-1及び/又はCD3に結合する抗原結合性ドメインを含んでよい。他の実施形態では、結合剤は、DR2及び/又はCD3に結合する抗原結合性ドメインを含んでよい。更に他の実施形態では、結合剤は、PD-1及び/又はCD3に結合する抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０３５６】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)、抗原結合性ドメイン2(ABD2)又は抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、限定なく例えば、CD3、CD36、DRD1、DRD2、DRD3、DRD4、DRD5、PD-L1、TROP2、CD147、MCT1、IL1RAP、AMIGO2、PTK7、MCT2、MCT4、NHE1、H+/K+-ATPアーゼ、LAP、HLA-I A2、CD73、CD98、CEACAM5/6、ICAM-1、MCSP、フィブロネクチン、ベータ1インテグリン、テトラスパニン8、CD164、CD59、CD63、CD44、CD166、cWF、TNF、IL-17A、IL17-F、IL-6R、BCMA、TNF、RANKL、ADAMTS5、VEGF、Ang2、CX_3CR1、CXCR4、TfR1(CD71)、CXCR2、CD3、PD1、PDL-1、CTLA-4、CD8、LAG-3、OX40、CD27、CD122/IL2RB、TLR8/CD288、TIM-3、ICOS/CD278、NKG2A、A2AR、B7-H3、B7-H4、GITR/TNFRSF18、4-IBB/CD137、KIR2DL1、KIR3DL2、SIRPα、CD47、VISTA、CD40、CD112、CD96、TOGOT、BTLA、TIGIT、CD4、VEGFR2、CD19、IGFR1、EpCAM、EGFR、DLL3、CGRP、CD79b、CD28、CCR5、ErbB3、ErbB2、TGFβ1、TGFβ2、TGFβ3、TGFβR1、TGFβR2、IDO1、IDO2、TLR-4、TLR-7、TLR-8、TLR-9、NOX2、又はSIGLEC-7に特異的に結合する抗原結合性ドメインから選択される。

【０３５７】

ポリペプチド鎖

本開示の結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む。

【０３５８】

所望されるポリペプチド鎖配列をコードするDNAのセグメントはin vitroで合成されてよい。異なるDNAモジュールが、組織化及び方向付けされた方式で単一の小片にアセンブルされ、それが次に発現ベクターにクローニングされる。結果としてもたらされるポリペプチド鎖はしたがって、単一の鎖を形成する異なるモジュールから構成される。

【０３５９】

本開示のポリペプチド鎖は、限定なく例えば、抗原結合性ドメイン、リンカー及び少なくとも2つのポリペプチド鎖のアセンブリーを促進する二量体化ドメインを含む。

【０３６０】

一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は単一特異性であってよい。

【０３６１】

一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は多特異性であってよい。

【０３６２】

一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は一価であってよい。

【０３６３】

一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は多価であってよい。

【０３６４】

一部の事例では、ポリペプチド鎖は二量体化ドメインを含まない。

【０３６５】

一部の事例では、ポリペプチド鎖は二量体化ドメインを含む。

【０３６６】

本開示の一部の態様では、ポリペプチド鎖は単一特異性であってよい。

【０３６７】

単一特異性ポリペプチド鎖の例示的な実施形態は、1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。単一特異性ポリペプチド鎖の別の例示的な実施形態は、1つより多くの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含むが、抗原結合性ドメインは同一のCDR及びフレームワーク領域を有する。単一特異性ポリペプチド鎖の更に別の例示的な実施形態は、1つより多くの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含むが、抗原結合性ドメインは同一のCDR及び異なるフレームワーク領域を有する。単一特異性ポリペプチド鎖の更なる例示的な実施形態は、同じ抗原又はエピトープに結合する能力に影響することなくそれらのCDRのうちの1つ又は複数のアミノ酸配列において異なる(例えば、1つ又は複数のCDRにおける保存的置換)抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。

【０３６８】

本開示の一部の態様では、ポリペプチド鎖は多特異性であってよい。ポリペプチド鎖は、例えば、二特異性ポリペプチド鎖、三特異性ポリペプチド鎖、四特異性ポリペプチド鎖、五特異性ポリペプチド鎖、六特異性ポリペプチド鎖、二パラトープ性ポリペプチド鎖及び多パラトープ性ポリペプチド鎖等を包含しうる。

【０３６９】

例示的な構成では、1つ又は複数の抗原結合性ドメインは、二量体化ドメインのN末端、C末端又は各側に位置してよい。

【０３７０】

別の例示的な構成では、ポリペプチド鎖は、二量体化ドメインのN末端における少なくとも1つの抗原結合性ドメイン及び二量体化ドメインのC末端における少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０３７１】

更なる例示的な構成では、ポリペプチド鎖は、二量体化ドメインのN末端における1つの抗原結合性ドメイン及び二量体化ドメインのC末端における少なくとも2つの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０３７２】

いっそう更なる例示的な構成では、ポリペプチド鎖は、二量体化ドメインのN末端における2つの抗原結合性ドメイン及び二量体化ドメインのC末端における2つの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０３７３】

ポリペプチド鎖は、N末端からC末端への様式において式I:

$$X\text{-}[(Ab_a)\text{-}(L_b)]_m\text{-}(DD)\text{-}[(L_c)\text{-}(Ab_d)]_n\text{-}Y$$

のアミノ酸配列を含んでよく、

mは、0、1、2又は2より大きい整数であり;

nは、0、1、2又は2より大きい整数であり;

m及びnは同時に0ではなく;

Ab_a、Ab_dは各々、抗原結合性ドメインを表し、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)、抗原結合性ドメイン2(ABD2)又は抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり;

X又はYは独立して存在するか又は存在せず、アミノ酸配列を含み;

L_b、L_cは各々独立して1つ又は複数のリンカーを含み;且つ

DDは二量体化ドメインを表す。

【０３７４】

一部の実施形態では、L_bは存在しなくてよい。

【０３７５】

一部の実施形態では、L_cは存在しなくてよい。

【０３７６】

一部の実施形態では、L_b及びL_cの両方は存在しなくてよい。

【０３７７】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、1つより多くの抗原結合性ドメインを含む。

【０３７８】

mが2又は2より大きい整数である一部の実施形態では、$[(Ab_a)\text{-}(L_b)]$単位は同じである。

【０３７９】

mが2又は2より大きい整数である他の実施形態では、ポリペプチド鎖又は結合剤の$[(Ab_a)\text{-}(L_b)]$単位は異なる。

【０３８０】

mが2より大きい整数である他の実施形態では、ポリペプチド鎖又は結合剤の$[(Ab_a)\text{-}(L_b)]$単位は、同じ及び異なる単位を含んでよい。

【０３８１】

nが2又は2より大きい整数である一部の実施形態では、$[(L_c)\text{-}(Ab_d)]$単位は同じである。

【０３８２】

nが2又は2より大きい整数である他の実施形態では、$[(L_c)\text{-}(Ab_d)]$単位は異なる。

【０３８３】

nが2又は2より大きい整数である他の実施形態では、$[(L_c)\text{-}(Ab_d)]$単位は、同じ及び異なる単位を含む。

【０３８４】

mが2又は2より大きい整数である一部の実施形態では、各々のAb_aは同じ又は異なる。

【０３８５】

nが2又は2より大きい整数である一部の実施形態では、各々のAb_dは同じ又は異なる。

【０３８６】

一部の実施形態では、Ab_aはABD1を表す。

【０３８７】

一部の実施形態では、Ab_dはABD2を表す。

【０３８８】

一部の実施形態では、Ab_dはABD3を表す。

【０３８９】

一部の実施形態では、mは1であり、Ab_aはABD1を表す。

【０３９０】

一部の実施形態では、nは2であり、Ab_dのうちの1つはABD2を表す。

【０３９１】

一部の実施形態では、nは2であり、Ab_dのうちの1つはABD3を表す。

【０３９２】

一部の実施形態では、nは2であり、Ab_dのうちの1つはABD2を表し、他のAb_dはABD3を表す。

【０３９３】

一部の実施形態では、mは、2、3、4、5又は5より大きい整数である。

【０３９４】

一部の実施形態では、mは2である。

【０３９５】

他の実施形態では、mは3である。

【０３９６】

更に他の実施形態では、mは4である。

【０３９７】

更なる実施形態では、mは5である。

【０３９８】

他の実施形態では、mは5より大きい整数である。

【０３９９】

一部の実施形態では、nは、2、3、4、5又は5より大きい整数である。

【０４００】

一部の実施形態では、nは2である。

【０４０１】

他の実施形態では、nは3である。

【０４０２】

追加の実施形態では、nは4である。

【０４０３】

更なる実施形態では、nは5である。

【０４０４】

他の実施形態では、nは5より大きい整数である。

【０４０５】

実施形態では、1つ又は複数のポリペプチド鎖は抗体又はその抗原結合性断片のヒンジ領域を更に含む。

【０４０６】

一部の実施形態では、ヒンジ領域は二量体化ドメインのN末端にある。

【０４０７】

一部の実施形態では、L_bは抗体又はその抗原結合性断片のヒンジ領域である。

【０４０８】

一部の実施形態では、ヒンジ領域は天然ヒトIgG1ヒンジ領域である。他の実施形態では、ヒンジ領域は変異型ヒトIgG1ヒンジ領域である。

【０４０９】

他の実施形態では、ヒンジ領域は天然ヒトIgG2ヒンジ領域である。他の実施形態では、ヒンジ領域は変異型ヒトIgG2ヒンジ領域である。

【０４１０】

他の実施形態では、ヒンジ領域は天然ヒトIgG3ヒンジ領域である。他の実施形態では、ヒンジ領域は変異型ヒトIgG3ヒンジ領域である。

【０４１１】
更に他の実施形態では、ヒンジ領域は天然ヒトIgG4ヒンジ領域である。他の実施形態では、ヒンジ領域は変異型ヒトIgG4ヒンジ領域である。
【０４１２】
一部の実施形態では、1つ又は複数のリンカーの各々は、独立して、少なくとも5、10、15、20、25、30、35、40、45又は50アミノ酸残基の長さを有する。
【０４１３】
一部の実施形態では、1つ又は複数のリンカーの各々は、独立して、柔軟性リンカー、らせん状リンカー、又は剛性リンカーである。
【０４１４】
一部の実施形態では、リンカーL_cは剛性リンカーである。
【０４１５】
一部の実施形態では、Lcは切断不可能なリンカーを含む。他の実施形態では、Lcは切断不可能なリンカーからなる。
【０４１６】
一部の実施形態では、1つ又は複数のリンカーは柔軟性リンカーを含む。
【０４１７】
一部の実施形態では、1つ又は複数のリンカーは剛性リンカーを含む。
【０４１８】
一部の実施形態では、柔軟性リンカーはGSリンカーである。
【０４１９】
一部の実施形態では、柔軟性リンカーは、1つ又は複数のGGGGS単位を含む。
【０４２０】
一部の実施形態では、柔軟性リンカーは、少なくとも2、3、4、5、又はより多くのGGGGS単位を含む。
【０４２１】
一部の実施形態では、剛性リンカーは複数のPAリピートを含む。
【０４２２】
一部の実施形態では、剛性リンカーは、PAPAPKA(配列番号105); APAPAPAPAPKA(配列番号106); APAPAPAPAPAPAPAPAPAPKA(配列番号107);又はこれらの組合せから選択される。
【０４２３】
一部の実施形態では、らせん状リンカーは1つ又は複数のEAAAK単位を含む。
【０４２４】
一部の実施形態では、らせん状リンカーは、AEAAAKEAAAKA(配列番号109); AEAAAKEAAAKEAAAKA(配列番号110); AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA(配列番号111);又はこれらの組合せから選択される。
【０４２５】
一部の実施形態では、二量体化ドメインは、配列番号116に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列を含む。
【０４２６】
一部の実施形態では、二量体化ドメインは、配列番号117に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列を更に含む。
【０４２７】
他の例示的な実施形態では、ポリペプチド鎖は、式II:

$$X\text{-}(Ab_{a1})\text{-}(L_{b1})\text{-}(DD)\text{-}(L_{c1})\text{-}(Ab_{d1})\text{-}Y \quad (式II)$$

を含む。
【０４２８】
更に他の例示的な実施形態では、ポリペプチド鎖は、式III:

$$X\text{-}(Ab_{a1})\text{-}(L_{b1})\text{-}(DD)\text{-}(L_{c1})\text{-}(Ab_{d1})\text{-}(L_{c2})\text{-}(Ab_{d2})\text{-}Y \quad (式III)$$

を含む。
【０４２９】
更なる例示的な実施形態では、ポリペプチド鎖は、式IV:
$X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y$(式IV)
を含む。
【０４３０】
追加的な例示的な実施形態では、ポリペプチド鎖は、式V:
$X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$(式V)
を含む。
【０４３１】
更なる例示的な実施形態では、ポリペプチド鎖は、式VI:
$X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y$(式VI)
を含む。
【０４３２】
いっそう更なる例示的な実施形態では、ポリペプチド鎖は、式VII:
$X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y$(式VII)
を含む。
【０４３３】
他の例示的な実施形態では、ポリペプチド鎖は、式VIII:
$X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y$(式VIII)
を含む。
【０４３４】
一部の実施形態では、Ab_{a1}、Ab_{a2}、Ab_{a3}、Ab_{d1}、Ab_{d2}、Ab_{d3}は、各々独立して、抗原結合性ドメインを含む。
【０４３５】
一部の実施形態では、Ab_{a1}、Ab_{a2}、Ab_{a3}、Ab_{d1}、Ab_{d2}、Ab_{d3}は、各々独立して、抗原結合性ドメインを表す。
【０４３６】
一部の実施形態では、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)、抗原結合性ドメイン2(ABD2)又は抗原結合性ドメイン3(ABD3)である。
【０４３７】
一部の実施形態では、L_{b1}は1つ若しくは複数のリンカー及び/又は抗体若しくはその抗原結合性断片のヒンジ領域を含む。一部の実施形態では、L_{b1}はL_bである。
【０４３８】
一部の実施形態では、L_{b2}、L_{b3}、L_{c1}、L_{c2}、及びL_{c3}は、各々独立して、1つ又は複数のリンカーを含む。
【０４３９】
一部の実施形態では、L_{b1}、L_{b2}及び/又はL_{b3}のうちの1つ又は複数は存在しなくてよい。
【０４４０】
一部の実施形態では、L_{b2}及び/又はL_{b3}は存在しなくてよい。
【０４４１】
一部の実施形態では、L_{c1}、L_{c2}、及び/又はL_{c3}のうちの1つ又は複数は存在しなくてよい。
【０４４２】
一部の実施形態では、L_{c2}及び/又はL_{c3}は存在しなくてよい。
【０４４３】

一部の実施形態では、L_{c1}は剛性リンカーである。

【０４４４】

一部の実施形態では、L_{c2}は剛性リンカーである。

【０４４５】

一部の実施形態では、L_{c3}は剛性リンカーである。

【０４４６】

一部の実施形態では、L_{c1}、及びL_{c2}は剛性リンカーである。

【０４４７】

一部の実施形態では、L_{c1}、L_{c2}及びL_{c3}は剛性リンカーである。

【０４４８】

一部の実施形態では、L_{c1}、L_{c2}及び/又はL_{c3}は存在しなくてよい。

【０４４９】

一部の実施形態では、L_{c2}、及び/又はL_{c3}は存在しなくてよい。

【０４５０】

一部の実施形態では、L_{c1}、及び/又はL_{c3}は存在しなくてよい。

【０４５１】

一部の実施形態では、L_{c2}及び/又はL_{c3}は存在しなくてよい。

【０４５２】

一部の実施形態では、L_{c1}、L_{c2}、及びL_{c3}は存在しなくてよい。

【０４５３】

本開示のポリペプチド鎖は、単一の鎖として、又は本明細書に開示される結合剤の部分である場合に機能的に活性である抗原結合性ドメインを含む。

【０４５４】

例えば、ポリペプチド鎖の抗原結合性ドメインは、その標的に結合してよく、生物学的に活性であってよい。

【０４５５】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインの生物学的活性は、限定なく例えば、標的のその天然の受容体又はリガンドへの結合を遮断することを含む。代替的に、抗原結合性ドメインの生物学的活性は、標的を隔離するその能力を含む。更に、抗原結合性ドメインの生物学的活性は、シグナル伝達を誘導するその能力を含む。

【０４５６】

1つより多くの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖は、多価であるとして特徴付けられる。

【０４５７】

本開示のポリペプチド鎖は、そのN若しくはC末端又は両方の末端における追加のアミノ酸配列(本明細書に開示される式においてそれぞれX及びYにより定義される)を含んでよい。

【０４５８】

一部の実施形態では、N末端におけるアミノ酸配列(Xにより定義される)はシグナルペプチドを含んでよく、その例示的な実施形態は配列番号133に提供される。

【０４５９】

一部の実施形態では、N末端におけるアミノ酸配列(Xにより定義される)又はC末端におけるアミノ酸配列(Yにより定義される)は、独立して、リンカー、サイトカイン、ケモカイン、タグ(例えば、Hisタグ(例えば配列番号134))、マスキングドメイン、ファージコートタンパク質、抗原結合性ドメイン又はこれらの組合せを含んでよい。

【０４６０】

多特異性ポリペプチド鎖の例示的な実施形態としては、異なる結合特異性に繋がるそれらのCDRのうちの1つ又は複数のアミノ酸配列において異なる少なくとも2つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖が挙げられる。

【０４６１】

ポリペプチド鎖は、より特には、それが2つの異なるエピトープ又は抗原に結合する場合に二特異的であるとして特徴付けられてよい。ポリペプチド鎖は、それが3つの異なるエピトープ又は抗原に結合する場合に三特異的であるとして特徴付けられてよい。ポリペプチド鎖は、それが4つの異なるエピトープ又は抗原に結合する場合に四特異的であるとして特徴付けられてよい。ポリペプチド鎖は、それが5つの異なるエピトープ又は抗原に結合する場合に五特異的であるとして特徴付けられてよい。ポリペプチド鎖は、それが6つの異なるエピトープ又は抗原に結合する場合に六特異的であるとして特徴付けられてよい。

【０４６２】

同じ標的上の2つのオーバーラップしないエピトープに結合する2つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖は、二パラトープ性であるとして特徴付けられる。同じ標的上の3、4又はより多くのエピトープに結合する抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖は、多パラトープ性であるとして特徴付けられる。

【０４６３】

所与のポリペプチド鎖の抗原結合性ドメインは、意図される用途、例えば検出、診断及び/又は治療用途に基づいて選択される。特定のポリペプチド鎖の抗原結合性ドメインの各々は、相加的又は相乗的効果を生成するように選択されてよい。

【０４６４】

一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、疾患又は状態に関与するタンパク質に特異的に結合する能力について選択されてよい。

【０４６５】

例えば、本開示のポリペプチド鎖は、腫瘍細胞又は腫瘍細胞環境により発現される抗原に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメイン(即ち、腫瘍特異的抗原結合性ドメイン)を含んでよい。

【０４６６】

本開示の他の態様及び実施形態では、ポリペプチド鎖は、免疫調節因子に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０４６７】

例えば、ポリペプチド鎖は、免疫チェックポイントタンパク質、サイトカイン、ケモカイン又は免疫受容体若しくは補助受容体等に結合する1つ又は複数の抗原結合性ドメイン(例えば、免疫特異的抗原結合性ドメイン)を含んでよい。

【０４６８】

一部の例示的な実施形態では、抗原結合性ドメインはドーパミン受容体D2(DR2)に結合してよい。

【０４６９】

一部の例示的な実施形態では、抗原結合性ドメインはPD1に結合してよい。

【０４７０】

一部の例示的な実施形態では、抗原結合性ドメインはCD47に結合してよい。

【０４７１】

例示的な実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は、少なくとも1つの腫瘍特異的抗原結合性ドメイン及び少なくとも1つの免疫特異的抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０４７２】

一部の実施形態では、腫瘍特異的抗原結合性ドメインは二量体化ドメインのN末端に位置してよい。

【０４７３】

一部の実施形態では、腫瘍特異的抗原結合性ドメインは、二量体化ドメインのC末端に位置してよい。

【０４７４】

一部の実施形態では、腫瘍特異的抗原結合性ドメインは、二量体化ドメインのN末端及びC末端の両方に位置してよい。

【０４７５】
一部の実施形態では、複数の免疫特異的抗原結合性ドメインは、二量体化ドメインのN末端に位置してよい。
【０４７６】
一部の実施形態では、免疫特異的抗原結合性ドメインは、二量体化ドメインのC末端に位置してよい。
【０４７７】
一部の実施形態では、免疫特異的抗原結合性ドメインは、二量体化ドメインのN末端及びC末端の両方に位置してよい。
【０４７８】
例示的且つ非限定的な実施形態では、ポリペプチド鎖又は結合剤は、二量体化ドメインのC末端において2つの免疫特異的抗原結合性ドメインを含んでよい。一部の実施形態では、二量体化ドメインのC末端部分に直ちに隣接する免疫特異的抗原結合性ドメインは、切断不可能なリンカーを介して連結されてよい。
【０４７９】
二量体化ドメイン(DD)
一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は二量体化ドメインを含む。そのため、2つのポリペプチド鎖は、アセンブルして結合剤を形成してよい。結合剤の例示的な実施形態はホモ二量体及びヘテロ二量体を含む。
【０４８０】
二量体化ドメインは、限定なく例えば、例えば重鎖免疫グロブリンのFc、CH2及び/又はCH3ドメインを含めて、免疫グロブリンの定常領域を含んでよい。
【０４８１】
本開示のある特定の実施形態及び態様では、二量体化ドメインは、天然IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4定常領域又はそれらの対応するCH2及び/若しくはCH3ドメインの配列と同一の配列を有してよい。
【０４８２】
天然ヒト抗体の配列と同一の配列を有する二量体化ドメインが本開示に特に包含される。二量体化ドメインの例示的な実施形態としては、例えば天然ヒト重鎖のCH2-CH3ドメインが挙げられる。
【０４８３】
よって、一部の実施形態では、二量体化ドメインは、抗体の天然定常領域、例えば、天然ヒトIgG1定常領域、天然ヒトIgG2定常領域、天然ヒトIgG3定常領域又は天然ヒトIgG4定常領域等を含む。
【０４８４】
よって、一部の実施形態では、二量体化ドメインは天然CH3ドメインを含む。
【０４８５】
例示的な実施形態では、二量体化ドメインは天然ヒトCH3ドメインを含む。
【０４８６】
一部の実施形態では、二量体化ドメインは天然CH2ドメイン及び天然CH3ドメインを含む。
【０４８７】
一部の実施形態では、天然CH3ドメインは天然IgG1 CH3ドメインである。一部の実施形態では、天然CH3ドメインは天然ヒトIgG1 CH3(例えば、配列番号116)である。
【０４８８】
一部の実施形態では、天然CH3ドメインは天然IgG2 CH3ドメインである。他の実施形態では、天然CH3ドメインは天然ヒトIgG2 CH3ドメインである。
【０４８９】
一部の実施形態では、天然CH3ドメインは天然IgG3 CH3ドメインである。他の実施形態では、天然CH3ドメインは天然ヒトIgG3 CH3ドメインである。

【０４９０】
一部の実施形態では、天然CH3ドメインは天然IgG4 CH3ドメインである。一部の実施形態では、天然CH3ドメインは天然ヒトIgG4 CH3ドメインである。
【０４９１】
結合剤の2つのポリペプチド鎖が同じアミノ酸配列から構成される場合、結合剤はホモ二量体を形成する。しかしながら、天然抗体のCH2-CH3ドメインを有するが異なるアミノ酸配列を有するポリペプチド鎖の共発現は、ホモ二量体及びヘテロ二量体の混合物を結果としてもたらしうる。混合物中に存在する異なる結合剤は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーを含む、当技術分野において公知の方法により分離されうる。
【０４９２】
本開示の例示的なヘテロ二量体は、したがって、天然抗体のCH3ドメイン又はCH2-CH3ドメインを有し、且つ異なる配列又は構成を有する2つのポリペプチド鎖により形成されるものを含む。
【０４９３】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、天然又は野生型配列と比較して、例えば、1～30、1～20、1～15、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3個のアミノ酸置換を含む変異型二量体化ドメインを有してよい。
【０４９４】
例示的な実施形態では、変異型二量体化ドメインは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個のアミノ酸置換を含んでよい。アミノ酸置換は、表2(表2)に概説されるように保存的又は非保存的であってよい。
【０４９５】
例示的な実施形態では、ポリペプチド鎖は、天然IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4定常領域又はCH2及び/若しくはCH3ドメインの配列と80%～99%同一の配列を有する変異型二量体化ドメインを有してよい。本開示に包含されるポリペプチド鎖としては、天然IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4定常領域又はCH2及び/若しくはCH3ドメインの配列と85%～99%同一の、90%～99%同一の、95%～99%同一の変異型二量体化ドメインを含むものが挙げられる。
【０４９６】
一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は、ヘテロ二量体形成を有利にするアミノ酸置換を含む変異型二量体化ドメインを含んでよい。本開示のヘテロ二量体は、したがって、そのような変異を含むポリペプチド鎖により形成されてよい。
【０４９７】
よって、一部の実施形態では、二量体化ドメインは、抗体の変異型定常領域、例えば、変異型ヒトIgG1定常領域、変異型ヒトIgG2定常領域、変異型ヒトIgG3定常領域又は変異型ヒトIgG4定常領域等を含む。変異型定常領域は、天然定常領域と比較して1つ又は複数のアミノ酸置換、アミノ酸挿入又はアミノ酸欠失を有してよい。
【０４９８】
よって、一部の実施形態では、二量体化ドメインは変異型CH3ドメインを含む。変異型CH3ドメインは、天然CH3ドメインと比較して1つ又は複数のアミノ酸置換、アミノ酸挿入又はアミノ酸欠失を有してよい。
【０４９９】
一部の実施形態では、二量体化ドメインは天然CH2及び変異型CH3ドメインを含む。
【０５００】
一部の実施形態では、二量体化ドメインは変異型CH2及び変異型CH3ドメインを含む。変異型CH2ドメインは、天然CH2ドメインと比較して1つ又は複数のアミノ酸置換、アミノ酸挿入又はアミノ酸欠失を有してよい。
【０５０１】
一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは変異型IgG1 CH3ドメインである。他の実施形態では、変異型CH3ドメインは変異型ヒトIgG1 CH3ドメインである。

【０５０２】
一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは変異型IgG2 CH3ドメインである。他の実施形態では、変異型CH3ドメインは変異型ヒトIgG2 CH3ドメインである。
【０５０３】
一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは変異型IgG3 CH3ドメインである。他の実施形態では、変異型CH3ドメインは変異型ヒトIgG3 CH3ドメインである。
【０５０４】
一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは変異型IgG4 CH3ドメインである。他の実施形態では、変異型CH3ドメインは変異型ヒトIgG4 CH3ドメインである。
【０５０５】
一部の実施形態では、変異型CH2ドメインは変異型IgG1 CH2ドメインである。他の実施形態では、変異型CH2ドメインは変異型ヒトIgG1 CH2ドメインである。
【０５０６】
一部の実施形態では、変異型CH2ドメインは変異型IgG2 CH2ドメインである。他の実施形態では、変異型CH2ドメインは変異型ヒトIgG2 CH2ドメインである。
【０５０７】
一部の実施形態では、変異型CH2ドメインは変異型IgG3 CH2ドメインである。他の実施形態では、変異型CH2ドメインは変異型ヒトIgG3 CH2ドメインである。
【０５０８】
一部の実施形態では、変異型CH2ドメインは変異型IgG4 CH2ドメインである。他の実施形態では、変異型CH2ドメインは変異型ヒトIgG4 CH2ドメインである。
【０５０９】
一部の実施形態では、Fc領域は、グリコシル化を予防し、その半減期を延長させ、受容体結合又はエフェクター機能をモジュレートするように改変されてよい。例示的な変異は、Saunders K.O.(Front. Immunol. 10:1296頁、2019;その全内容は参照により本明細書に組み込まれる)において議論されており、例えばアスパラギン297(例えば、N297)の変異が挙げられる。
【０５１０】
本開示によれば、変異型CH3ドメインは、天然CH3ドメインと比較して1つ又は複数の変異を含む。よって、一部の実施形態では、二量体化ドメインは、天然CH3ドメインと比較して1つ又は複数の変異を含む変異型CH3ドメインを含む。
【０５１１】
例えば、変異型CH3ドメインは、ヒトIgG1の天然CH3ドメインと比較して1つ又は複数の変異を含んでよい。別の例では、変異型CH3ドメインは、ヒトIgG2の天然CH3ドメインと比較して1つ又は複数の変異を含んでよい。更に別の例では、変異型CH3ドメインは、ヒトIgG3の天然CH3ドメインと比較して1つ又は複数の変異を含んでよい。更なる例では、変異型CH3ドメインは、ヒトIgG4の天然CH3ドメインと比較して1つ又は複数の変異を含んでよい。
【０５１２】
一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、(EUナンバリングシステムにしたがって)356位、357位、370位、399位及び/又は439位におけるアミノ酸置換を含んでよい。
【０５１３】
一部の実施形態では、二量体化ドメインは、ヒトIgG1又はIgG4の天然CH3ドメインと比較して(EUナンバリングシステムにしたがって)D399、D/E356及び/又はK370に対応する位置における1つ又は複数の変異を含む変異型CH3ドメインを含む。
【０５１４】
他の実施形態では、二量体化ドメインは、ヒトIgG1又はIgG4の天然CH3ドメインと比較して(EUナンバリングシステムにしたがって)D399、E357及び/又はK439に対応する位置における1つ又は複数の変異を含む変異型CH3ドメインを含む。

【０５１５】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、ヒトＩｇＧ１又はＩｇＧ４の天然ＣＨ３ドメインと比較して(ＥＵナンバリングシステムにしたがって)Ｙ３４９、Ｔ３５０、Ｌ３５１、Ｐ３５２、Ｓ３５４、Ｒ/Ｑ３５５、Ｔ３９４及び/又はＰ３９５に対応する位置における１つ又は複数の変異を更に含む。
【０５１６】
例示的な実施形態では、所与の結合剤の１つのポリペプチド鎖は、例えば、(ＥＵナンバリングシステムにしたがって)３５７位、３９９位及び４３９位におけるアミノ酸置換を有する、変異型ＣＨ３ドメインを含んでよい一方、結合剤の他のポリペプチド鎖は、例えば、３５６位、３７０位及び３９９位におけるアミノ酸置換を有する、変異型ＣＨ３ドメインを含んでよい。
【０５１７】
例示的な実施形態では、所与の結合剤の１つのポリペプチド鎖は、例えば、(ＥＵナンバリングシステムにしたがって)３５７位、３９９位及び４３９位におけるアミノ酸置換を有する、変異型ＣＨ３ドメインを含んでよい一方、結合剤の他のポリペプチド鎖は、例えば、３５６位、３７０位及び３９９位におけるアミノ酸置換を有する、変異型ＣＨ３ドメインを含んでよい。所与の結合剤の１つ又は両方のポリペプチド鎖は、３４９、３５０、３５１、３５２、３５４、３５５、３９４及び/又は３９５から選択される位置における変異を任意選択で更に含んでよい。所与の結合剤の１つのポリペプチド鎖は、そのため、本明細書に開示されるアミノ酸配列を有する第１の二量体化ドメイン(DD_1)を含んでよく、所与の結合剤の他のポリペプチド鎖は、そのため、本明細書に開示されるアミノ酸配列を有する第２の二量体化ドメイン(DD_2)を含んでよい。
【０５１８】
一部の実施形態では、３５６位におけるアミノ酸は中性アミノ酸により置き換えられてよい。一部の実施形態では、３７０位におけるアミノ酸は正に荷電したアミノ酸により置き換えられてよい。一部の実施形態では、３９９位におけるアミノ酸は中性アミノ酸により置き換えられてよい。一部の実施形態では、３５７位におけるアミノ酸は中性アミノ酸により置き換えられてよい。一部の実施形態では、４３９位におけるアミノ酸は負に荷電したアミノ酸により置き換えられてよい。
【０５１９】
例えば、ヘテロ二量体形成を有利にするために、ポリペプチド鎖のうちの１つは、a)３５６位におけるアスパラギン酸(Ｄ)又はグルタミン酸(Ｅ)を中性アミノ酸に、b)３７０位におけるリジン(Ｋ)を正に荷電したアミノ酸に、及びc)３９９位におけるアスパラギン酸(Ｄ)を中性アミノ酸に置き換えることにより変異されてよく、他のポリペプチド鎖は、a)３５７位におけるグルタミン酸(Ｅ)を中性アミノ酸に、b)３９９位におけるアスパラギン酸(Ｄ)を中性アミノ酸に、及びc)４３９位におけるリジン(Ｋ)を負に荷電したアミノ酸に置き換えることにより変異されてよい。
【０５２０】
本開示のポリペプチド鎖の例示的な実施形態は、３５６位におけるアスパラギン酸(Ｄ)又はグルタミン酸(Ｅ)がグルタミン(Ｑ)に変更されてよく、３７０位におけるリジン(Ｋ)がグルタミン酸(Ｅ)に変更されてよく、且つ３９９位におけるアスパラギン酸(Ｄ)がアスパラギン(Ｎ)に変更されてよい変異型ＣＨ３ドメインを含む二量体化ドメインを含んでよい。
【０５２１】
本開示のポリペプチド鎖の別の例示的な実施形態は、３５７位におけるグルタミン酸(Ｅ)がグルタミン(Ｑ)に変更されてよく、３９９位におけるアスパラギン酸(Ｄ)がアスパラギン(Ｎ)に変更されてよく、且つ４３９位におけるリジン(Ｋ)がグルタミン酸(Ｅ)に変更されてよい変異型ＣＨ３ドメインを含む二量体化ドメインを含んでよい。
【０５２２】
一部の実施形態では、二量体化ドメインは、(天然ＣＨ３ドメインと比較した)アミノ酸置換が、

a.位置D399におけるアミノ酸置換;
b.位置D/E356におけるアミノ酸置換;
c.位置E357におけるアミノ酸置換;
d.位置K370におけるアミノ酸置換;
e.位置K439におけるアミノ酸置換;
f.位置Y349におけるアミノ酸置換;
g.位置T350におけるアミノ酸置換;
h.位置L351におけるアミノ酸置換;
i.位置P352におけるアミノ酸置換;
j.位置S354におけるアミノ酸置換;
k.位置R355におけるアミノ酸置換;
l.位置Q355におけるアミノ酸置換;
m.位置T394におけるアミノ酸置換;
n.位置P395におけるアミノ酸置換;
o.位置Y349におけるアミノ酸置換;及び
p. a.～o.のうちの2つ又はより多くの任意の組合せ
から選択される変異型CH3ドメインを含む。

【０５２３】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、位置D399、D/E356、K370及びY349におけるアミノ酸置換を含んでよい。

【０５２４】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、位置D399、D/E356、K370及びT350におけるアミノ酸置換を含んでよい。

【０５２５】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、位置D399、D/E356、K370及びL351におけるアミノ酸置換を含んでよい。

【０５２６】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、位置D399、D/E356、K370及びP352におけるアミノ酸置換を含んでよい。

【０５２７】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、位置D399、D/E356、K370及びS354におけるアミノ酸置換を含んでよい。

【０５２８】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、位置D399、D/E356、K370及びR355におけるアミノ酸置換を含んでよい。

【０５２９】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、位置D399、D/E356、K370及びQ355におけるアミノ酸置換を含んでよい。

【０５３０】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、位置D399、D/E356、K370及びT394におけるアミノ酸置換を含んでよい。

【０５３１】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、位置D399、D/E356、K370、Y349及びS354におけるアミノ酸置換を含んでよい。

【０５３２】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、位置D399、K439、E357及びY349におけるアミノ酸置換を含んでよい。

【０５３３】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、位置D399、E357、K439及びT350におけるアミノ酸置換を含む。

【０５３４】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、位置Ｄ３９９、Ｅ３５７、Ｋ４３９Ｅ及びＬ３５１におけるアミノ酸置換を含む。
【０５３５】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、位置Ｄ３９９、Ｋ４３９、Ｅ３５７及びＰ３５２におけるアミノ酸置換を含んでよい。
【０５３６】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、位置Ｄ３９９、Ｋ４３９、Ｅ３５７及びＳ３５４におけるアミノ酸置換を含んでよい。
【０５３７】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、位置Ｄ３９９、Ｋ４３９、Ｅ３５７及びＲ３５５におけるアミノ酸置換を含んでよい。
【０５３８】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、位置Ｄ３９９、Ｋ４３９、Ｅ３５７及びＱ３５５における変異を含んでよい。
【０５３９】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、位置Ｄ３９９、Ｋ４３９、Ｅ３５７及びＰ３９５におけるアミノ酸置換を含んでよい。
【０５４０】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、位置Ｄ３９９、Ｅ３５７、Ｋ４３９、Ｙ３４９及びＳ３５４におけるアミノ酸置換を含む。
【０５４１】
天然ＣＨ３ドメイン又は変異型ＣＨ３ドメイン中の他のアミノ酸置換(他の位置におけるもの又は他のアミノ酸残基を用いる同じ位置におけるもの)が、二量体を形成するポリペプチド鎖の能力に影響することなく実行されうることが理解されるべきである。
【０５４２】
一部の実施形態では、位置Ｙ３４９におけるアミノ酸置換は、Ｙ３４９Ｋ、Ｙ３４９Ｄ又はＹ３４９Ｒから選択される。より特には、一部の実施形態では、位置Ｙ３４９におけるアミノ酸置換はＹ３４９Ｋである。他の実施形態では、位置Ｙ３４９におけるアミノ酸置換はＹ３４９Ｄである。
【０５４３】
一部の実施形態では、位置Ｓ３５４におけるアミノ酸置換は、Ｓ３５４Ｋ、Ｓ３５４Ｄ、Ｓ３５４Ｗ又はＳ３５４Ｍから選択される。より特には、一部の実施形態では、位置Ｓ３５４におけるアミノ酸置換はＳ３５４Ｋである。他の実施形態では、位置Ｓ３５４におけるアミノ酸置換はＳ３５４Ｄである。他の実施形態では、位置Ｓ３５４におけるアミノ酸置換はＳ３５４Ｍである。
【０５４４】
一部の実施形態では、位置Ｌ３５１におけるアミノ酸置換は、Ｌ３５１Ｙ、Ｌ３５１Ｗ、Ｌ３５１Ｈ、Ｌ３５１Ｒ、Ｌ３５１Ｄ、Ｌ３５１Ａ、Ｌ３５１Ｔである。より特には、一部の実施形態では、位置Ｌ３５１におけるアミノ酸置換はＬ３５１Ｙである。他の実施形態では、位置Ｌ３５１におけるアミノ酸置換はＬ３５１Ｗである。他の実施形態では、位置Ｌ３５１におけるアミノ酸置換はＬ３５１Ｒである。
【０５４５】
一部の実施形態では、位置Ｔ３５０におけるアミノ酸置換は、Ｔ３５０Ｌ、Ｔ３５０Ｉ又はＴ３５０Ｖである。より特には、一部の実施形態では、位置Ｔ３５０におけるアミノ酸置換はＴ３５０Ｉである。他の実施形態では、位置Ｔ３５０におけるアミノ酸置換はＴ３５０Ｖである。
【０５４６】
一部の実施形態では、位置Ｐ３５２におけるアミノ酸置換は、Ｐ３５２Ｙ、Ｐ３５２Ｖ、Ｐ３５２Ｒ、Ｐ３５２Ｔ、Ｐ３５２Ｌ、Ｐ３５２Ｇ、Ｐ３５２Ｅ、Ｐ３５２Ｃ、Ｐ３５２Ｋ又はＰ３５２Ｄである。より特には、一部の実施形態では、位置Ｐ３５２におけるアミノ酸置換はＰ３５２Ｒである。他の実施形態では、位置Ｐ３５２におけるアミノ酸置換はＰ３５２Ｅである。

【０５４７】
一部の実施形態では、位置Ｔ３９４におけるアミノ酸置換はＴ３９４Ｎである。
【０５４８】
一部の実施形態では、位置Ｐ３９５におけるアミノ酸置換はＰ３９５Ｉである。他の実施形態では、位置Ｐ３９５におけるアミノ酸置換はＰ３９５Ｇである。他の実施形態では、位置Ｐ３９５におけるアミノ酸置換はＰ３９５Ｅである。
【０５４９】
一部の実施形態では、位置Ｒ３５５におけるアミノ酸置換はＲ３５５Ｋである。他の実施形態では、位置Ｒ３５５におけるアミノ酸置換はＲ３５５Ｗである。
【０５５０】
一部の実施形態では、位置Ｑ３５５におけるアミノ酸置換はＱ３５５Ｋである。他の実施形態では、位置Ｑ３５５におけるアミノ酸置換はＱ３５５Ｗである。
【０５５１】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、ＥＵナンバリングにしたがって変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ及びＫ３７０Ｅを含む。
【０５５２】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、ＥＵナンバリングにしたがって変異Ｄ３９９Ｑ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ及びＫ３７０Ｅを含む。
【０５５３】
他の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、ＥＵナンバリングにしたがって変異Ｄ３９９Ｎ、Ｅ３５７Ｑ及びＫ４３９Ｅを含む。
【０５５４】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｑ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ、Ｙ３４９Ｋ及びＳ３５４Ｋを含んでよい。
【０５５５】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＬ３５１Ｗを含んでよい。
【０５５６】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＳ３５４Ｍを含んでよい。
【０５５７】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＴ３５０Ｉを含んでよい。
【０５５８】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＴ３５０Ｖを含んでよい。
【０５５９】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＰ３５２Ｒを含んでよい。
【０５６０】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＰ３５２Ｅを含んでよい。
【０５６１】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｑ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ及びＫ３７０Ｅを含んでよい。
【０５６２】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＬ３５１Ｙを含んでよい。
【０５６３】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ、

及びＬ３５１Ｈを含んでよい。
【０５６４】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ、及びＲ３５５Ｋを含んでよい。
【０５６５】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ、及びＱ３５５Ｋを含んでよい。
【０５６６】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＳ３５４Ｋを含んでよい。
【０５６７】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＴ３５０Ｌを含んでよい。
【０５６８】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＴ３９４Ｎを含んでよい。
【０５６９】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＰ３５２Ｙを含んでよい。
【０５７０】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＰ３５２Ｖを含んでよい。
【０５７１】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＰ３５２Ｔを含んでよい。
【０５７２】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＰ３５２Ｌを含んでよい。
【０５７３】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＰ３５２Ｇを含んでよい。
【０５７４】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＰ３５２Ｃを含んでよい。
【０５７５】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＬ３５１Ｔを含んでよい。
【０５７６】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｄ/Ｅ３５６Ｑ、Ｋ３７０Ｅ及びＬ３５１Ａを含んでよい。
【０５７７】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｑ、Ｅ３５７Ｑ、Ｋ４３９Ｅ、Ｙ３４９Ｄ及びＳ３５４Ｄを含む。
【０５７８】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｅ３５７Ｑ、Ｋ４３９Ｅ及びＬ３５１Ｒを含む。
【０５７９】
一部の実施形態では、変異型ＣＨ３ドメインは、変異Ｄ３９９Ｎ、Ｅ３５７Ｑ、Ｋ４３９Ｅ及びＬ３５１Ｙを含む。
【０５８０】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、E357Q、K439E及びT350Iを含む。

【０５８１】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、E357Q、K439E及びT350Vを含んでよい。

【０５８２】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399Q、K439E、E357Qを含んでよい。

【０５８３】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、K439E、E357Q、S354Kを含んでよい。

【０５８４】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、K439E、E357Q、S354Wを含んでよい。

【０５８５】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、K439E、E357Q、Y349Rを含んでよい。

【０５８６】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、K439E、E357Q、T350Lを含んでよい。

【０５８７】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、K439E、E357Q、R355Wを含んでよい。

【０５８８】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、K439E、E357Q、Q355Wを含んでよい。

【０５８９】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、K439E、E357Q、P395Iを含んでよい。

【０５９０】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、K439E、E357Q、P395Gを含んでよい。

【０５９１】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、K439E、E357Q、P395Eを含んでよい。

【０５９２】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、K439E、E357Q、P352Kを含んでよい。

【０５９３】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、K439E、E357Q、P352Dを含んでよい。

【０５９４】

一部の実施形態では、変異型CH3ドメインは、変異D399N、K439E、E357Q、L351Dを含んでよい。

【０５９５】

一部の実施形態では、結合剤は2つのポリペプチド鎖を含み;

2つのポリペプチド鎖のうちの1つは、EUナンバリングにしたがってD399、D/E356及び/又はK370に対応する位置における1つ又は複数のアミノ酸置換を含む変異型CH3ドメインを含む第1の二量体化ドメイン(DD_1)を含み;且つ

2つのポリペプチド鎖のうちの他方は、EUナンバリングにしたがってD399、E357及

び/又はK439に対応する位置における1つ又は複数のアミノ酸置換を含む変異型CH3ドメインを含む第2の二量体化ドメイン(DD_2)を含む。

【0596】

一部の実施形態では、第1の二量体化ドメイン(DD_1)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q及びK370Eを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ第2の二量体化ドメイン(DD_2)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q及びK439Eを含む変異型CH3ドメインを含む。

【0597】

一部の実施形態では、第1の二量体化ドメイン(DD_1)及び/又は第2の二量体化ドメイン(DD_2)は、EUナンバリングにしたがってY349、T350、L351、P352及び/又はS354に対応する位置におけるアミノ酸置換を更に含む変異型CH3ドメインを含む。

【0598】

一部の実施形態では、第1の二量体化ドメイン(DD_1)は、EUナンバリングにしたがって変異D399Q、D/E356Q、K370E、Y349K及びS354Kを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ第2の二量体化ドメイン(DD_2)は、EUナンバリングにしたがって変異D399Q、E357Q、K439E、Y349D及びS354Dを含む変異型CH3ドメインを含む。

【0599】

一部の実施形態では、第1の二量体化ドメイン(DD_1)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q、K370E及びL351Wを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ第2の二量体化ドメイン(DD_2)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q、K439E及びL351Rを含む変異型CH3ドメインを含む。

【0600】

一部の実施形態では、第1の二量体化ドメイン(DD_1)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q、K370E及びS354Mを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ第2の二量体化ドメイン(DD_2)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q、K439E及びL351Yを含む変異型CH3ドメインを含む。

【0601】

一部の実施形態では、第1の二量体化ドメイン(DD_1)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q、K370E及びT350Iを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ第2の二量体化ドメイン(DD_2)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q、K439E及びT350Iを含む変異型CH3ドメインを含む。

【0602】

一部の実施形態では、第1の二量体化ドメイン(DD_1)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q、K370E及びT350Vを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ第2の二量体化ドメイン(DD_2)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q、K439E及びT350Vを含む変異型CH3ドメインを含む。

【0603】

一部の実施形態では、第1の二量体化ドメイン(DD_1)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q、K370E及びP352Rを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ第2の二量体化ドメイン(DD_2)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q、K439E及びL351Rを含む変異型CH3ドメインを含む。

【0604】

一部の実施形態では、第1の二量体化ドメイン(DD_1)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、D/E356Q、K370E及びP352Eを含む変異型CH3ドメインを含み、且つ第2の二量体化ドメイン(DD_2)は、EUナンバリングにしたがって変異D399N、E357Q、K439E及びL351Rを含む変異型CH3ドメインを含む。

【0605】

本開示によれば、結合剤は、会合して、本明細書においてヘテロ二量体として参照される二量体を形成する2つの異なるポリペプチド鎖から構成されてよい。

【0606】

ヘテロ二量体は、2つの異なるポリペプチド鎖(例えば、鎖A及び鎖B)を共発現させることにより製造されうる。

【０６０７】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、ヘテロ二量体の形成を有利にする野生型ヒトCH2及び変異型ヒトCH3を含む二量体化ドメインを含んでよい。一部の事例では、ポリペプチド鎖は、単独で発現された場合にホモ二量体を形成するか、又は相補的な鎖と共に発現された場合にヘテロ二量体(若しくはホモ二量体及びヘテロ二量体の混合物)を形成する可能性を有する。

【０６０８】

ヘテロ二量体は、特には、CH3変異を含むポリペプチド鎖のセット(Table 1(表1)に例示される鎖A及び鎖B)のトランスフェクションにより製造された。

【０６０９】

【表１】

Table 1. 鎖A及び鎖B(天然ヒトIgG1 CH2及び変異型IgG1 CH3)の例示的な実施形態

鎖ID	CH3変異	鎖ID	CH3変異
鎖A	D399N, K370E, E356Q	鎖B	D399N, K439E, E357Q
鎖A	D399Q, K370E, E356Q	鎖B	D399Q, K439E, E357Q
鎖A	D399Q, K370E, E356Q, Y349K, S354K	鎖B	D399Q, K439E, E357Q, Y349D, S354D
鎖A	D399N, K370E, E356Q, L351Y	鎖B	D399N, K439E, E357Q, S354K
鎖A	D399N, K370E, E356Q, L351H	鎖B	D399N, K439E, E357Q, S354W
鎖A	D399N, K370E, E356Q, S354M	鎖B	D399N, K439E, E357Q, L351Y
鎖A	D399N, K370E, E356Q, R355K	鎖B	D399N, K439E, E357Q, Y349R
鎖A	D399N, K370E, E356Q, S354K	鎖B	D399N, K439E, E357Q, T350L
鎖A	D399N, K370E, E356Q, T350I	鎖B	D399N, K439E, E357Q, T350I
鎖A	D399N, K370E, E356Q, T350L	鎖B	D399N, K439E, E357Q, R355W
鎖A	D399N, K370E, E356Q, T350V	鎖B	D399N, K439E, E357Q, T350V
鎖A	D399N, K370E, E356Q, T394N	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P395I
鎖A	D399N, K370E, E356Q, T394N	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P395G
鎖A	D399N, K370E, E356Q, T394N	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P395E
鎖A	D399N, K370E, E356Q, P352Y	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P352K
鎖A	D399N, K370E, E356Q, P352V	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P352K
鎖A	D399N, K370E, E356Q, P352T	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P352K
鎖A	D399N, K370E, E356Q, P352R	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P352K
鎖A	D399N, K370E, E356Q, P352R	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P352D
鎖A	D399N, K370E, E356Q, P352R	鎖B	D399N, K439E, E357Q, L351R
鎖A	D399N, K370E, E356Q, P352L	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P352K
鎖A	D399N, K370E, E356Q, P352G	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P352K
鎖A	D399N, K370E, E356Q, P352E	鎖B	D399N, K439E, E357Q, L351R
鎖A	D399N, K370E, E356Q, P352C	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P352K
鎖A	D399N, K370E, E356Q, P352C	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P352D
鎖A	D399N, K370E, E356Q, L351W	鎖B	D399N, K439E, E357Q, L351R
鎖A	D399N, K370E, E356Q, L351T	鎖B	D399N, K439E, E357Q, P352K
鎖A	D399N, K370E, E356Q, L351A	鎖B	D399N, K439E, E357Q, L351R
鎖A	D399N, K370E, E356Q, P352Y	鎖B	D399N, K439E, E357Q
鎖A	D399Q, K370E, E356Q, Y349K, S354K	鎖B	D399N, K439E, E357Q
鎖A	D399Q, K370E, E356Q, Y349K, S354K	鎖B	D399N, K439E, E357Q, L351R
変異はヒトIgGのCH3ドメインに導入されうる。EUナンバリングによるアミノ酸残基のナンバリング			

【０６１０】

鎖Bに対する鎖Aの比に依存して、2つのそのようなポリペプチド鎖の共発現でホモ二量体を形成させることも可能である。

【０６１１】

よって、一部の状況では、ポリペプチド鎖Bとのポリペプチド鎖Aの共発現は、したがって、鎖A及び鎖Bのヘテロ二量体、鎖Aのホモ二量体、鎖Bのホモ二量体並びにこれらの混合物を結果としてもたらしうる。鎖A及び/又は鎖Bの残留する単量体が存在することもまた可能である。単量体、ヘテロ二量体及びホモ二量体の各々は抗原結合性ドメインを含有するので、混合物の各成分は何らかの活性レベルを有しうる。

【０６１２】
したがって、本明細書に開示されるCH3変異を含む単量体、ヘテロ二量体及びホモ二量体の他に、そのような単量体、ヘテロ二量体及び/又はホモ二量体の混合物は本開示に包含される。
【０６１３】
他の実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチド鎖は、ヘテロ二量体形成を有利にするための当該技術分野において公知の変異を含む変異型二量体化ドメインを含んでよい。
【０６１４】
例えば、本開示のポリペプチド鎖は、本明細書に開示される式I、式II、式III、式IIIa及び式IIIb、式IV、式V、式VI、式VII又は式VIIIに記載される構成並びにヘテロ二量体形成を有利にすることが当技術分野において公知の変異を含んでよい。
【０６１５】
そのような変異の例示的な実施形態は、例えば、Ha, J-Hら(Front Immunol、2016;7:394頁)又はGodar Mら(Expert Opinion on Therapeutic patents、2018;28(3):251～276頁)に開示されており、これらの全内容は参照により組み込まれ、例えば、ノブ-イントゥー-ホール(第1のCH3ドメインの変異T366Y及び第2のCH3ドメインの変異Y407T、第1のCH3ドメインの変異T366W及び第2のCH3ドメインの変異T366S、L368A、Y407V、又は第1のCH3ドメインの変異S354C、T366W及び第2のCH3ドメインの変異Y349C、T366S、L368A、Y407V)、DD/KK変異(第1のCH3ドメインの変異K409D、K392D、第2のCH3ドメインの変異D399K、E356K)、非対称再操作技術(第1のCH3ドメインの変異E356K、E357K、D399K及び第2のCH3ドメインの変異K439E、K370E、K409D)、BiMAb変異(第1のCH3ドメインの変異K249E、K288E、第2のCH3ドメインの変異E236K、D278K)、XmAb変異(第1のCH3ドメインの変異S364H、F405A、第2のCH3ドメインの変異Y349T、T394F)、DuoBody変異(第1のCH3ドメインの変異F405L、第2のCH3ドメインの変異K409R)、Azymetric変異(第1のCH3ドメインの変異T350V、L351Y、S400E、F405A、Y407V、第2のCH3ドメインの変異T350V、T366L、N390R、K392M、T394W)、Biclonics変異(第1のCH3ドメインの変異T366K(+L351K)、第2のCH3ドメインの変異L351D又はY349、L368若しくはY349+R355におけるE若しくはD)、ZW1変異(第1のCH3ドメインの変異T350V、L351Y、F405A、Y407V、第2のCH3ドメインの変異T350V、T366L、K392L、T394W)、7.8.60変異(第1のCH3ドメインの変異K360D、D399M、Y407A、第2のCH3ドメインの変異E345R、Q347R、T366V、K409V)、EW-RVT変異(第1のCH3ドメインの変異K360E、K409W及び第2のCH3ドメインの変異Q347R、D399V、F405T)、EW-RVTs-s変異(第1のCH3ドメインの変異K360E、K409W、Y349C及び第2のCH3ドメインの変異Q347R、D399V、F405T、S354C)、SEED変異(第1のCH3ドメインの変異　IgG1 CH3上のIgA由来45残基及び第2のCH3ドメインの変異　IgA CH3上のIgG1由来57残基)、A107変異(第1のCH3ドメインの変異K370E、K409W、第2のCH3ドメインの変異E357N、D399V、F405T)等が挙げられる。
【０６１６】
リンカー(L)
本明細書に開示されるポリペプチド鎖の異なるモジュールは、リンカーを介して互いに会合してよい。
【０６１７】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖の1つ又は複数のモジュールを接合するために使用されるリンカーは、切断可能なリンカーではない。
【０６１８】
例示的な実施形態では、二量体化ドメインのC末端に直ちに隣接して位置するリンカー(Lc)は、切断可能なリンカーを含まない。
【０６１９】

別の例示的な実施形態では、2つの抗原結合性ドメインの間に位置するリンカーのうちの少なくとも1つは、切断可能なリンカーを含まない。

【０６２０】

他の実施形態では、ポリペプチド鎖の1つ又は複数のモジュールを接合するために使用されるリンカーは、切断不可能なリンカーを含んでよい。

【０６２１】

例示的な実施形態では、二量体化ドメインのC末端に直ちに隣接して位置するリンカーは、切断不可能なリンカーである。

【０６２２】

別の例示的な実施形態では、2つの抗原結合性ドメインの間に位置するリンカーのうちの少なくとも1つは、切断不可能なリンカーである。

【０６２３】

更なる例示的な実施形態では、二量体化ドメインのC末端に直ちに隣接して位置するリンカー及び二量体化ドメインのC末端に位置する第1の2つの抗原結合性ドメインを接合するリンカーは、切断不可能なリンカーである。

【０６２４】

一部の実施形態では、二量体化ドメインのN末端に直ちに隣接するリンカーは、好ましくは、抗体のヒンジ領域を含んでよい。

【０６２５】

一部の実施形態では、ヒンジ領域は、天然のヒンジ領域である。

【０６２６】

一部の実施形態では、天然のヒンジ領域は天然IgG1ヒンジ領域である。一部の実施形態では、天然のヒンジ領域は天然ヒトIgG1ヒンジ領域である。

【０６２７】

一部の実施形態では、天然のヒンジ領域は天然IgG2ヒンジ領域である。他の実施形態では、天然のヒンジ領域は天然ヒトIgG2ヒンジ領域である。

【０６２８】

一部の実施形態では、天然のヒンジ領域は天然IgG3ヒンジ領域である。他の実施形態では、天然のヒンジ領域は天然ヒトIgG3ヒンジ領域である。

【０６２９】

一部の実施形態では、天然のヒンジ領域は天然IgG4ヒンジ領域である。一部の実施形態では、天然のヒンジ領域は天然ヒトIgG4ヒンジ領域である。

【０６３０】

一部の実施形態では、ヒンジ領域は変異型ヒンジ領域である。

【０６３１】

一部の実施形態では、変異型ヒンジ領域は変異型IgG1ヒンジ領域である。一部の実施形態では、変異型ヒンジ領域は変異型ヒトIgG1ヒンジ領域である。

【０６３２】

一部の実施形態では、変異型ヒンジ領域は変異型IgG2ヒンジ領域である。他の実施形態では、変異型ヒンジ領域は変異型ヒトIgG2ヒンジ領域である。

【０６３３】

一部の実施形態では、変異型ヒンジ領域は変異型IgG3ヒンジ領域である。他の実施形態では、変異型ヒンジ領域は変異型ヒトIgG3ヒンジ領域である。

【０６３４】

一部の実施形態では、変異型ヒンジ領域は変異型IgG4ヒンジ領域である。一部の実施形態では、変異型ヒンジ領域は変異型ヒトIgG4ヒンジ領域である。

【０６３５】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖の全てのモジュールは、切断不可能なリンカーを介して連結される。

【０６３６】

切断不可能なリンカーの例示的な実施形態としては、タンパク質発現の間又は製造過程の間に実質的にインタクトなままであるものが挙げられる。本明細書において使用される場合、「実質的にインタクトな」は、リンカー切断が、所与の溶液又は組成物の全ポリペプチド含有量のうちの20%又はそれ未満、15%又はそれ未満、10%又はそれ未満、7.5%又はそれ未満、5%又はそれ未満、4%又はそれ未満、3%又はそれ未満、2%又はそれ未満、1%又はそれ未満において起こることを意味する。

【０６３７】

切断不可能なリンカーの他の例示的な実施形態としてはまた、ヒト又は動物の血液又は血清中に存在する1つ又は複数のプロテアーゼのための特異的な切断部位を含まないリンカーが挙げられる。

【０６３８】

切断不可能なリンカーの追加の例示的な実施形態としては更に、個体における結合剤の投与において投与後に少なくとも1、2、3、4、5、6、12、24、48時間又はより長きにわたり完全性を保持するリンカーが挙げられる。

【０６３９】

更なる例示的な実施形態では、リンカーは、切断不可能なリンカー及び切断可能なリンカーの両方を含む。

【０６４０】

一部の実施形態では、リンカーは切断可能でない。

【０６４１】

一部の事例では、切断可能なリンカーは、本開示のポリペプチド鎖に取り付けられた薬物(例えば、細胞分裂抑制分子、細胞傷害性分子、化学療法剤等)又は標識のin vivo放出のために使用されてよい。

【０６４２】

切断可能なリンカーの例示的な実施形態は、例えば、米国特許出願公開第2019/0010242号明細書に提供されており、プロテアーゼ、通常は細胞外プロテアーゼ、例えば腫瘍又は活性化された免疫エフェクター細胞により産生されるプロテアーゼによる切断に対して感受性のリンカーが挙げられ、ADAMS、ADAMTS、例えばADAMS; ADAMS; ADAM10; ADAM12; ADAM15; ADAM17/TACE; ADAMDEC1; ADAMTS1; ADAMTS4; ADAMTS5;アスパラギン酸プロテアーゼ、例えば、BACE又はレニン;アスパラギン酸カテプシン、例えば、カテプシンD又はカテプシンE;カスパーゼ、例えば、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、又はカスパーゼ14;システインカテプシン、例えば、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンK、カテプシンL、カテプシンS、カテプシンV/L2、カテプシンX/Z/P;システインプロテイナーゼ、例えば、クルジパイン;レグマイン;オツバイン-2; KLK、例えば、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、又はKLK14;メタロプロテイナーゼ、例えば、メプリン;ネプリライシン; PSMA; BMP-1; MMP、例えば、MMPl、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、又はMMP27、セリンプロテアーゼ、例えば、活性化プロテインC、カテプシンA、カテプシンG、キマーゼ、凝固因子プロテアーゼ(例えば、FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa)、エラスターゼ、グランザイムB、グアニジノベンゾアターゼ、HtrAl、ヒト好中球エラスターゼ、ラクトフェリン、マラプシン、NS3/4A、PACE4、プラスミン、PSA、tPA、トロンビン、トリプターゼ、uPA; II型膜貫通セリンプロテアーゼ(TTSP)、例えば、DESC1、DPP-4、FAP、ヘプシン、マトリプターゼ-2、マトリプターゼ、TMPRSS2、TMPRSS3、又はTMPRSS4;及びこれらの任意の組合せから選択されるプロテアーゼによる特異的な切断のための部位を有するものが挙げられる。一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は、Lcに対応する位置においてそのようなリンカーを含まない。

【０６４３】

リンカーの例示的な実施形態としては、柔軟性リンカー、剛性リンカー、らせん状リンカー及びこれらの組合せが挙げられる。リンカーは、例えば、Chen Xら(Adv Drug Deliv Rev. 2013;65(10):1357～1369頁)において議論されており、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【０６４４】

一部の実施形態では、ヒンジ領域又はその部分は、モジュールを二量体化ドメインに連結するために使用されてよく、本明細書においてリンカーとして考えられる。ヒンジ領域は、(ヒト若しくは動物起源の)天然抗体又は合成抗体に由来してよい。ヒンジ領域は、例えば、IgG、例えばIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4から得られうる。ヒンジ領域の例示的な実施形態は、配列番号98、配列番号121、配列番号125及び配列番号129において提供される。

【０６４５】

一部の事例では、ヒンジ領域は、天然のヒンジ領域と比較して1つ又は複数のアミノ酸置換、アミノ酸挿入及び/又はアミノ酸欠失を有してよい。変異型ヒンジ領域は、例えば、天然IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4ヒンジ領域の配列と80%～99%同一の配列(変異型ヒンジ領域)を含む。変異型ヒンジ領域の例示的且つ非限定的な実施形態としては、S228がP(EUナンバリング)で置き換えられたIgG4のヒンジ領域が挙げられる(Angal, S.ら、Mol Immunol 30、105～108頁、1993)。変異型ヒンジの他の例示的な実施形態は、配列番号118～120、122～124、126～128及び130-132において提供される。

【０６４６】

柔軟性リンカーは、通常、小さい極性アミノ酸、例えばスレオニン又はセリン及びグリシンから構成される。柔軟性リンカーの例示的且つ非限定的な実施形態としては、GSリンカー(グリシン/セリンリピート)、例えば、$(GGGS)_n(GGGGS)_m$、$(GS)_n$、$(G_4S)_n$、$(GGS)_n$、$(GGGS)_n$、$(GGGGS)_n$、$(GGSG)_n$、$(GGGSS)_n$等が挙げられ、n及びmは、整数、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はより大きいもの、例えば15、20若しくは25であってよい。

【０６４７】

柔軟性リンカーの特有の例示的且つ非限定的な実施形態としては、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103又は配列番号104に示されるアミノ酸配列を含む又はからなるものが挙げられる。

【０６４８】

配列番号104は、式$(GGGGS)_n$(nは、1～10から選択される整数である)又は代替的に式$GGGGSX_1$(X_1は存在しないか、若しくは存在する場合、配列番号104のアミノ酸残基1～5の1～9個のリピートである)により表されるものであってよいことが理解されるべきである。

【０６４９】

本開示の剛性リンカーは、通常、プロリンリッチ配列$(XP)_n$から構成され、Xは任意のアミノ酸、好ましくはAla、Lys又はGluを示し、nは整数、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10等である(Chen Xら、2013)。

【０６５０】

剛性リンカーの特有の例示的且つ非限定的な実施形態としては、配列番号105、配列番号106、配列番号107又は配列番号108に示されるアミノ酸配列を含む又はからなるものが挙げられる。

【０６５１】

配列番号108は、式$(X(PAPAP))_nKA$により表されてよく、nは1～10から選択される整数であり、Xは存在するか若しくは存在せず、存在する場合、Aであり、又は代替的に、配列番号108は、式$(XPAPAP)X_2KA$により表されてよく、Xは存在しても存在しなくてもよく、存在する場合、Aであり、且つX_2は存在しないか、若しくは存在する場合、配列番号108のアミノ酸残基1～6の1～9個のリピートであることが理解されるべきである。

【０６５２】
らせん状リンカーは剛性であるとして特徴付けられることがあるが、本明細書において別個のリンカーファミリーに分離される。らせん状リンカーの例示的な実施形態は、Chen Xら、2013において議論されており、例えば、正荷電及び負荷電のアミノ酸残基により隣接されるアラニン残基のリピートを含む。
【０６５３】
らせん状リンカーの特有の例示的且つ非限定的な実施形態としては、配列番号109、配列番号110、配列番号111及び配列番号112に示されるアミノ酸配列を含む又はからなるものが挙げられる。
【０６５４】
配列番号112は式$X(EAAAK)_nX_2$により表されてよく、nは、1～10、より好ましくは2～5から選択される整数であり、X及びX_2は独立して存在するか又は存在せず、存在する場合、好ましくはAであることが理解されるべきである。代替的に、配列番号112は、式$X(EAAAK)X_3X_2$により表されてよく、X及びX_2は独立して存在するか又は存在せず、存在する場合、好ましくはAであり; X_3は存在しないか、又は存在する場合、配列番号112のアミノ酸残基2～6の1～9個のリピートである。
【０６５５】
例示的な実施形態では、二量体化ドメインのC末端に直ちに隣接するリンカー(式II～VIIIにおいてL_{c1}として同定される)は、柔軟性リンカー、剛性リンカー又はらせん状リンカーのいずれかを含んでよい。この位置を占有するように特に選択されてよいリンカーとしては、限定なく例えば、配列番号100～109、配列番号111又は配列番号112(ここで、nは1である)に示されるアミノ酸配列を含む又はからなるリンカーが挙げられる。
【０６５６】
例示的な実施形態では、二量体化ドメインのC末端に位置する第1の2つの抗原結合性ドメインを接合するリンカー(式II～VIIIにおいてL_{c2}として同定される)は、柔軟性リンカー、剛性リンカー又はらせん状リンカーのいずれかを含んでよい。この位置を占有するように特に選択されてよいリンカーとしては、限定なく例えば、配列番号100～110又は配列番号112(ここで、nは1である)に示されるアミノ酸配列を含む又はからなるリンカーが挙げられる。
【０６５７】
本開示はまた、配列番号100～112のうちのいずれかのN末端又はC末端の1つ又は両方において1～10個のアミノ酸(並びに1及び10以内に含まれる任意の範囲又は値、例えば1～5等)の付加を有するリンカーを提供する。これらの追加のアミノ酸残基は各々独立して任意のアミノ酸残基から選択されてよい。これらの追加のアミノ酸残基は、好ましくは、切断不可能な配列を形成する。
【０６５８】
本開示はまた、配列番号100～112のうちのいずれかのN末端又はC末端の1つ又は両方における1、2、3、4又は5個のアミノ酸(並びに1及び5以内に含まれる任意の値)の欠失を有するリンカーを提供する。
【０６５９】
好適なリンカーは、例えば、約3～約50、約3～約40、約3～約30、約3～約25、約3～約20、約3～約15、約3～約10個のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を含んでよい。
【０６６０】
例示的な実施形態では、各リンカーの長さは、独立して、約5～約50個のアミノ酸残基の範囲内であってよく、これには、例えば、約5～約40個のアミノ酸残基、約10～約40個のアミノ酸残基、約20～約40個のアミノ酸残基、約20～約35個のアミノ酸残基、約25～約30個のアミノ酸残基並びにそのような範囲に含まれる及び該範囲を含む任意の部分的範囲が含まれる。
【０６６１】
一部の実施形態では、配列番号104、配列番号108又は配列番号112に示されるアミ

ノ酸配列を含むリンカーは、好ましくは1～10、より好ましくは2、3、4又は5を含めて2～5の「n」値を有してよい。

【0662】

結合剤

本開示の結合剤は、例えば、本明細書に開示される抗原結合性ドメインを包含する。

【0663】

本開示の結合剤は、例えば、本明細書に開示されるポリペプチド鎖を包含する。

【0664】

本開示の結合剤は、例えば、本明細書に開示されるポリペプチド鎖の二量体を包含する。

【0665】

本開示の結合剤は、例えば、本明細書に開示されるポリペプチド鎖の多量体を包含する。

【0666】

本開示の結合剤は、抗体及びその抗原結合性断片、抗体様分子(Fc、CH3融合物等)、タンパク質スキャフォールド及び免疫細胞調節剤等との融合物のフォーマットを有してよい。

【0667】

一部の実施形態では、結合剤は抗体又はその抗原結合性断片を含む。

【0668】

一部の実施形態では、結合剤は抗体様分子を含む。

【0669】

一部の実施形態では、結合剤は、タンパク質スキャフォールドと融合していてよい。

【0670】

一部の実施形態では、結合剤は免疫細胞調節剤を含む。

【0671】

よって、一部の実施形態では、結合剤は、抗体及びその抗原結合性断片、限定なく例えば、ラクダ科動物又はサメからの単一ドメイン抗体、IgG(ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4を含む)、ヒトIgM、ヒトIgA(ヒトIgA1及びヒトIgA2を含む)、ヒトIgE、ヒトIgDを含むヒト抗体、例えば、IgG(IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3、IgG4)、IgM、IgA、IgE及びIgDを含む、動物抗体等を含む。

【0672】

他の実施形態では、結合剤は、抗原結合性断片、限定なく例えば、Fab、Fab’、$F(ab')_2$、相補性決定領域、並びにVH、VHH、VLを含む可変領域等を含む。

【0673】

結合剤はまた、免疫細胞調節剤、例えば、二重親和性再標的化分子(DART)、キメラ抗原受容体(CAR)構築物、二特異性T細胞エンゲージャー構築物(BiTE)、二特異性キラー細胞エンゲージャー(BiKE)、scFv又はVHHを含有する三特異性キラー細胞エンゲージャー(TriKE)等を含む。

【0674】

結合剤はまた、アンキリンリピートタンパク質、スタフィロコッカス(Staphylococcus)プロテイン-AのZ-ドメイン、III型フィブロネクチン及びノッチン等を含む、タンパク質スキャフォールドとの融合物を包含する。結合剤の例示的な実施形態は、単一特異性、二特異性(対称的若しくは非対称的)、三特異性、又は多特異性抗体の他に、一価、二価、三価又は多価抗体、単鎖FV(scFV)並びに誘導体、例えばダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、タンデムジ-scFv、タンデムトリ-scFv、scFV-Fc、ミニボディ(scFV-CH3)、タンデムダイアボディ、ジダイアボディ及びバイボディ(bibody)等、VH又はVHH並びに誘導体、例えばタンデム二特異性又は多特異性VHH、二価VHH-Fc融合物、VHH-ヒンジ-CH2-CH3融合物、二価CH3融合物、VHHペンタボディ及びデカボディ等を含む。

【０６７５】
一部の実施形態では、本開示の結合剤は、２０２０年１２月１８日に出願されたＰＣＴ/ＣＡ２０２０/０５１７５３において式Ｉａ、式Ｉｂ、式Ｉｃ、式ＩＩ、式ＩＩＩ、式ＩＶ、式Ｖ、式ＶＩ、式ＶＩＩ若しくは式ＶＩＩＩ等として、又は本明細書において式Ｉ、式ＩＩ、式ＩＩＩ、式ＩＩＩａ及び式ＩＩＩｂ、式ＩＶ、式Ｖ、式ＶＩ、式ＶＩＩ若しくは式ＶＩＩＩとして開示されるようなフォーマットを有してよい。
【０６７６】
本開示の結合剤は、同じ構成(同じ若しくは異なるアミノ酸配列を有する)を有するか又は異なる構成を有する2つのポリペプチド鎖のアセンブリーにより形成されてよく、同じ又は異なる構成は、本明細書に開示される式Ｉ、式ＩＩ、式ＩＩＩ、式ＩＩＩａ及び式ＩＩＩｂ、式ＩＶ、式Ｖ、式ＶＩ、式ＶＩＩ又は式ＶＩＩＩに記載の構成を含む。
【０６７７】
本開示の結合剤は、例えば、Ｎ末端からＣ末端への様式において式Ｉ:

$$X\text{-}[(Ab_a)\text{-}(L_b)]_m\text{-}(DD)\text{-}[(L_c)\text{-}(Ab_d)]_n\text{-}Y$$

のアミノ酸配列を独立して含む1つ又は複数のポリペプチド鎖を含んでよく、
ｍは、０、１、２又は2より大きい整数であり;
ｎは、０、１、２又は2より大きい整数であり;
ｍ及びｎは同時に0ではなく;
Ab_a、Ab_dは各々、抗原結合性ドメインを表し、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ＡＢＤ１)、抗原結合性ドメイン2(ＡＢＤ２)又は抗原結合性ドメイン3(ＡＢＤ３)であり;
Ｘ又はＹは独立して存在するか又は存在せず、アミノ酸配列を含み;
L_b、L_cは各々独立して1つ又は複数のリンカーを含み;且つ
ＤＤは二量体化ドメインを表す。
【０６７８】
一部の実施形態では、L_bは存在しなくてよい。一部の実施形態では、L_{b2}及び/又はL_{b3}は存在しなくてよい。
【０６７９】
一部の実施形態では、L_cは存在しなくてよい。一部の実施形態では、L_{c1}、L_{c2}、及び/又はL_{c3}は存在しなくてよい。
【０６８０】
一部の実施形態では、L_b及びL_cの両方は存在しなくてよい。
【０６８１】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、1個より多くの抗原結合性ドメインを含む。
【０６８２】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、2個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む。
【０６８３】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、3個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む。
【０６８４】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、4個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む。
【０６８５】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、5個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む。
【０６８６】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は、6個又はそれより多くの抗原結合性ドメインを含む。
【０６８７】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖は1～12個の抗原結合性ドメインを含む。

【０６８８】

一部の実施形態では、結合剤は、1～12個、例えば1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、2～3、2～4、2～5、2～6、2～7、2～8、2～9、2～10、2～11、2～12、3～4、3～5、3～6、3～7、3～8、3～9、3～10、3～11、3～12、4～5、4～6、4～7、4～8、4～9、4～10、4～11、4～12、5～6、5～7、5～8、5～9、5～10、5～11、5～12、6～7、6～8、6～9、6～10、6～11、6～12、7～8、7～9、7～10、7～11、7～12、8～9、8～10、8～11、8～12、9～10、9～11、9～12、10～11、10～12、又は11～12個の抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０６８９】

一部の実施形態では、結合剤は1個のポリペプチド鎖を含む。

【０６９０】

一部の実施形態では、結合剤は2個のポリペプチド鎖を含む。

【０６９１】

一部の実施形態では、結合剤は3個のポリペプチド鎖を含む。

【０６９２】

一部の実施形態では、結合剤は4個のポリペプチド鎖を含む。

【０６９３】

一部の実施形態では、結合剤は5個のポリペプチド鎖を含む。

【０６９４】

一部の実施形態では、結合剤は6個のポリペプチド鎖を含む。

【０６９５】

一部の実施形態では、結合剤は7個のポリペプチド鎖を含む。

【０６９６】

一部の実施形態では、結合剤は8個のポリペプチド鎖を含む。

【０６９７】

一部の実施形態では、結合剤は9個のポリペプチド鎖を含む。

【０６９８】

一部の実施形態では、結合剤は10個のポリペプチド鎖を含む。

【０６９９】

一部の実施形態では、結合剤は10個より多くのポリペプチド鎖を含む。

【０７００】

一部の実施形態では、結合剤は、式II: X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y(式II)を有する少なくとも1つのポリペプチド鎖を含む。

【０７０１】

一部の実施形態では、結合剤は、式III: X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式III)を有する少なくとも1つのポリペプチド鎖を含む。

【０７０２】

一部の実施形態では、結合剤は、式IV: X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-Y(式IV)を有する少なくとも1つのポリペプチド鎖を含む。

【０７０３】

一部の実施形態では、結合剤は、式V: X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式V)を有する少なくとも1つのポリペプチド鎖を含む。

【０７０４】

一部の実施形態では、結合剤は、式VI: X-(Ab_{a1})-(L_{b2})-(Ab_{a2})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y(式VI)を有する少なくとも1つのポリペプチド鎖を含む。

【０７０５】

一部の実施形態では、結合剤は、式VII: X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L

$_{b1}$)-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式VII)を有する少なくとも1つのポリペプチド鎖を含む。

【０７０６】

一部の実施形態では、結合剤は、式VIII: X-(Ab_{a1})-(L_{b3})-(Ab_{a2})-(L_{b2})-(Ab_{a3})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-(L_{c3})-(Ab_{d3})-Y(式VIII)を有する少なくとも1つのポリペプチド鎖を含む。

【０７０７】

一部の実施形態では、結合剤は、N末端からC末端への様式において式III

X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式III)

のアミノ酸配列を各々独立して含む1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み;

Ab_{a1}、Ab_{d1}又はAb_{d2}のうちの1つは抗原結合性ドメイン1(ABD1)を表す。

【０７０８】

一部の実施形態では、結合剤は、N末端からC末端への様式において式III

X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式III)

のアミノ酸配列を各々独立して含む1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み;

Ab_{a1}、Ab_{d1}又はAb_{d2}のうちの1つは抗原結合性ドメイン2(ABD2)を表す。

【０７０９】

一部の実施形態では、結合剤は、N末端からC末端への様式において式III

X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式III)

のアミノ酸配列を各々独立して含む1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み;

Ab_{a1}、Ab_{d1}又はAb_{d2}のうちの1つは抗原結合性ドメイン3(ABD3)を表す。

【０７１０】

一部の実施形態では、結合剤は、N末端からC末端への様式において式III

X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式III)

のアミノ酸配列を各々独立して含む1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み;

Ab_{a1}、Ab_{d1}又はAb_{d2}のうちの1つは抗原結合性ドメイン1(ABD1)を表し、Ab_{a1}、Ab_{d1}又はAb_{d2}のうちの1つは抗原結合性ドメイン2(ABD2)を表し、Ab_{a1}、Ab_{d1}又はAb_{d2}のうちの1つは抗原結合性ドメイン3(ABD3)を表す。

【０７１１】

一部の実施形態では、結合剤は、N末端からC末端への様式において式III

X-(Ab_{a1})-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(Ab_{d1})-(L_{c2})-(Ab_{d2})-Y(式III)

のアミノ酸配列を各々独立して含む1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み;

Ab_{a1}は抗原結合性ドメイン1(ABD1)を表し、Ab_{d1}は抗原結合性ドメイン2(ABD2)を表し、Ab_{d2}は抗原結合性ドメイン3(ABD3)を表す。

【０７１２】

一部の実施形態では、結合剤は、N末端からC末端への様式において式IIIのアミノ酸配列を各々独立して含む1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、Ab_{a1}は、DR2に結合する抗原結合性ドメインであり、Ab_{d1}は、PD-1に結合する抗原結合性ドメインであり、Ab_{d2}は、CD47に結合する抗原結合性ドメインである。

【０７１３】

一部の実施形態では、結合剤は、N末端からC末端への様式において式IIIのアミノ酸配列を各々独立して含む1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、Ab_{a1}は、DR2に結合する抗原結合性ドメインであり、Ab_{d1}は、CD47に結合する抗原結合性ドメインであり、Ab_{d2}は、PD-1に結合する抗原結合性ドメインである。

【０７１４】

一部の実施形態では、結合剤は、N末端からC末端への様式において式IIIa:

X-(ABD1)-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(ABD2)-(L_{c2})-(ABD3)-Y(式IIIa)

のアミノ酸配列を各々独立して含む1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む。

【０７１５】

一部の実施形態では、結合剤は、N末端からC末端への様式において式IIIb:

X-(ABD1)-(L_{b1})-(DD)-(L_{c1})-(ABD3)-(L_{c2})-(ABD2)-Y(式IIIb)
のアミノ酸配列を各々独立して含む1つ又は複数のポリペプチド鎖を含む。
【０７１６】
一部の実施形態では、結合剤は、2つの同一のポリペプチド鎖を含む。
【０７１７】
一部の実施形態では、結合剤の両方のポリペプチド鎖は、式IIに記載の構成(同じ又は異なるアミノ酸配列を有する)を有してよい。
【０７１８】
一部の実施形態では、結合剤の両方のポリペプチド鎖は、式IIIに記載の構成(同じ又は異なるアミノ酸配列を有する)を有してよい。
【０７１９】
一部の実施形態では、結合剤の両方のポリペプチド鎖は、式IIIaに記載の構成(同じ又は異なるアミノ酸配列を有する)を有してよい。
【０７２０】
一部の実施形態では、結合剤の両方のポリペプチド鎖は、式IIIbに記載の構成(同じ又は異なるアミノ酸配列を有する)を有してよい。
【０７２１】
一部の実施形態では、1つのポリペプチド鎖は式IIIaに記載の構成を有してよく、1つのポリペプチド鎖は式IIIbに記載の構成を有してよい(抗原結合性ドメインは同じ又は異なるアミノ酸配列を有する)。
【０７２２】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖のうちの1つは、式IIに示される構成を有してよく、他方は、式IIIに示される構成を有してよい。
【０７２３】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖のうちの1つは、式IIに示される構成を有してよく、他方は、式IVに示される構成を有する。
【０７２４】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖のうちの1つは、式IIIに示される構成を有してよく、他方は、式IVに示される構成を有する。
【０７２５】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖のうちの1つは、式IVに示される構成を有してよく、他方は、式IVに示される構成を有する。
【０７２６】
一部の実施形態では、本開示の結合剤は単一特異性又は多特異性である。
【０７２７】
単一特異性結合剤は、所与の抗原の単一のエピトープに特異的な結合剤を包含する。
【０７２８】
単一特異性結合剤の例示的な実施形態は、1つの抗原結合性ドメインを含む結合剤を含む。単一特異性結合剤の別の例示的な実施形態は、1つより多くの抗原結合性ドメインを含む結合剤を含むが、抗原結合性ドメインは、同一のCDR及びフレームワーク領域を有する。結合剤鎖の更に別の例示的な実施形態は、1つより多くの抗原結合性ドメインを含む結合剤を含むが、抗原結合性ドメインは、同一のCDR及び異なるフレームワーク領域を有する。単一特異性結合剤の更なる例示的な実施形態は、同じ抗原又はエピトープに結合する能力に影響することなくそれらのCDRのうちの1つ又は複数のアミノ酸配列において異なる(例えば、1つ又は複数のCDRにおける保存的置換)抗原結合性ドメインを含む結合剤を含む。
【０７２９】
多特異性結合剤は、(同じ抗原若しくは異なる抗原の)1つより多くのエピトープ又は1つより多くの抗原に特異的な結合剤を包含する。例えば、多特異性ポリペプチド鎖又は結合剤はそのため、1つより多くの抗原結合性ドメインを有してよく、そのうちの少なくと

も2つは、異なる抗原又はエピトープに結合する。

【０７３０】

本開示の結合剤はそのため、二特異性、三特異性、四特異性、五特異性、六特異性等であってよい。一部の実施形態では、各々の抗原結合性ドメインは、所与の抗原に特異的であってよい。一部の実施形態では、所与の結合剤の2つ又はそれより多くの抗原結合性ドメインは、同じ又は異なる抗原に特異的であってよい。一部の実施形態では、所与の結合剤の3つ又はそれより多くの抗原結合性ドメインは、同じ又は異なる抗原に特異的であってよい。一部の実施形態では、所与の結合剤の4つ又はそれより多くの抗原結合性ドメインは、同じ又は異なる抗原に特異的であってよい。一部の実施形態では、所与の結合剤の5つ又はそれより多くの抗原結合性ドメインは、同じ又は異なる抗原に特異的であってよい。一部の実施形態では、所与の結合剤の6つ又はそれより多くの抗原結合性ドメインは、同じ又は異なる抗原に特異的であってよい。特異性は、所与の結合剤中に存在する抗原結合性ドメインの数に依存してよい。

【０７３１】

多特異性結合剤の例示的な非限定的な実施形態は、多特異性ポリペプチド鎖から構成されるものを含む。多特異性結合剤の他の例示的な非限定的な実施形態は、異なる特異性の2つの抗原結合性ドメインを有するものを含む。多特異性結合剤の更に他の例示的な非限定的な実施形態は、2つの異なる抗原、タンパク質又は同じ抗原若しくはタンパク質上の2つの異なるエピトープに結合する2つより多くの抗原結合性ドメインを有するものを含む。

【０７３２】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は一価又は多価である。

【０７３３】

多価結合剤の例示的な非限定的な実施形態は、多価ポリペプチド鎖から構成される結合剤を含む。多価結合剤の他の非限定的な例示的な実施形態は、1つより多くの一価ポリペプチド鎖から構成される結合剤を含む。

【０７３４】

本開示によれば、二特異性結合剤は、それが含有する抗原結合性ドメインの数に依存して二価又は多価であってよい。二特異性結合剤の例示的な非限定的な実施形態は、二量体を形成する2つの同一の二特異性ポリペプチド鎖を含むものを含む。

【０７３５】

単一特異性結合剤の例示的な実施形態

本明細書に指し示されるように、本開示の結合剤は単一特異性であってよい。

【０７３６】

単一特異性結合剤の例示的且つ非限定的な例示的な実施形態は、本明細書において提供されるものを含む。

【０７３７】

例えば、結合剤は、ただ1つの抗原結合性ドメインを含んでよい。代替的に、結合剤は、1つより多くの同一の抗原結合性ドメインを含んでよい。

【０７３８】

単一特異性結合剤の例示的な実施形態は、本明細書に開示されるＡＢＤ１、ＡＢＤ２、ＡＢＤ３又は重鎖を含む本明細書に開示される抗原結合性ドメインを含む。

【０７３９】

例示的な実施形態では、単一特異性結合剤は、本明細書に開示される抗原結合性ドメイン及び二量体化ドメインを含んでよい。

【０７４０】

二量体化ドメインの例示的な実施形態は、本明細書の全体を通じて提供され、限定なくＣＨ３ドメイン(天然ＣＨ３ドメイン及び天然ヒトＣＨ３ドメイン、変異型ＣＨ３ドメインを含む)を含み、且つまたＣＨ２ドメイン(天然ＣＨ２ドメイン又は変異型ＣＨ２ドメイン)を含んでよい。

【０７４１】
一部の実施形態では、二量体化ドメインは抗体又はその部分のＦｃ領域である。
【０７４２】
一部の実施形態では、二量体化ドメインはまた、抗体又はその部分のヒンジ領域を含んでよい。一部の実施形態では、ヒンジ領域又はその部分はヒトヒンジ領域又はその部分である。
【０７４３】
一部の実施形態では、結合剤はＡＢＤ１及び二量体化ドメインを含んでよい。
【０７４４】
一部の実施形態では、結合剤はＡＢＤ２及び二量体化ドメインを含んでよい。
【０７４５】
一部の実施形態では、結合剤はＡＢＤ３及び二量体化ドメインを含んでよい。
【０７４６】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号７に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖及び二量体化ドメインを含んでよい。
【０７４７】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号１４に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖及び二量体化ドメインを含んでよい。
【０７４８】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号２１に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖及び二量体化ドメインを含んでよい。
【０７４９】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号２８に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖及び二量体化ドメインを含んでよい。
【０７５０】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号３５に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖及び二量体化ドメインを含んでよい。
【０７５１】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号４２に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖及び二量体化ドメインを含んでよい。
【０７５２】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号４９に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖及び二量体化ドメインを含んでよい。
【０７５３】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号５６に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖及び二量体化ドメインを含んでよい。
【０７５４】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号６３に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％同一のアミノ酸配列を有する重鎖及び二量体化ドメインを含んでよい。
【０７５５】
一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号７０に示されるアミノ酸配

列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を有する重鎖及び二量体化ドメインを含んでよい。

【0756】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号71に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を含んでよい。

【0757】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号72に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を含んでよい。

【0758】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号73に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を含んでよい。

【0759】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号74に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を含んでよい。

【0760】

一部の例示的な実施形態では、本開示の結合剤は、配列番号75に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%同一のアミノ酸配列を含んでよい。

【0761】

単一特異性結合剤の他の例示的な実施形態は本明細書において提供される。

【0762】

多特異性結合剤の例示的な実施形態

本明細書に指し示されるように、本開示の結合剤は多特異性であってよい。

【0763】

多特異性結合剤の例示的且つ非限定的な例示的な実施形態は、本明細書において提供されるものを含む。

【0764】

例えば、一部の実施形態では、結合剤は1つより多くの抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、本明細書に記載されるような抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、且つ抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、免疫チェックポイントタンパク質に結合する能力を有する抗原結合性ドメインである。

【0765】

他の実施形態では、結合剤は1つより多くの抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、本明細書に記載されるような抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、免疫チェックポイントタンパク質に結合する能力を有する抗原結合性ドメインであり、且つ抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、免疫細胞の表面に発現されるタンパク質に結合する能力を有する抗原結合性ドメインである。

【0766】

更に他の実施形態では、結合剤は1つより多くの抗原結合性ドメインを含んでよく、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、本明細書に記載されるような抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、免疫チェックポイントタンパク質に結合する能力を有する抗原結合性ドメインであり、且つ抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、腫瘍細胞の表面に発現されるタンパク質に結合する能力を有する抗原結合性ドメインである。

【0767】

一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン1(ABD1)及び少なくとも1つの抗原結合性ドメイン2(ABD2)を含む。

【０７６８】

一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン1(ABD1)及び少なくとも1つの抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含む。

【０７６９】

一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン2(ABD2)及び少なくとも1つの抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含む。

【０７７０】

一部の実施形態では、結合剤は、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン1(ABD1)、少なくとも1つの抗原結合性ドメイン2(ABD2)及び少なくとも1つの抗原結合性ドメイン3(ABD3)を含む。

【０７７１】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号7に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０７７２】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号14に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０７７３】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号21に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０７７４】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号28に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０７７５】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号35に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０７７６】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号42

に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０７７７】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号49に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０７７８】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数の抗原結合性ドメインを含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン1(ABD1)であり、配列番号56に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン2(ABD2)であり、配列番号63に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含み、且つ抗原結合性ドメインのうちの少なくとも1つは、抗原結合性ドメイン3(ABD3)であり、配列番号70に示されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

【０７７９】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、配列番号77に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号77に示されるアミノ酸配列を有する1つのポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、配列番号77に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、配列番号77に示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。

【０７８０】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、配列番号78に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号78に示されるアミノ酸配列を有する1つのポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、配列番号78に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、配列番号78に示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。

【０７８１】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、配列番号79に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号79に示されるアミノ酸配列を有する1つのポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、配列番号79に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、配列番号79に示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。

【０７８２】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、配列番号80に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号80に示されるアミノ酸配列を有する1つのポリペプチ

ド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、配列番号80に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、配列番号80に示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。

【0783】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、配列番号81に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号81に示されるアミノ酸配列を有する1つのポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、配列番号81に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、配列番号81に示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。

【0784】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、配列番号82に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号82に示されるアミノ酸配列を有する1つのポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、配列番号82に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、配列番号82に示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。

【0785】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、配列番号83に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号83に示されるアミノ酸配列を有する1つのポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、配列番号83に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、配列番号83に示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。

【0786】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、配列番号85に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号85に示されるアミノ酸配列を有する1つのポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、配列番号85に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、配列番号85に示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。

【0787】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、配列番号86に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号86に示されるアミノ酸配列を有する1つのポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、配列番号86に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、配列番号86に示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。

【0788】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、配列番号87に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号87に示されるアミノ酸配列を有する1つのポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、配列番号87に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、配列番号87に示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。

【0789】

一部の実施形態では、結合剤は1つ又は複数のポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖のうちの少なくとも1つは、配列番号88に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号88に示されるアミノ酸配列を有する1つのポリペプチド鎖を含む。他の実施形態では、結合剤は、配列番号88に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%又は100%同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。更に他の実施形態では、結合剤は、配列番号88に示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチド鎖を含む。

【0790】

多特異性結合剤の他の例示的な実施形態は、Table 7(表8)におけるものを含む本明細書において提供される。

【0791】

一部の実施形態では、本開示の結合剤は、DR2に結合する抗原結合性ドメイン、PD1に結合する抗原結合性ドメイン及びCD47に結合する抗原結合性ドメインを含む。一部の実施形態では、本開示の結合剤は、T細胞をDR2発現腫瘍細胞に近接させる能力を有してよく、T細胞機能を回復させる能力を有してよく、且つ/又はSIRPα/CD47相互作用の遮断を介してマクロファージ機能を増強する能力を有してよい。本開示の一部の実施形態では、結合剤は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)を介してその抗腫瘍活性を呈してよい。

【0792】

バリアント

本明細書に開示される配列のバリアントもまた本開示に包含される。

【0793】

本開示に包含されるバリアントとしては、1つ若しくは複数の位置における1つ若しくは複数のアミノ酸残基の挿入、1つ若しくは複数の位置における1つ若しくは複数のアミノ酸残基の欠失又は1つ若しくは複数の位置における1つ若しくは複数のアミノ酸残基の置換(保存的若しくは非保存的置換)を含んでよいものが挙げられる。

【0794】

例えば、天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて群に分けられる。保存的置換は、下記に列記される群(群1～6)の1つからのアミノ酸を同じ群の別のアミノ酸に交換することにより為されてよい。非保存的置換は、これらの群のうちの1つのメンバーを別の群のメンバーに交換することを伴う。

(群1)疎水性:ノルロイシン、メチオニン(Met)、アラニン(Ala)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)

(群2)中性親水性:システイン(Cys)、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)、アスパラギン(Asn)、グルタミン(Gln)、

(群3)酸性:アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu)

(群4)塩基性:ヒスチジン(His)、リジン(Lys)、アルギニン(Arg)

(群5)鎖配向に影響を及ぼす残基:グリシン(Gly)、プロリン(Pro);及び

(群6)芳香族:トリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)、フェニルアラニン(Phe)。

【0795】

保存的置換の他の例示的な実施形態は、「好ましい置換」の見出しの下に表2(表2)において示される。そのような置換が望ましくない特性を結果としてもたらす場合、表2(表2)において「例示的な置換」と命名される、又はアミノ酸クラスに関して更に以下に記載されるようなより実質的な変更が導入され、生成物がスクリーニングされてよい。

【０７９６】

ある特定のアミノ酸は、他のアミノ酸と比較してより低く正に荷電しており、中性であり、負に荷電しており、又は低減された電荷を有することを当業者は認識する。アミノ酸は、アミノ酸の等電点により指し示されるように正味電荷に基づいてカテゴライズされうる。等電点は、アミノ酸分子の平均正味電荷が0となるpHである。pH〉pIである場合、アミノ酸は正味の負電荷を有し、pH〈pIである場合、アミノ酸は正味の正電荷を有する。一部の実施形態では、抗体について測定されるpI値は、約3～9(例えば3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、及び9)並びに間にある任意の値である。一部の実施形態では、抗体について測定されるpI値は、約4～7の間(例えば4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0)、及び間にある任意の値である。アミノ酸の例示的な等電点は下記の表2(表2)に示される。一般に、正の電気的に荷電した側鎖を有するアミノ酸としては、例えば、アルギニン(R)、ヒスチジン(H)、及びリジン(K)が挙げられる。負の電気的に荷電した側鎖を有するアミノ酸としては、例えば、アスパラギン酸(D)及びグルタミン酸(E)が挙げられる。極性の特性を有するアミノ酸としては、例えば、セリン(S)、スレオニン(T)、アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、及びシステイン(C)、チロシン(Y)及びトリプトファン(W)が挙げられる。非極性アミノ酸としては、例えば、アラニン(A)、バリン(V)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、フェニルアラニン(F)、グリシン(G)及びプロリン(P)が挙げられる。

【０７９７】

一部の実施形態では、抗体の等電点は、アミノ酸置換を介して改変される。例えば米国特許出願公開第20110076275号明細書を参照。一部の実施形態では、抗体を構成するポリペプチドの等電点の改変は、抗体の半減期における変化を結果としてもたらす。

【０７９８】

【表２】

Table 2. 例示的なアミノ酸置換

元々の残基	例示的な置換	保存的置換	pI（等電点）
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val	6.0
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys	10.76
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg, Asp	Gln	5.41
Asp (D)	Glu, Asn	Glu	2.77
Cys (C)	Ser, Ala	Ser	5.07
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn	5.65
Glu (E)	Asp, Gln	Asp	3.22
Gly (G)	Ala	Ala	5.97
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg,	Arg	7.59
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu	6.02
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile	5.98
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg	9.74
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu	5.74
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr	5.48
Pro (P)	Ala	Ala	6.30
Ser (S)	Thr	Thr	5.58
Thr (T)	Ser	Ser	5.60
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr	5.89
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe	5.66
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu	5.96

【０７９９】

一般に、可変鎖の間の類似性及び同一性の程度は、本明細書においてBlast2配列プログラム(Tatiana A. Tatusova、Thomas L. Madden (1999)、「Blast2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences」、FEMS Microbiol Lett. 174:247～250頁)を使用し、デフォルトの設定、即ち、blastpプログラム、BLOSUM62マトリックス(オープンギャップ11及びエクステンションギャップペナルティ1;gapxドロップオフ50、期待値10.0、ワードサイズ3)及びアクティベートされたフィルターを使用して決定される。

【０８００】

同一性パーセントは、したがって、元々のペプチドとの比較において同一の、同じ又は類似した位置を占有しうるアミノ酸の指標となる。

【０８０１】

類似性パーセントは、同一のアミノ酸及び同じ又は類似した位置における元々のペプチ

ドとの比較において保存的アミノ酸置換で置き換えられたアミノ酸の指標となる。
【０８０２】
本開示のバリアントは、したがって、元々の配列若しくは参照配列又は元々の配列の部分と少なくとも70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一の配列を含んでよい。
【０８０３】
一部の実施形態では、所与のアミノ酸配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、99%同一であるか、又は100%未満で同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチド鎖は、相補性決定領域の外側に一般に位置するアミノ酸置換、付加又は欠失を有してよい。
【０８０４】
一部の実施形態では、バリアントは、本明細書に開示される配列と少なくとも80%の配列同一性を有してよい。他の実施形態では、バリアントは、本明細書に開示される配列と少なくとも85%の配列同一性を有してよい。更なる実施形態では、バリアントは、本明細書に開示される配列と少なくとも90%の配列同一性を有してよい。更なる実施形態では、バリアントは、本明細書に開示される配列と少なくとも95%の配列同一性を有してよい。他の実施形態では、バリアントは、本明細書に開示される配列と少なくとも99%の配列同一性を有してよい。
【０８０５】
バリアントの例示的な実施形態は、天然抗体に由来するが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれより多くのアミノ酸差異(アミノ酸置換、挿入又は欠失を含む)を含むヒンジ、Fc、CH3、CH2/CH3領域を含むポリペプチド鎖又は結合剤を含む。
【０８０６】
一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は、そのため、天然抗体のヒンジ領域に対して少なくとも80%同一の、少なくとも85%同一の、少なくとも90%同一の、少なくとも95%同一の、少なくとも99%同一の変異型ヒンジ領域を含んでよい。
【０８０７】
一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は、そのため、天然抗体のFcに対して少なくとも80%同一の変異型Fc部分を含んでよい。
【０８０８】
一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は、そのため、天然抗体のCH2ドメインに対して少なくとも80%同一の、少なくとも85%同一の、少なくとも90%同一の、少なくとも95%同一の、少なくとも99%同一の変異型CH2ドメインを含んでよい。
【０８０９】
一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は、そのため、天然抗体のCH3ドメインに対して少なくとも80%同一の、少なくとも85%同一の、少なくとも90%同一の、少なくとも95%同一の、少なくとも99%同一の変異型CH3ドメインを含んでよい。
【０８１０】
一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖は、そのため、天然抗体のCH2/CH3ドメインに対して少なくとも80%同一の、少なくとも85%同一の、少なくとも90%同一の、少なくとも95%同一の、少なくとも99%同一の変異型CH2/CH3ドメインを含んでよい。
【０８１１】
核酸、ベクター、キット、細胞及びポリペプチド鎖を作製する方法
本開示の核酸分子は一本鎖又は二本鎖であってよい。本明細書に開示される核酸分子は、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾デオキシリボヌクレオチド又は修飾リボヌクレオチドを含んでよい。本開示の核酸分子は例えばDNAを含んでよい。
【０８１２】
1つ又は複数のモジュール又はポリペプチド鎖全体をコードするDNAセグメント及びベ

クターが特に提供される。

【０８１３】

ＤＮＡセグメント及び/又はベクターは、別々のバイアル中で提供され、キットとして販売されてよい。

【０８１４】

モジュールの方向付けられた集合を可能とする配列を含むＤＮＡセグメントのセット及び該ＤＮＡセグメント又はポリペプチド鎖全体を組み込んだクローニングベクターが特に想定される。

【０８１５】

ＤＮＡセグメント及びベクターは、本明細書に開示されるポリペプチド鎖又は結合剤を発現する能力を有するＤＮＡ構築物を集合させるためのキットの部分として提供されてよい。

【０８１６】

キットは、本明細書に開示されるように(ＥＵナンバリングシステムにしたがって)３５６位、３５７位、３７０位、３９９位及び/又は４３９位におけるアミノ酸置換を有する変異型二量体化ドメインを含むポリペプチド鎖をユーザーが生成することを可能とする１つ又は複数のＤＮＡセグメント又はベクターを少なくとも含んでよい。

【０８１７】

遺伝コードの本来的な縮重に起因して、同じ、実質的に同じ又は機能的に同等のアミノ酸配列をコードするＤＮＡ配列が製造され、使用されうる。本開示のヌクレオチド配列は、遺伝子産物のクローニング、プロセシング、及び/又は発現の改変が挙げられるがこれらに限定されない様々な目的のためにヌクレオチド配列を変更するために当該技術分野において一般に公知の方法を使用して操作されてよい。遺伝子断片及び合成オリゴヌクレオチドのランダム断片化及びＰＣＲリアセンブリーによるＤＮＡシャッフリングを使用してヌクレオチド配列を操作することができる。例えば、オリゴヌクレオチド媒介性部位特異的変異誘発を使用して、新たな制限部位を作出する、グリコシル化パターンを変更する、コドン選好性を変化させる、及びスプライスバリアントを産生する等の変異を導入することができる。本明細書に記載のポリペプチド鎖をコードするコドン最適化された核酸は本開示に包含される。

【０８１８】

本明細書に開示されるポリペプチド鎖及び結合剤は、組換えＤＮＡ法又はin vitro転写/翻訳によるものを含めて、当業者にとって慣用の様々な方法により作製されてよい。

【０８１９】

一般に、本明細書に記載のポリペプチド鎖は、発現ベクター、即ち、特定の宿主中での挿入されたコーディング配列の転写及び翻訳制御のためのエレメントを含有するベクターに挿入された核酸配列から発現される。これらのエレメントは、調節配列、例えばエンハンサー、構成的及び誘導性プロモーター、並びに5'及び3'非翻訳領域を含んでよい。

【０８２０】

当業者に公知の様々な発現ベクター/宿主細胞システムを使用して、本明細書に記載のポリペプチド鎖を発現させることができる。結合剤が別個のポリペプチド鎖から構成される場合、そのようなポリペプチド鎖の各々は、別々の発現ベクター又は独特の発現ベクターにより提供されてよい。本開示によれば、結合剤の２つの鎖は、単一のベクター又は別々のベクター(ベクターセット)によりコードされてよい。

【０８２１】

ポリペプチドは多くの場合に哺乳動物細胞中で発現される。組換えタンパク質の長期製造のために、安定発現システムが使用されてよく、該システムでは、ＤＮＡセグメントが、選択マーカーの使用により宿主細胞ゲノムに組み込まれ、又はエピソーム形態において維持される。宿主細胞種は、挿入された配列の発現をモジュレートする能力又は発現されたポリペプチドを所望の様式においてプロセシングする能力について選択されてよい。特有の細胞機構及び翻訳後活性のための特徴的な機構を有する異なる宿主細胞(例えば、ＣＨ

O、HeLa、MDCK、HEK293、及びW138)がAmerican Type Culture Collection(ATCC)から市販されており、発現されたポリペプチドの正確な修飾及びプロセシングを確実にするように選択されてよい。

【０８２２】

他の種類の発現システムが使用されうる。これらとしては、例えば、微生物、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド、若しくはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌;酵母発現ベクターを用いて形質転換された酵母;バキュロウイルスベクターを感染させた昆虫細胞システム;ウイルス若しくは細菌発現ベクターを用いて形質転換された植物細胞システム;又は動物細胞システムが挙げられる。

【０８２３】

本開示は、したがって、本明細書に記載のポリペプチド鎖の少なくとも1つをコードするベクター、核酸、ベクターのセット又は核酸のセットを用いて形質転換又はトランスフェクトされた単離された細胞に関する。本開示は、したがってまた、本明細書に開示されるポリペプチド鎖又は結合剤を発現する能力を有する単離された細胞に関する。

【０８２４】

本開示はまた、結合剤を作製する方法に関する。方法は、本明細書に開示されるポリペプチド鎖の1つ又は複数をコードするベクター又はベクターのセットを細胞(例えば、哺乳動物細胞)に提供すること及び発現させることを含んでよい。

【０８２５】

方法はまた、細胞又は細胞デブリから結合剤を精製する工程を含んでよい。

【０８２６】

一部の実施形態では、生産方法は、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも99%の(二量体の)純度レベルに達することを可能とする。

【０８２７】

一部の実施形態では、結合剤の純度レベルは80.0%～99.9%である。

【０８２８】

一部の実施形態では、結合剤の純度レベルは95.0%～99.9%である。

【０８２９】

一部の実施形態では、結合剤の純度レベルは少なくとも90.0+/-5.0%である。

【０８３０】

一部の実施形態では、結合剤の純度レベルは少なくとも95.0+/-5.0%である。

【０８３１】

一部の実施形態では、結合剤の純度レベルは95%に等しいか又は95%より高い。

【０８３２】

一部の実施形態では、結合剤の純度レベルは97.0+/-1.0%である。

【０８３３】

一部の実施形態では、結合剤の純度レベルは97%に等しいか又は97%より高い。

【０８３４】

一部の実施形態では、結合剤の純度レベルは99.0+/-1.0%である。

【０８３５】

一部の実施形態では、結合剤の純度レベルは99%に等しいか又は99%より高い。

【０８３６】

一部の実施形態では、細胞により産生される結合剤の力価は0.1g/L又はそれより高くてよい。一部の事例では、細胞により産生される結合剤の力価は0.5g/L又はそれより高くてよい。一部の事例では、細胞により産生される結合剤の力価は1g/L又はそれより高くてよい。一部の事例では、細胞により産生される結合剤の力価は2g/L又はそれより高くてよい。一部の事例では、細胞により産生される結合剤の力価は3g/L又はそれより高くてよい。一部の事例では、細胞により産生される結合剤の力価は4g/L又はそれより高くてよい。一部の事例では、細胞により産生される結合剤の力価は5g/L又はそれより高くてよい。一部の事例では、細胞により産生される結合剤の力価は6g/L又はそれより高

くてよい。通常、ホモ二量体は、本明細書に開示されるポリペプチド鎖の1つをコードする核酸配列を含むベクターを用いる細胞のトランスフェクションにより作製される。収集された上清は、ホモ二量体又は単量体及び/若しくはホモ二量体の混合物を含有しうる。

【０８３７】

一般に、ヘテロ二量体は、2つの別個のポリペプチド鎖をコードする核酸配列を各々含む少なくとも2種類のベクター(ベクターセット)を用いる細胞の共トランスフェクションにより作製される。鎖Aの鎖Bに対する適切な比は、一般に、各個々のプラスミドから得られるタンパク質発現のレベルに依存し、例えば約1:10～約10:1で変動しうる。約1:1のＤＮＡ比が、本明細書に開示される構築物の一部のために特に好ましい。

【０８３８】

ヘテロ二量体はまた、両方のポリペプチド鎖をコードする単一のベクターを用いて細胞へのトランスフェクトを行うことにより作製されうる。収集された上清は、ヘテロ二量体又は単量体、ヘテロ二量体及び/若しくはホモ二量体の混合物を含有しうる。

【０８３９】

本開示のポリペプチド鎖を作製する方法は、単量体、ホモ二量体及びヘテロ二量体を、これらを含む混合物から分離又は単離する工程を更に含んでよい。ホモ二量体又はヘテロ二量体は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィーにより又はタグの補助を用いて又は当業者に公知の他の方法により精製及び単離されてよい。

【０８４０】

方法はまた、結合剤を不純物から単離及び/又は精製する工程を含んでよい。

【０８４１】

本開示の方法は、したがって、ホモ二量体、ヘテロ二量体又は単量体、ヘテロ二量体及び/若しくはホモ二量体の混合物を含む組成物を結果としてもたらす。

【０８４２】

一部の例示的な実施形態では、組成物は主にホモ二量体を含んでよい。例示的な実施形態では、組成物は、少なくとも約80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも99％又は100％の割合のホモ二量体を含んでよい。

【０８４３】

他の例示的な実施形態では、組成物は主にヘテロ二量体を含んでよい。例示的な実施形態では、組成物は、少なくとも約80％、少なくとも85％、少なくとも90％、少なくとも99％又は100％の割合のヘテロ二量体を含んでよい。

【０８４４】

コンジュゲート

本開示のポリペプチド鎖又は結合剤は、例えば、治療用部分(治療目的のため)若しくは検出可能な部分(即ち、検出若しくは診断目的のため)若しくは延長された半減期を可能とするタンパク質とコンジュゲートされてよく、又はナノ粒子に取り付けられる。一部の事例では、治療用又は検出可能な部分は、ポリペプチド鎖の少なくとも1つのアミノ酸残基に連結されてよい。

【０８４５】

例示的な実施形態では、本開示のポリペプチド鎖又は結合剤は、治療用部分、限定なく例えば、化学療法剤、サイトカイン、細胞傷害剤、及び抗がん薬物(例えば、小分子)等とコンジュゲートされる。

【０８４６】

治療用部分は、限定なく例えば、イットリウム-90、スカンジウム-47、レニウム-186、ヨウ素-131、ヨウ素-125、及び当業者により認識される多くのその他のもの(例えば、ルテチウム(例えば、Lu^{177})、ビスマス(例えば、Bi^{213})、銅(例えば、Cu^{67}))、5-フルオロウラシル、アドリアマイシン、イリノテカン、タキサン類、シュードモナスエンドトキシン、リシン、アウリスタチン類(例えば、モノメチルアウリスタチンE、モノメチルアウリスタチンF)、メイタンシノイド類(例えば、メルタンシン)及び他の毒素を含んでよい。

【０８４７】
別の例示的な実施形態では、本開示のポリペプチド鎖又は結合剤は、限定なく例えば、分光的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的及び/又は他の物理的手段により検出可能な部分を含めて、検出可能な部分とコンジュゲートされる。検出可能な部分は、当該技術分野において周知の方法を使用してポリペプチド鎖又は結合剤に直接的及び/又は間接的のいずれかで(例えば連結、限定なく例えばDOTA若しくはNHS連結を介して)カップリングされてよい。要求される感度、コンジュゲーションの容易性、安定性の要求及び利用可能な設備に依存する選択と共に、多様な検出可能な部分が使用されてよい。好適な検出可能な部分としては、蛍光標識、放射性標識(例えば、限定なく、^{125}I、In^{111}、Tc^{99}、I^{131}及びPETスキャナー用の陽電子放出同位体等が挙げられる)、核磁気共鳴活性標識、発光標識、化学発光標識、発色団標識、酵素標識(限定なく例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等)、量子ドット並びに/又はナノ粒子が挙げられるがこれらに限定されない。検出可能な部分は、検出可能なシグナルを惹起及び/又は生成し、それにより検出可能な部分からのシグナルが検出されることを可能としてよい。
【０８４８】
医薬組成物
本開示のポリペプチド鎖又は結合剤を含む医薬組成物もまた本開示に包含される。医薬組成物はまた、薬学的に許容される担体を含んでよい。
【０８４９】
一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に開示されるようなコンジュゲートされたポリペプチド鎖又はコンジュゲートされた結合剤を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、治療用部分とコンジュゲートされたポリペプチド鎖又は結合剤を含む。一部の実施形態では、医薬組成物は、検出可能な標識とコンジュゲートされたポリペプチド鎖又は結合剤を含む。
【０８５０】
活性成分に加えて、医薬組成物は、水、PBS、塩溶液、ゼラチン、油、アルコール、並びに薬学的に使用されうる調製物への活性化合物の加工を促す他の賦形剤及び助剤を含む薬学的に許容される担体を含有してよい。他の事例では、そのような調製物は、滅菌されてよい。
【０８５１】
本明細書において使用される場合、「医薬組成物」は、薬学的に許容される希釈剤、防腐剤、可溶化剤、乳化剤、アジュバント及び/又は担体を伴う治療有効量の剤を意味する。「治療有効量」は、本明細書において使用される場合、所与の条件及び投与レジメンについて治療効果を提供する量を指す。そのような組成物は、液体又は凍結乾燥若しくは別法で乾燥された製剤であり、様々な緩衝液成分(例えば、Tris-HCl、アセテート、ホスフェート)、pH及びイオン強度の希釈剤、添加剤、例えば、表面への吸収を妨げるためのアルブミン又はゼラチン、界面活性剤(例えば、Tween 20、Tween 80、Pluronic F68、胆汁酸塩)、可溶化剤(例えば、グリセロール、ポリエチレングリセロール)、抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸、メタ重亜硫酸ナトリウム)、防腐剤(例えば、チメロサール、ベンジルアルコール、パラベン)、バルキング物質又は張度修飾剤(例えば、ラクトース、マンニトール)、タンパク質へのポリマー、例えばポリエチレングリコールの共有結合的取付け、金属イオンとの錯体形成、又はポリマー化合物、例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸、ハイドロゲル等の粒子状調製物中若しくは上への、若しくはリポソーム、マイクロエマルション、ミセル、ユニラメラ若しくはマルチラメラ小胞、赤血球ゴースト、若しくはスフェロプラスト上への材料の組込みを含む。そのような組成物は、物理的状態、溶解度、安定性、in vivo放出の速度、及びin vivoクリアランスの速度に影響を及ぼす。制御又は持続放出組成物としては、親油性デポー(例えば、脂肪酸、ワックス、油)中の製剤が挙げられる。ポリマー(例えば、ポロキサマー又はポロキサミン)でコーティングされた粒子状組成物もまた本開示に包含される。本開示の組成物の他の実施形態は、非経口、

経肺、経鼻、経口、経膣、直腸経路を含めて、様々な投与の経路のための粒子状保護コーティング、プロテアーゼ阻害剤又は透過増強剤を組み込んでいる。1つの実施形態では、医薬組成物は、非経口的に、がん周囲に、経粘膜的に、経皮的に、筋肉内に、静脈内に、皮内に、皮下に、腹腔内に、脳室内に、頭蓋内に及び腫瘍内に投与される。

【０８５２】

更に、本明細書において使用される場合、「薬学的に許容される担体」又は「薬学的担体」は当該技術分野において公知であり、0.01～0.1M若しくは0.05Mのリン酸緩衝液又は0.8%の食塩水を含むがこれらに限定されない。追加的に、そのような薬学的に許容される担体は、水性又は非水性の溶液、懸濁液、及びエマルションであってよい。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、及び注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。水性担体としては、水、アルコール/水性溶液、エマルション又は懸濁液が挙げられ、これには食塩水及び緩衝化媒体が含まれる。非経口媒体としては、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液又は固定油が挙げられる。静脈内媒体としては、流体及び栄養補充液、並びに電解質補充液、例えばリンゲルデキストロースに基づくもの等が挙げられる。防腐剤及び他の添加剤もまた存在することができ、これは例えば、抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガス等である。

【０８５３】

任意の化合物のために、治療有効用量は、細胞培養アッセイ又は動物モデル、例えばマウス、ラット、ウサギ、イヌ、若しくはブタのいずれかにおいて最初に概算されてよい。動物モデルはまた、濃度範囲及び投与の経路を決定するために使用されてよい。そのような情報は次に、ヒトにおける投与のための有用な用量及び経路を決定するために使用されてよい。これらの技術は当業者に周知であり、治療有効用量は、症状又は状態を軽快させる活性成分の量を指す。治療有効性及び毒性は、標準的な薬学的手順により細胞培養において又は実験動物を用いて、例えばED_{50}(集団の50%において治療的に有効な用量)及びLD_{50}(集団の50%に対して致死的な用量)の統計を算出及び対比することにより決定されてよい。上記の任意の医薬組成物は、療法を必要とする任意の対象に適用されてよく、これには哺乳動物、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、及び特にヒトが含まれるがこれらに限定されない。

【０８５４】

本明細書に記載の医薬組成物は、任意の数の経路により投与されてよく、これには、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、髄腔内、脳室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、経腸、外用、舌下、又は直腸手段が含まれるがこれらに限定されない。

【０８５５】

一部の実施形態では、医薬組成物は、80.0%～99.9%の純度レベルを有する結合剤から作られる。よって、一部の実施形態では、医薬組成物は、不純物を実質的に含まない結合剤を含む。例えば、医薬組成物は、少なくとも90.0+/-5.0%の純度の結合剤を含む。他の例では、医薬組成物は、少なくとも95.0+/-5.0%の純度の結合剤を含む。他の実施形態では、医薬組成物は、少なくとも99.0+/-1.0%の純度の結合剤を含む。

【０８５６】

一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載されるような1つ又は複数のストレス条件下の溶液中で安定な結合剤を含む。

【０８５７】

使用方法

本開示のポリペプチド鎖及び結合剤は障害又は疾患の処置のために使用されてよい。

【０８５８】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖及び結合剤は、標的細胞、循環タンパク質又は組織に治療及び/又は診断を標的化するために使用されてよい。

【０８５９】

一部の実施形態では、ポリペプチド鎖及び結合剤は、治療用部分とコンジュゲートされ

、治療方法のために使用されてよい。
【０８６０】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖及び結合剤は、検出可能な部分とコンジュゲートされ、検出又は診断方法のために使用されてよい。
【０８６１】
一部の実施形態では、本開示のポリペプチド鎖及び結合剤は、in vivoで腫瘍を標的化するために使用されてよい。
【０８６２】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖及び結合剤は、in vivoで腫瘍退縮を促進するため及び/又は腫瘍体積を低減させるために使用される。
【０８６３】
本開示のポリペプチド鎖及び結合剤は、そのため、がん処置のために使用されてよい。
【０８６４】
本開示の方法は、本明細書に開示されるポリペプチド鎖、結合剤又は混合物、又は該ポリペプチド鎖、結合剤若しくは混合物を含む医薬組成物を、必要とする個体に投与する工程を含んでよい。
【０８６５】
一部の実施形態では、ポリペプチド鎖及び結合剤は、化学療法剤と組み合わせて投与される。
【０８６６】
本開示によれば、必要とする個体はヒトであってよい。更に本開示によれば、必要とする個体は動物であってよい。
【０８６７】
一部の実施形態では、ネオ抗原の発現と共に引き起こされる又はそれと関連付けられる障害又は疾患の処置が特に想定される。
【０８６８】
一部の実施形態では、抗原の過剰発現と共に引き起こされる又はそれと関連付けられる障害又は疾患の処置が特に想定される。
【０８６９】
一部の実施形態では、障害又は疾患はがんであってよい。
【０８７０】
他の実施形態では、障害又は疾患は感染症であってよい。
【０８７１】
他の実施形態では、障害又は疾患は免疫調節異常であってよい。
【０８７２】
他の実施形態では、障害又は疾患は代謝調節異常であってよい。
【０８７３】
一部の実施形態では、結合剤は静脈内に投与される。
【０８７４】
一部の実施形態では、結合剤は注入により投与される。
【０８７５】
本開示のポリペプチド鎖及び結合剤は、検出目的のために使用されてよい。
【０８７６】
特定の標的の検出は、標的を含有する又は含有することが疑われる試料を、そのような標的用の抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖又は結合剤と接触させ、検出装置を使用して結合陽性又は陰性と関連付けられるシグナルを定量化することによりin vitroで行われてよい。
【０８７７】
試料は哺乳動物(例えば、ヒト)を起源としてよい。試料は、哺乳動物又は細胞培養上清から得られた組織試料であってよい。

【０８７８】
一部の実施形態では、試料は、哺乳動物から得られた血清試料、血漿試料、血液試料、精液又は腹水液であってよい。
【０８７９】
特定の標的の検出は、そのような標的用の抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖又は結合剤を個体に投与し、検出装置を使用して結合陽性又は陰性と関連付けられるシグナルを定量化することによりin vivoで行われてよい。
【０８８０】
試料中又は個体中に標的の存在が検出されたら、薬物(例えば、本明細書に開示される抗体、小分子、ポリペプチド鎖又は結合剤)が個体に投与されてよい。
【０８８１】
本開示において記載及び提供される実施形態に加えて、以下の非限定的な実施形態が特に想定される。
【０８８２】
Table 3(表4)、Table 4(表5)、Table 5(表6)及びTable 6(表7)は、それら自体で(例えば、二量体化ドメインとの融合物として)生物学的活性を有するVHH並びにTable 7(表8)に例示されるような多量体、多価及び/又は多特異性結合剤の部分としてのVHHを示す。
【実施例】
【０８８３】
(実施例1)
動物の免疫化及び免疫ライブラリーの構築
ヒト抗原、ヒト抗原をコードするcDNAプラスミド及び/又はヒト抗原を過剰発現する細胞を用いてアルパカ(Vicugna pacos)又はラマ(llama glama)を免疫化することにより単一ドメイン抗体を生成した。
【０８８４】
例えば、抗DR2単一ドメイン抗体は、ヒトDR2タンパク質、ヒトDR2 cDNAプラスミド、及びヒトDR2過剰発現細胞株;SH-SY5Y-D2細胞を含むDR2抗原を用いてアルパカ(Vicugna pacos)を免疫化することにより生成した。抗PD-1単一ドメイン抗体は、ヒトPD-1タンパク質、ヒトPD-1 cDNAプラスミド及びヒトPD-1過剰発現細胞株;CHO-PD1細胞を含むPD-1抗原を用いてアルパカ(Vicugna pacos)を免疫化することにより生成した。抗CD47の場合、単一ドメイン抗体は、ヒトCD47タンパク質、ヒトCD47 cDNA、及び(活性化された)ヒトPBMCを含むCD47抗原を用いてラマ(llama glama)を免疫化することにより生成した。
【０８８５】
抗原に対する再構成された免疫ライブラリーのファージディスプレイパニング後のクローンピッキングから単一ドメイン抗体の配列を明らかにした。
【０８８６】
ポリペプチド鎖(例えば、Table 6(表7)又はTable 7(表8)を参照)の発現並びにin vitro及びin vivo試験のために、VHHをコードするDNA断片を構築物に一般にサブクローニングした。
【０８８７】
HEWL特異的VHHでの1つ又は複数のVHHの置換により対照も生成した。
【０８８８】
(実施例2)
結合剤のトランスフェクション、発現、及び精製
ExpiCHO又はExpi293細胞におけるポリペプチド鎖のトランスフェクション及び発現
タンパク質二量体(例えばホモ二量体又はヘテロ二量体)は、ExpiCHO(商標)Expression System (Thermo Fisher社、カタログ番号A29133)又はExpi293(商標) Expression System (Thermo Fisher社、カタログ番号A14635)を使用して、DNA構築

物から2.5mL又は400mL培養容積中で発現させた。

【０８８９】

簡潔に言うと、新しく解凍したCHO細胞は、トランスフェクションの前に2回又はそれ以上継代して、培養中で回復させた。次いで、細胞は、4×10^6～6×10^6個の細胞/mLに達するまで3～4日毎に継代し、その時点で、それらは、37℃に温めたExpiCHO(商標)Expression Medium中で2×10^5～3×10^5個の細胞/mLに希釈した。トランスフェクションの前日、細胞は、3×10^6～4×10^6個の細胞/mLに希釈し、トランスフェクションの日に、細胞は、6×10^6個の細胞/mLに更に希釈した。1μgのDNA/mLの培養容積は、cold OptiPRO(商標)培地(2.5mLの培養容積につき100μL; 400mLの培養容積につき16mL)によって希釈した。ExpiFectamine(商標) CHO Reagent(2.5mLの培養容積につき8μL;400mLの培養容積につき1280μL)を、DNAを含有する培地に添加し、室温で1～5分間、ExpiFectamine(商標)/DNA複合体とインキュベートした。次いで、DNA複合体を回旋しながら培養に移した(6×10⁶個の細胞/mL)。細胞は、震盪(INFORS HT振盪機、125rpm)しながら8%CO_2及び湿度80%下で、37℃でインキュベートした。トランスフェクションの開始後18～22時間で、ExpiCHO(商標)フィード(2.5mLの培養容積につき0.6mL;400mLの培養容積につき96mL)及びExpiCHO(商標)エンハンサー(2.5mLの培養容積につき15μL;400mLの培養容積につき2.4mL)を細胞に添加した。細胞を、125rpm(25mm orbit)で震盪しながら、8%CO_2及び湿度80%下、37℃に設定したINFORS HTインキュベーターに戻した。トランスフェクションの8日後、30分間、4000×gでの遠心分離によって上清を清澄化した。上清は、Nalgene(商標) Rapid-Flow(商標) Sterile Disposable Filter Unitsの1000mLフィルターユニット(Thermo Science社、カタログ番号567-0020)を使用してフィルター滅菌し、後の解析のために4℃で保存又は凍結した。

【０８９０】

新しく解凍したHEK293細胞は、トランスフェクションの前に2回又はそれ以上継代して、培養中で回復させた。次いで、細胞は、3×10^6～5×10^6個の細胞/mLに達するまで3～4日毎に継代し、その時点で、それらは、37℃に温めたExpi293(商標)Expression Medium中で3×10^5～5×10^5個の細胞/mLに希釈した。トランスフェクションの前日、細胞は、2.5×10^6～3×10^6個の細胞/mLに希釈し、トランスフェクションの日に、細胞は、3×10^6個の生細胞/mLに更に希釈した。1μgのDNA/mLの培養容積は、OptiMEM(商標) I低血清培地によって希釈し、2.5mLの培養容積につき150μL及び400mLの培養容積につき24mLの最終容積を得た。ExpiFectamine(商標) 293 Reagent(2.5mLの培養容積につき8μL;400mLの培養容積につき1.3mL)を、Opti-MEM(商標) I低血清培地(2.5mLの培養容積につき140μL;400mLの培養容積につき22.5mL)に添加し、室温で5分間インキュベートした。希釈したExpiFectamine(商標)を希釈したDNAに添加し、室温で15分間インキュベートした。ExpiFectamine(商標)/DNA溶液を、回旋しながら一滴ずつ(3×10⁶個の細胞/ml)培養に移した。細胞は、終夜震盪(INFORS HT振盪機、125rpm)しながら8%CO_2及び湿度80%下で、37℃でインキュベートした。トランスフェクションの開始後18～22時間で、ExpiFectamine(商標)293 Transfection Enhancer 1(2.5mLの培養容積につき15μL;400mLの培養容積につき2.4mL)及びExpiFectamine(商標)293 Transfection Enhancer 2(2.5mLの培養容積につき50μL;400mLの培養容積につき24mL)を細胞に添加した。細胞を、125rpm(25mm orbit)で震盪しながら、8%CO_2及び湿度80%下、37℃に設定したINFORS HTインキュベーターに戻した。トランスフェクションの5日後、30分間、4000×gでの遠心分離によって上清を清澄化した。上清は、Nalgene(商標)Rapid-Flow(商標) Sterile Disposable Filter Unitsの1000mLフィルターユニット(Thermo Science社、カタログ番号567-0020)を使用してフィルター滅菌し、後の解析のために4℃で保存又は凍結した。

【０８９１】

精製

タンパク質は、上清の容積に応じて、重力カラムを備えた3mL MabSelect(商標)SuRe(商標)樹脂(GE Healthcare社、カタログ番号17-5438-02)又はAKTA PURE(GE Healthcare社、Piscataway、NJ)を備えた40mL MabSelect(商標)SuRe(商標)樹脂を使用して精製する。樹脂は、終夜0.5M NaOHとインキュベートし、注入前にTrisベース緩衝液pH7.4(50mM Tris-HCl、150mM NaCl、pH7.4)で平衡化した。上清を、重力カラム又は5ml/分で40mLカラムにアプライした。樹脂カラムは、流速10mL/分で、Trisベース緩衝液pH7.4の3CV(カラム容積)により洗浄した。タンパク質は、10mL/分で、0.1Mクエン酸pH3の3CVにより溶出した。クロマトグラム(280nmでの吸光度)の視覚的なアウトプットからのタンパク質によって同定した画分を共にプールした。プールした画分は、1M Tris-HCl pH9.0によって中和され、PBS 10× pH7.2(15mMリン酸二水素カリウム、1552mM塩化ナトリウム、27mM二塩基性リン酸ナトリウム、ThermoFisher社、カタログ番号70013073)から調製したリン酸緩衝生理食塩水(PBS)pH6.0緩衝液へと移す前に、pH約5～6を達成した。

【０８９２】

緩衝液交換は、重力カラムから精製したタンパク質は試料濃縮器により、又はAKTA PUREから精製したタンパク質は透析によるか若しくは脱塩カラムにより行った。重力カラムから精製したタンパク質は試料濃縮器VivaSpin2によって濃縮し、4℃での3500～4000×gの遠心分離による50kDa MWCO(GE Healthcare社、カタログ番号28932257)は、次いで、PBS pH6によって4倍に達するまで希釈し、試料が200倍に達するまで繰り返した。透析は、7kDa分画分子量透析チューブ(ThermoFisher社,カタログ番号68799)を使用して、4℃で終夜、4LのPBS pH6中で行った。一方、脱塩カラムは、終夜0.5M NaOHとインキュベートし、PBS pH6で平衡化した。15mLの容積の中和タンパク質試料は、0.5mL/分で、HiPrep26/10脱塩カラム(GE Healthcare社、カタログ番号17-5087-02)にロードし、次いでタンパク質は、2CVのPBS pH6によって溶出した。ロードするステップ及び溶出ステップは、アフィニティーカラムの溶出から中和タンパク質試料がなくなるまで繰り返した。クロマトグラム(280nmでの吸光度)の視覚的なアウトプットからのタンパク質によって同定された画分を共にプールした。

【０８９３】

試料は、Nalgene(商標)Rapid-Flow(商標)Sterile Disposable Filter Unitsの150mLフィルターユニット(Thermo Scientific社、カタログ番号565-0010)を使用してフィルター滅菌した。最終タンパク質試料を、Pierce(商標)ビシンコニン酸Protein Assayキット(ThermoFisher社、カタログ番号23227)によって定量し、Endosafe(登録商標) LAL Reagentカートリッジ(Charles River社、カタログ番号PTS2005)によってエンドトキシンレベルについて試験した。最終タンパク質試料は、還元又は非還元条件下のSDS-PAGEゲルで解析した。

【０８９４】

CHO細胞中での結合剤の製造、続いてプロテインAアフィニティークロマトグラフィーに続くサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いた従来の2工程精製は、95.5%～99.5%の範囲に及ぶ(二量体の)純度を結果としてもたらした。

【０８９５】

KC020の純度は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)及びSDSキャリパー後に97%を上回ることが見出された。上位3つのクローンのDNA配列を検証したところ;KC020の電荷プロファイル及びグリコシル化プロファイルはモノクローナル抗体のものと類似していることが見出された。以下の表は、細胞株開発のために選択された3つの代表的なクローンからの14日後のKC020力価を表す。

【０８９６】

【表３】

クローンID	14日目の力価 (g/L)	純度 >97% (SECによる)	純度 >97% (SDS_Caliper_nRによる)
22	5.13	√	√
6	6.45	√	√
21	6.59	√	√

【０８９７】

SDS-PAGE及びウエスタンブロッティング

試料は、NuPAGE(商標)Sample Reducing Agent(TermoFisher社　カタログ番号NP0004)を含むか又は還元剤を含まないNuPAGE(商標)LDS Sample Buffer(ThermoFisher社　カタログ番号NP0007)で、還元又は非還元条件下のSDS-PAGE解析のために調製した。還元条件下の試料を70℃で10分間の加熱により変性させた。試料(16μL)を、3～8% Tris-酢酸ミニゲル(1.5mm、15ウェル)のBSA標準の横にロードした。電気泳動は、125ボルトでおよそ1時間、X-Cell SureLock(商標)ミニゲル装置を使用して実施した。ゲルは、GelCode(商標)染色試薬(Thermo Fisher社、カタログ番号24594)を使用して染色した。

【０８９８】

ウェスタンブロット解析のため、タンパク質は、製造業者の説明書に従って、iBlot(商標)システム(Thermo Fisher社、カタログ番号IB301031)を使用してニトロセルロースメンブレンへと移した。

【０８９９】

Hisタグの検出は、Anti-Penta His-HRP抗体によって行った。簡潔に言うと、メンブレンは、震盪しながら室温で1時間、Qiagenブロッキング緩衝液(Qiagen社、1018862)20ml中でのインキュベーション、次いで震盪しながら室温で1時間、Starting Blocking(商標) T20(PBS) Blocking(Thermo Fisher社、カタログ番号37528)20ml中でのインキュベーションによりブロックした。メンブレンは、1X TBS Tween(商標)-20によって10分間、3回洗浄した。メンブレンは、震盪しながら室温で1時間、事前にブロッキング緩衝液で1:2000に希釈したAnti-Penta His-HRP(Qiagen社、カタログ番号1014992)とインキュベートした。メンブレンは、1X TBS Tween(商標)-20で10分間、3回洗浄した。シグナルは、製造業者の説明書に従って、Super Signal(商標) West Pico PLUS(ThermoFisher社、カタログ番号34080)を使用して可視化した。画像は、Azure Biosystem画像化システムを使用して記録した。

【０９００】

これらの実験の結果は、本開示の結合剤(ホモ二量体又はヘテロ二量体)は効率的に細胞中で発現され、精製されること、及び本明細書に開示されるポリペプチド鎖のフォーマットは、グラム/Lの範囲内の結合剤(ホモ二量体又はヘテロ二量体)の収率を達成することを可能とすること(データ示さず)を指し示す。

【０９０１】

(実施例3)

抗D2抗原結合性ドメインを含む結合剤のin vitro及びin vivo試験

細胞株

OCI-AML3細胞は、PBMC依存的細胞傷害性アッセイにおいて標的細胞として使用されるヒト起源の急性骨髄性白血病細胞である。THP-1は、急性単球性白血病患者に由来する単球性細胞株である。THP-1細胞は、PBMC依存的細胞傷害性アッセイにおいて標的細胞として使用される。

【０９０２】
NCI-H82、NCI-H69及びNCI-H510Aは、免疫不全マウスにおけるSCLC異種移植片腫瘍モデルにおいて使用されるヒト小細胞肺がん(SCLC)細胞株である。NCI-H82、NCI-H69及びNCI-H510Aは、ドーパミン受容体D2を過剰発現し、特にD2標的化研究用のモデルとして、本明細書において使用される。
【０９０３】
NCI-H727細胞は、免疫不全マウスモデルにおけるNSCLC異種移植片腫瘍モデルのために使用されるヒト非小細胞肺がん(NSCLC)細胞である。D2は、NCI-H727細胞において上方調節されることが示されている。
【０９０４】
PANC1は、免疫不全マウスモデルにおける異種移植片腫瘍モデルのために使用されるヒト膵臓細胞株である。
【０９０５】
プロテオリポソームの製造
抗D2結合剤の結合特異性を決定するために、補足されたプロトコールにしたがってCellFree Science社からのProteoLiposome BD kit (CellFree Science社、カタログ番号CFS-CPLE-BD)を用いてヒトD2提示プロテオリポソームを製造した。
【０９０６】
簡潔に述べれば、要求される体積のヌクレアーゼフリー水、5X 転写緩衝液、NTPミックス、RNase阻害剤、SP6 RNAポリメラーゼ及びプラスミドDNAを1.5mLチューブ中で混合し、37℃で6時間インキュベートすることにより転写反応を行った。翻訳反応を行うために、mRNA混合物、栄養緩衝液(feeding buffer)、WEPRO7240、クレアチンキナーゼ及びアゾレクチンリポソームの混合物を指示書の通りに調製した。翻訳反応混合物をslide-A-Lyzer Mini Dialysis device (Thermo Scientific社、カタログ番号69570)に加え、15℃で72時間インキュベートすることにより翻訳反応を行った。
【０９０７】
PBSを用いた洗浄及び15000rpm、4℃で10分間の遠心分離によりプロテオリポソームを精製した。洗浄工程を3回繰り返した後に、採取したプロテオリポソームを適切な量のPBSに再懸濁し、-80℃で貯蔵した。
【０９０８】
ヒトD2提示プロテオリポソームへの抗D2結合剤(例えば、Table 6(表7))の結合(図1、図25、図26)をELISAにより評価した。簡潔に述べれば、標的タンパク質を含有するプロテオリポソーム又はエンプティリポソームを96ウェルプレート上にコーティングした。プレートに蓋をし、4℃で終夜放置した。翌日、プレートをPBSで1回洗浄し、ブロッキング緩衝液を用いて室温で1時間ブロッキングした。結合剤を、ブロッキング緩衝液中に希釈した指し示される濃度で試験し、37℃で1時間のインキュベーションを行った。インキュベーション後に、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。プレートを、1:5000に希釈された抗ヒトFc-HRP (Sigma-Aldrich社、カタログ番号AP113P)と室温で1時間インキュベートし、次にPBS-T洗浄緩衝液で3回洗浄した。SuperSignal(商標) ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (Thermofisher社、カタログ番号37069)を用いてシグナルを発生させた。プレートをSpectraMax(商標) i3x Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices社)上で読み取った。
【０９０９】
そのような実験の代表的な結果を図1に提示しており、図1は、試験された抗D2結合剤はD2プロテオリポソームに特異的に結合し(0.1488nMのEC50)、非常に高い親和性を有することを実証する。
【０９１０】
GPCR BRETアッセイ
D2の下流のシグナル伝達に対する様々な抗D2結合剤の効果を評価した(図2)。トランスフェクションの前に、1%のペニシリン/ストレプトマイシン及び10%のウシ胎仔血清

を補充したダルベッコ改変イーグル培地(ＤＭＥＭ)中でＨＥＫ２９３細胞を維持した。ポリエチレンイミン(ＰＥＩ)トランスフェクション試薬を全てのトランスフェクションのために使用した。ＨＥＫ２９３細胞にｈＤＲ２及びバイオセンサーのうちの１つを共トランスフェクトした。トランスフェクトされるＤＮＡの総量を、トランスフェクトされる細胞培養物１ｍＬ当たり１μｇで一定に保った。ＰＥＩ:ＤＮＡ比(μｇ:μｇ)は３:１に固定した。ＤＮＡ及びＰＥＩを最初に１５０ｍＭ ＮａＣｌ中に別々に希釈した。各々のチューブ中の希釈剤の体積は、トランスフェクトされる細胞培養物の体積の５％に対応する。ＤＮＡ及びＰＥＩを希釈してから、ＰＥＩ含有溶液をＤＮＡ溶液に加え、ＤＮＡ/ＰＥＩ混合物を直ちに５秒間ボルテックスした。ＤＮＡ/ＰＥＩ混合物を室温で少なくとも２０分間インキュベートしてＤＮＡ/ＰＥＩ複合体を形成させた。インキュベーションの間に、ＨＥＫ２９３細胞を剥離し、カウントし、培養培地に再懸濁した。インキュベーション期間の終わりに、ＤＮＡ/ＰＥＩ混合物を細胞に加えた。細胞を最後に９６ウェルプレート中に３５０００個の密度で分布させた。

【０９１１】

トランスフェクションの４８時間後に、ＢＲＥＴ実験を行ってアゴニスト試験モードでＤ２の下流のシグナル伝達を検出した。培養培地を吸引し、９６ウェルプレートからの５０μｌのＨａｎｋ’ｓ Ｂａｌａｎｃｅｄ Ｓａｌｔ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ ｂｕｆｆｅｒで置き換えた。ＨＥＫ２３９細胞において行ったアッセイのために１０μｌの１０μＭ ｅ-Ｃｏｅｌｅｎｔｅｒａｚｉｎｅ Ｐｒｏｌｕｍｅ Ｐｕｒｐｌｅを１μＭの最終濃度で各々のウェルに加えた。ＨＰ Ｄ３００デジタルディスペンサーを使用して陽性対照としてドーパミンを各々のウェルに加えた。ドーパミンを１６個の濃度で各々のバイオセンサーと共にアッセイした。抗体を各々のウェルに手動で加えた(ウェル毎に１μＭの最終濃度)。抗Ｄ２結合剤を８個の濃度で各々のバイオセンサーと共に２連でアッセイした。細胞をドーパミンと室温で１０分間及び抗体と室温で６０分間インキュベートした。Ｓｙｎｅｒｇｙ ＮＥＯプレートリーダー上で０.４秒のインテグレーションタイムを用いてＢＲＥＴシグナルを収集した。

【０９１２】

様々なＧタンパク質センサーを用いてトランスフェクトされたＧＰＣＲ ＢＲＥＴアッセイにおける様々な抗Ｄ２結合剤のＥＣ５０を図２に提示している。Ｇαｚ、Ｇαｉ２、ＧαｏＡ、及びＢａｒｒ２を含むＧタンパク質を用いたＧＰＣＲ応答を示すためにドーパミンを陽性対照として使用した。予想外なことに、ＫＣ０１１、ＫＣ０１２、ＫＣ０１３、及びＫＣ０１４を含む全ての抗Ｄ２結合剤は、Ｇαｚを通じた特異的なＧＰＣＲシグナル伝達を示した。抗Ｄ２結合剤はＤ２上の独特のエピトープに結合し、高度に特異的なシグナル伝達経路を開始させることを結果は指し示す。

【０９１３】

ＲＮＡｓｅｑ及びｑＲＴ-ＰＣＲ検証

処理後の大域的な転写プロファイルを評価する次世代シークエンシング技術の使用を通じて、ＫＣ０１３の作用の機序をＮＣＩ-Ｈ６９細胞においてｉｎ ｖｉｔｒｏで調べた。懸濁ＮＣＩ-Ｈ６９細胞を収集し、5×10^{6}細胞/ｍＬの濃度で再懸濁した。完全培地２ｍＬ当たり１０００万個の細胞を６ウェルプレートのウェルに移した。ＫＣ０１３及び陰性対照ＫＣ０１８(ＶＨＨ部分が配列番号１１４に示される抗４ＨＥＭ ＶＨＨで置き換えられている)を適切なウェルに１.０μＭの最終濃度で加えた。細胞を３７℃、５％ ＣＯ２のインキュベーターに戻し、３時間処理した。インキュベーション期間の後に、ＱｉａＳｈｒｅｄｄｅｒカラムを使用して細胞をホモジナイズし、生産者のプロトコールの通りにＲＮｅａｓｙ ＲＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔを使用して、破壊細胞溶解液からトータルＲＮＡを単離した。全部で５００ｎｇのトータルＲＮＡをスナップ凍結し、解析のためにＧｅｎｏｍｅ Ｑｕｅｂｅｃに移送した。

【０９１４】

Ａｇｉｌｅｎｔ ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒを使用してＲＮＡ完全性を評価した。ｍＲＮＡ濃縮工程、続いてＩｌｌｕｍｉｎａライブラリーＱＣ評価を組み込んで、ＮＥＢ ｍＲＮＡ ｓｔｒａｎｄｅｄ ＮＥＢＮｅｘｔ Ｕｌｔｒａ ＩＩ ｋｉｔ (ＮＥＢ社、カタログ番号Ｅ７６４５Ｓ)を使用してライブラリーを調製した。ＮｏｖａＳｅｑ ６０００ ＰＥ１００機器(Ｉｌｌｕｍｉｎａ社)上で２５００万リード/試料で試料をシークエンシングした。リードをＥＮＳＥＭＢＬ ＧＲＣｈ３８(ホモ・サピエンス(Ｈｏｍｏ ｓａｐｉｅｎｓ))リリース８６ヒ

ト参照ゲノム配列及びアノテーションにマッピングした。これは58,051個の遺伝子についてのカウントデータを結果としてもたらした。少なくとも3つの試料において1カウント・パー・ミリオン(CPM)を超えない(即ち最小群サイズの)遺伝子をフィルタリング除去したところ、下流の解析のために14,983個の遺伝子が残った。

【０９１５】

KC018陰性対照と比べてKC013処理での0.05の最大偽発見率(False Discovery Rate; FDR)を使用することにより遺伝子リストを構築した。Enrichr (Icahn School of Medicine、Mount Sinai; http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/)を使用してエンリッチメント解析を実行した。FDR多重検定補正を伴うFischerの直接検定を使用し、Gene Ontology (GO)生物学的経路及びタンパク質クラスに焦点を当てて、PANTHERデータベース(University of Southern California; http://pantherdb.org)を使用して過剰出現解析(over-representation analysis)を実行した。使用された遺伝子リストは、191個の上方調節された遺伝子及び634個の下方調節された遺伝子からなり、組み合わせて825個の有意に変更された遺伝子の総数である(FDR〈0.05)(図3)。Ingenuity Pathway Analysis (IPA、Qiagen社)を使用して経路解析を実行した(図4A&B)。完全連鎖クラスタリング(complete linkage clustering)及びピアソン距離測定と共に、Log2変換された転写物リードカウントを使用してヒートマップを構築した(FDR〈0.05、825個の遺伝子)。

【０９１６】

RNA-Seqデータの経路解析は、NCI-H69及びNCI-H82 SCLCを含む陰性対照(KC018)処理細胞と比べてCREB、Wnt、及びmTORシグナル伝達経路を含むいくつかのがん関連経路の下方調節、並びに複数のシグナル伝達経路を通じたp53の活性化を明らかにした。

【０９１７】

NCI-H69(図5A)、NCI-H82(図5B)、及びHEK-D2(図5C)を含む3つの異なる細胞株を使用した定量的逆転写酵素PCR (qRT-PCR)によりRNA-Seqデータの経路解析を検証した。簡潔に述べれば、懸濁細胞をT175フラスコ中の完全培地中で増殖させた。細胞を3つの6ウェルプレート中にウェル当たり5×10^6細胞/mLで播種し、1.0μM KC013又は1.0μMのKC018を用いて3連で3時間及び6時間処理した。指定されたインキュベーション期間後に、反復試料を剥がし取り、各々の時点に15mLファルコンチューブに移した。細胞を1x PBSで2回洗浄し、細胞ペレットを液体窒素中でフラッシュ凍結し、下流の解析のために-80℃で貯蔵した。生産者の指示書にしたがってQuick-RNA Miniprep Plus kit (Cedarlane社、カタログ番号R1057)を使用してトータルRNAを抽出した。NanoPhotometerを使用して260及び280nmにおける吸光度を測定することにより、各々の試料について回収されたRNAの量を定量化した。生産者の指示書にしたがってiScript(商標) Reverse Transcription Supermixを用いる逆転写のために1μgのRNAを使用した。得られたcDNAを次に、40ng/mLのグリコーゲンを含有するddH2Oを使用して1:20に希釈した。

【０９１８】

相対標準曲線法を使用するiQTM5 Real-Time PCR SystemにおいてSsoAdvanced Universal IT SYBR Greenを使用して遺伝子発現解析を行った。最終反応体積は、1x SYBR greenミックス、200nM 最終プライマー濃度、2μl cDNA及びddH2Oを含有する96ウェルプレートのウェル当たり10μlであった。クロスバックグラウンドレベル(即ち閾値)に対する蛍光シグナルのために要求されるサイクルの数として標的遺伝子についてのqRT-PCRの未加工データを収集した。これらの値はサイクル閾値又はCt値として公知である。KC013 vs KC018での処理後の標的遺伝子の相対的な遺伝子発現レベルを決定するために、複数内部対照遺伝子法の幾何平均を使用し、続いて以下に記載されるΔΔCt算出方法を行った。このアプローチは、Vandesompele J.ら、Genome Biology 2002及びHellemansら、Genome Biology, 2007に詳細に記載されている。最終のデータは、対照結合剤と比べた、選択された共通の内因性参照遺伝子に対して正規化

された遺伝子発現における倍数変化として提示した。データは、3つの技術的反復試料において行った3つの生物学的反復試料の平均として提示した。結果は、3連で少なくとも3回行ったアッセイからの代表的なデータであった。

【０９１９】

KC013を用いた処理でのNCI-H69細胞における遺伝子発現における変化をヒートマップ(図3)により示しており、色及び強度バリエーションは個々の遺伝子発現における変化を表す。この実験の結果は、825個の総数の有意に変更された遺伝子(FDR〈0.05)がKC013での処理後に観察され、634個の遺伝子が下方調節されたことを指し示す。

【０９２０】

図4は、RNAseq結果のPANTHER解析からの下方調節されたシグナル伝達経路及びタンパク質クラスを表す。上位の下方調節されたシグナル伝達経路は、Wnt経路、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)経路及びカドヘリンシグナル伝達経路を含む(図4A)。PANTHER解析による最も下方調節されたタンパク質クラスは遺伝子特異的転写調節因子である(図4B)。Wnt経路及びカドヘリンシグナル伝達経路は、腫瘍細胞生存、増殖、腫瘍形成、及び進行において重要な役割を果たすことが示唆されている。異常なWntシグナル伝達経路は、がん幹細胞(CSC)を調節することにより多くのがん細胞の開始において鍵となる役割を果たすことが示されている。これらの経路及び転写調節因子の下方調節はKC013の抗腫瘍機序を示唆する。

【０９２１】

RNAseqプロファイルと合致して、Wnt経路、mTOR経路及びcAMP経路における特有のシグナル伝達成分は、KC013を用いた処理で、NCI-H69細胞(図5A)、NCI-H82細胞(図5B)、及びHEK-D2細胞(図5C)における下方調節を示した。

【０９２２】

CB-17 Fox Chase SCIDマウスにおける単回用量PK

University Health Network (UHN、Toronto、ON)から購入したCB-17 Fox Chase SCIDマウス(6～8週齢、雌)をPK研究のために使用した。マウスをUHNの動物施設において病原体フリーの環境において飼育した。動物研究は、Canadian Council on Animal Care (CCAC)のガイドライン及びUHNの動物実験委員会により承認された動物使用プロトコールにしたがって実行した。簡潔に述べれば、マウスを2つの実験群(6匹のマウス/群)に分け、各々の群のマウスに30mg/kgの単回用量のトラスツズマブ(UHNの薬局)又はKC013を静脈内注射(図6A)又は腹腔内注射(図6B)のいずれかにより与えた。各々の研究のために、注射の0.083時間(PK iv研究についてのみ)、1時間(PK ip研究についてのみ)、3時間、6時間、1日、3日、7日、10日、15日、21日及び28日後に血液試料を収集した。血液試料を遠心分離し、血清試料を収集し、解析の時点まで-80℃で貯蔵した。マウス血清中のトラスツズマブ及びKC013の濃度を、以下に記載されるように定量的酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)により測定した。Phoenix WinNonlinソフトウェア(Certara社)を使用して非コンパートメント法により薬物動態データ解析を行った。

【０９２３】

マウス血清中の抗体を定量的ELISAにより定量化した(図6)。簡潔に述べれば、マウス抗ヒトIgG抗体(Bio-rad社、カタログ番号MCA878G、1/200の希釈を使用)を使用して4℃で終夜96ウェルプレートをコーティングした。翌日、プレートを3回洗浄し、2%BSAを用いて室温で1時間ブロッキングした。一方、標準品(STD、Bio-rad社、カタログ番号MCA6092)、品質管理(QC)、及び各々の血清試料を、1%マウス血清を含有する洗浄緩衝液中に希釈した。100μlのSTD、QC、及び希釈された血清試料を96ウェルプレートに加え、室温で2時間インキュベートした。3回の洗浄後に、プレートを二次抗体(ヤギ抗ヒトFc抗体、1/5000の希釈、Cedarlane社、カタログ番号109-035-098)と室温で1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄した後に100μlの検出基質を各々のウェルに加えた。最も高いSTDリーディングが650nmの波長で0.9～1.1に達したときに、50μlの停止溶液を各々のウェルに加えて反応を停止させた。プレートを抗体測定

のために450nmの波長で読み取った。

【０９２４】

これらの実験の結果は、KC013のIV注射(図6A)は214時間のT1/2を示し、IP注射(図6B)は159時間のT1/2を示したことを指し示す。KC013について達成されたCmaxは、全長ヒト抗体トラスツズマブと類似している。このデータは、SCIDマウスにおける抗D2結合剤の長い半減期を実証した。

【０９２５】

CB-17 Fox Chase SCIDマウスにおける腫瘍予防モデル

CB-17 Fox Chase SCIDマウス(6～8週齢、雌)はCharles River Laboratories社(St. Constant、QC)又はUHN (Toronto、ON)のいずれかから購入した。動物の飼育及び動物研究のガイドラインは上記されるものと同じである。

【０９２６】

抗D2結合剤の有効性を様々な腫瘍予防モデル、NCI-H510A(図7C、図8)、NCI-H727(図7A、図8)、PANC1(図8)、及びNCI-H69(図7B、図8)において評価した。各々のモデルについて、DPBS中の腫瘍細胞(NCI-H510Aについて800万細胞/マウス、NCI-H727について600万/マウス、PANC1について500万/マウス、又はNCI-H69について300万/マウス)をマウスの右脇腹の皮下(s.c.)に注射した。細胞接種1日後、各細胞系を接種したマウスを2つの実験群(10又は5匹のマウス/群)に無作為に分け、各群のマウスは、全部で8週間、週に2回、KC018(陰性対照)又はKC013のいずれかの16mg/kg ip.を受けた。腫瘍体積は、ノギスを使用して測定し、マウスは、週に1又は2回計量した。腫瘍体積は、式:1/2(長さ×幅^2)を使用して算出した。腫瘍増殖阻害(TGI)のパーセンテージの算出のため、KC013処置群をそのそれぞれの陰性対照と比較した。TGIは以下の式により算出した。

【０９２７】

【数１】

$$TGI[\%]=100-\frac{\text{平均}(\text{TV}(\text{処置})_{\text{day z}}\ -\ \text{TV}(\text{処置})_{\text{day x}})}{\text{平均}(\text{TV}(\text{各々の対照})_{\text{day z}}\ -\ \text{TV}(\text{各々の対照})_{\text{day x}})}\times 100$$

【０９２８】

TV day zは、指定した試験日(day z)の個々の動物の腫瘍体積を表し、TV day xは病期分類日(day x)の個々の動物の腫瘍体積を表す。

【０９２９】

統計検定は、スチューデントのt検定(両側検定)によって実施した。

【０９３０】

図7に示されるように、KC013は、アイソタイプ対照と比較してNCI-H727腫瘍予防モデルにおいて49%の腫瘍増殖阻害(図7A)、NCI-H69腫瘍予防モデルにおいて46%の腫瘍増殖阻害(図7B)及びNCI-H510A腫瘍予防モデルにおいて77%の腫瘍増殖阻害(図7C)を示した。

【０９３１】

図8に示されるように、KC013、KC012、及びKC014は、腫瘍予防SCLC腫瘍モデルの全てにおいて普遍的な腫瘍増殖阻害を実証し、KC013は他の抗D2結合剤よりも最良のin vivo有効性を与えた。これらの抗D2結合剤の全てはBRETアッセイにおいて独特のGαzシグナルを開始させたので、SCLC腫瘍モデルにおいて達成されたin vivo有効性は、腫瘍細胞における特有のGαzシグナルと関連しうる。in vivo有効性はまた、腫瘍進行のために重要である下方調節されたシグナル伝達経路により説明される。

【０９３２】

(実施例4)

抗PD1及び抗CD47抗原結合性ドメインを含む結合剤のin vitro及びin vivo試験

ELISA結合アッセイ

組換えヒト若しくはカニクイザルPD-1 (Cedarlane社、カタログ番号HPLC-10377-H08H-100)又は組換えヒト若しくはカニクイザルCD47 (Cedarlane社、カタログ番号12283-H08H-200及び90869-C08H)に対する抗PD-1及びCD47抗原結合性ドメインを含む結合剤の結合をELISAにより評価した(図9A、図9B、図9C、図9D、図22、図23)。ペムブロリズマブをPD1結合アッセイにおける陽性対照として使用した。モノクローナル抗CD47抗体(クローンB6H12)をCD47結合アッセイにおける陽性対照として使用した(Biolegend社、カタログ番号401401)。

【０９３３】

簡潔に言うと、組換えタンパク質を96ウェルプレートにコートした。プレートは蓋をして、4℃で終夜置いた。次の日、プレートをPBSで1回洗浄し、室温で1時間、ブロッキング緩衝液でブロックした。結合剤を、指定した濃度で試験し、ブロッキング緩衝液で希釈し、37℃で1時間インキュベートした。インキュベーション後に、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。プレートを、1:5000に希釈された抗ヒトFc-HRP (Sigma-Aldrich社、カタログ番号AP113P)と室温で1時間インキュベートし、次にPBS-T洗浄緩衝液で3回洗浄した。SuperSignal(商標) ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (Thermofisher社、カタログ番号37069)を用いてシグナルを発生させた。プレートは、SpectraMax(商標)i3x Multi-Mode Microplate Reader(Molecular Devices社)でリードした。

【０９３４】

図9Aに示されるように、抗PD1結合剤KC009は、ヒト、カニクイザル、及びラット組換えPD1タンパク質に効率的に結合する。KC009の異種間結合活性は、KC009のための毒性モデルとしてカニクイザル及びラットを使用する実現可能性を含意する。

【０９３５】

KC036の結合をペムブロリズマブと比較した。KC036及びペムブロリズマブの両方を、500nMから開始して1/5に希釈した。図9Bに示されるように、KC036は、ELISAによりペムブロリズマブと同様に結合する。陰性対照KC036はPD-1組換えタンパク質に結合しなかった。

【０９３６】

KC015の結合を抗CD47抗体B6H12 (ThermoFisher社、カタログ番号14-0479-82)と比較した。KC015及びB6H12抗体の両方を、50nMから開始して1/5に希釈した。図9Cに示されるように、KC015は、ELISAによりクローンB6H12よりも高い結合親和性を示した。陰性対照KC016はCD47組換えタンパク質に結合しなかった。

【０９３７】

図9C及び図9Dに示されるように、抗CD47結合剤はヒト及びカニクイザルCD47組換えタンパク質に効率的に結合する一方、陰性対照はCD47組換えタンパク質の両方への結合を示さなかった。

【０９３８】

フローサイトメトリーによる結合剤の血液細胞結合

様々な血液細胞サブタイプに関するKC015の結合活性を評価するために、新鮮な血液を2人の健常ドナーからBecton Dicinson Vacutainerに収集した。白色細胞調製のために、10mLの1X赤血球細胞溶解緩衝液(eBiosceince社、00-4300-54)を各々の1mLの新鮮な血液に加え、RTで15分間インキュベートした。細胞懸濁液を次に、300gで5分間、室温で遠心分離し、続いてPBMC培地(RPMI + 10%熱不活化FBS)を用いて更に1回洗浄した。結合剤での染色の前に白血球数をカウントした。

【０９３９】

赤血球細胞(RBC)の調製及び染色のために、新鮮な血液を15mLのコニカルボトムポリプロピレンチューブに移し、PBS洗浄緩衝液(PBS + 2%熱不活化FBS)と混合した。チューブを中断と共に800gで10分間、室温で遠心分離した。赤血球細胞をチューブの底から収集し、PBS洗浄緩衝液(PBS + 2%熱不活化FBS)に再懸濁し、結合剤での染色の前に細胞数をカウントした。

【０９４０】
血小板細胞調製のために、新鮮な血液を15mLのコニカルボトムポリプロピレンチューブに移し、PBS洗浄緩衝液(PBS + 2%熱不活化FBS)と混合した。チューブを中断と共に800gで10分間、室温で遠心分離した。血小板に富んだ血漿をチューブの上部(血漿体積の2/3)から収集した。血小板に富んだ血漿を9mLのPBS洗浄緩衝液に移し、中断と共に1250gで15分間、室温で遠心分離した。血小板細胞数を結合剤での染色の前にカウントした。
【０９４１】
Fc受容体遮断抗体を細胞懸濁液に1/100の希釈で加え、氷上で10分間インキュベートした。一次結合剤を細胞懸濁液に連続抗体濃度で加え、氷上で30分間インキュベートした。二次検出抗体での染色の前に細胞をPBS洗浄緩衝液で1回洗浄した。T細胞もまたCD3マーカー抗体(Biolegend社、557705)で染色した。単球をCD14抗体(Biolegend社、301814)で染色した。顆粒球集団をFSC及びSSCに基づいてゲーティングした。赤血球細胞をCD235ab抗体(Biolegend社、306620)で染色した。血小板をCD41抗体(Biolegend社、303704)で染色した。サイトメーターFACSCantoIIによる解析の前に全ての細胞を1/100の希釈を伴う7-AAD (BD社、559925)で染色した。
【０９４２】
図9Eに示されるように、KC015は、ヒトT細胞に効率的に結合するが、RBC及び血小板に対してはより低い効率である。
【０９４３】
細胞のFACS結合アッセイ
細胞への結合剤の結合をフローサイトメトリーにより評価した。抗PD-1抗原結合性ドメインを含む結合剤の結合特異性を決定するために、CHO親及びCHO-PD-1細胞株を結合アッセイにおいて使用した(図10)。簡潔に述べれば、1×10^5個の細胞をFc受容体遮断抗体(1/100の希釈、Cedarlane社、カタログ番号422302)と室温で10分間インキュベートした。抗PD-1抗原結合性ドメインを含む結合剤をFACS染色緩衝液に20μg/mLまで希釈して加え、細胞と氷上で30分間インキュベートした。PD-1抗体(クローンEH12.2H7、Biolegend社)を陽性対照として使用した。FACS染色緩衝液での3回の洗浄後に、ヒトFc領域を認識するAPCコンジュゲート二次抗体(Cedarlane社、カタログ番号409306)を細胞と混合した。30分間の染色後に、細胞を3回洗浄し、続いて100μlの7-アミノ-アクチノマイシンD(7-AAD)溶液(1/500の希釈、BD Bioscience社、カタログ番号559925)に再懸濁した。細胞をBD FACSCanto(商標) II Flow cytometer (BD Bioscience社)により解析した。単一細胞及び生細胞に関するゲーティングを介してFlowJoを用いてデータを解析した。
【０９４４】
図10に示されるように、KC036はCHO-PD1細胞にのみ結合し、非PD1発現細胞(CHO親細胞)に結合せず、抗PD-1モジュールKC009の高い特異性を立証した。
【０９４５】
PBMC媒介性細胞傷害性アッセイ
PBMC媒介性細胞傷害性をフローサイトメトリーにより評価した。簡潔に述べれば、腫瘍細胞(THP-1又はOCI-AML3)をCellTrace violetを用いて37℃で10分間染色した。細胞を洗浄し、ヒトPBMC (Cedarlane社、カタログ番号70025.1)と5:1の比で混合した。抗CD3抗体又はCD33二特異性T細胞エンゲージャー(BiTE、G&P Bioscience社、カタログ番号FLC2032)を加えてT細胞を活性化させた。結合剤を、対応するウェルに指し示される濃度で加えて、細胞傷害性に対する抗PD-1モジュールの効果を決定した。48又は72時間のインキュベーションの後に、細胞を3回洗浄し、続いて100μlの7-AAD溶液(1/100の希釈、BD Bioscience社、カタログ番号559925)に再懸濁した。細胞をBD FACSCanto(商標) II Flow cytometer (BD Bioscience社)により解析した。単一細胞及び生細胞のみに関するゲーティングによりFlowJoを用いてデータを解析した。

【０９４６】
図11に示されるように、KC036(配列番号94)は、陽性対照ペムブロリズマブ及びニボルマブと類似したレベルまで、T細胞依存性細胞傷害性を増加させることによりチェックポイント阻害(CPI)活性を示した。
【０９４７】
PD-1/PD-L1遮断バイオアッセイ
発光性NFAT-REレポーターシステム内でのPD-1/PD-L1遮断アッセイ(Promega社、カタログ番号J1255)を使用して抗PD-1抗原結合性ドメインを含む結合剤の遮断活性を評価し、陽性対照と比較した。PD-L1 aAPC/CHO-K1(標的)細胞を解凍し、96ウェルプレートに推奨される密度で播種し、プレートに終夜接着させた。翌日、結合剤をアッセイ緩衝液(10%低IgG FBSを含むHam’s F12培地)中で350nMに希釈し、8回の2.5×段階希釈を行った。96ウェルプレートからの培地はデカントし、40μlの希釈した結合剤及び40μlのJurkat(エフェクター)細胞をプレートに添加した。プレートは、37℃で6時間インキュベートした。Bio-Gloルシフェラーゼアッセイ緩衝液及び基質を合わせ、80μlの溶液を各ウェルに移した。プレートは室温で5分間インキュベートし、発光はプレートリーダーを使用して測定した。
【０９４８】
これらの実験の結果は、KC036はペムブロリズマブと類似したin vitro CPI活性を達成したことを示し、結合剤は、「疲弊した」T細胞においてT細胞機能を回復させることにより抗腫瘍活性を誘導できることを示唆した(図12)。
【０９４９】
KC036の抗PD1抗原結合性ドメインは、Table 4(表5)に列記される他の抗PD-1抗原結合性ドメインに、本明細書に記載されるものと類似した方式で置換される。
【０９５０】
(実施例5)
抗CD47抗原結合性ドメインを含む結合剤のin vitro及びin vivo試験
抗D2及び抗CD47抗原結合性ドメイン(KC040)又は抗D2、抗PD-1及び抗CD47抗原結合性ドメイン(配列番号70)を含む結合剤を、HEK293T若しくはHEK293T-CD47KO細胞(CD47ノックアウト)(図13)又は初代ヒトT細胞(PBMC、StemCell社)(図14)における結合について試験した。
【０９５１】
図13に示されるように、抗CD47モジュールを含む結合剤は、親HEK293T細胞に結合し、CD47ノックアウト細胞(HEK293T-CD47KO)には結合しない。
【０９５２】
図14に示されるように、抗CD47モジュールを含む結合剤は初代ヒトT細胞に結合する。
【０９５３】
T細胞活性化アッセイ
ポリクローナルT細胞活性化を誘導する、抗CD47モジュールを含む結合剤の能力を、コンカナバリンA (ConA、Cedarlane社、14951-250)の存在下(図16)又は非存在下で行った(図15A)。簡潔に述べれば、PBMCを、指し示される濃度の結合剤と、10μg/mL ConAの存在下又は非存在下で24時間インキュベートした。プレートを遠心沈降にかけ、細胞をFc受容体遮断抗体(Biolegend社、1/200の希釈)と氷上で10分間インキュベートした。プレートを再び遠心沈降にかけ、細胞をAPCコンジュゲート抗CD3 (Cedarlane社、カタログ番号300312)及びFITCコンジュゲート抗CD69抗体(Biolegend社、カタログ番号310904、1/500の希釈)を用いて氷上で30分間染色した。細胞を3回洗浄し、続いて100μlの7-AAD溶液(BD Bioscience社、1/100の希釈)に再懸濁した。細胞をBD FACSCanto(商標) II Flow cytometer (BD Bioscience社)により解析した。単一細胞及び生細胞のみに関するゲーティングによりFlowJoを用いてデータを解析した。

【０９５４】
PBMC媒介性細胞傷害性アッセイ
PBMC媒介性細胞傷害性をフローサイトメトリーにより評価した(図15B)。簡潔に述べれば、腫瘍細胞(THP-1又はOCI-AML3)を、CellTrace violetを用いて37℃で10分間染色した。細胞を洗浄し、PBMCと5:1の比で混合した。抗CD3抗体又はCD33二特異性T細胞エンゲージャー(BiTE、G&P Bioscience社、カタログ番号FLC2032)を加えてT細胞を活性化させた。結合剤を、対応するウェルに指し示される濃度で加えて、細胞傷害性に対するCD47の効果を決定した。48又は72時間のインキュベーションの後に、細胞を3回洗浄し、続いて100μlの7-AAD溶液(1/100の希釈、BD Bioscience社、カタログ番号559925)に再懸濁した。細胞をBD FACSCanto(商標) II Flow cytometer (BD Bioscience社)により解析した。単一細胞及び生細胞のみに関するゲーティングによりFlowJoを用いてデータを解析した。
【０９５５】
図15に示されるように、抗CD47モジュールを含む結合剤は、T細胞を活性化させず(図15A)、THP-1腫瘍細胞に対するT細胞依存性細胞傷害性を媒介しなかった(図15B)。結合剤はHEK293T及び初代T細胞に対する結合を示したが、in vitroでT細胞を活性化させず、これは、T細胞を活性化させずに免疫細胞再方向付けのためのより良好な安全性を結果としてもたらしうる。
【０９５６】
図16に示されるように、コンカナバリンA媒介性T細胞活性化は、抗CD47モジュールを含む結合剤により影響されない。スーパー抗原であるコンカナバリンAは、TCR-MHC複合体を通じたT細胞活性化に繋がる。これらの結果は、抗CD47モジュールは、TCR-MHC複合体を通じて誘導されるT細胞活性化に干渉しなかったことを示唆する。
【０９５７】
CD47/SIRPα遮断バイオアッセイ
発光性レポーターシステムにおけるCD47/SIRPα遮断アッセイを使用して、抗CD47抗原結合性ドメインを含む結合剤の遮断活性を評価し、陽性対照としてのB6H12抗体(Promega社、カタログ番号CS316013)と比較した。CD47 CHO-K1標的細胞を解凍し、10% FBSを含有するHam F12培地に再懸濁した。細胞懸濁液を96ウェルプレートのウェル当たり100μLのCD47 CHO-K1細胞で分注し、37℃、5% CO_2で終夜インキュベートした。翌日、試験分子の1.5x段階希釈液をアッセイ緩衝液(2% FBSを含有するRMPI-1640培地)中に調製した。細胞培地を除去し、50μLの段階希釈された抗体を対応するウェルに加えた。SIRPαエフェクター細胞を解凍し、アッセイ緩衝液に再懸濁した。細胞懸濁液をウェル当たり75μLのSIRPαの細胞懸濁液で分注した。プレートを37℃、5% CO_2で4時間インキュベートした。4時間のインキュベーションの終わりに、ウェル当たり75μLのBio-Glo-NL Luciferase Assay Reagentを加え、5～10分後にSpectra Max ix3 Plate Readerを使用して発光を測定した。
【０９５８】
図17に示されるように、KC015(配列番号75)は、CD47とSIRPαとの間の相互作用を遮断することによりチェックポイント阻害(CPI)活性を呈した。陰性対照(KC016:配列番号76)はいかなるCPI活性も示さなかった。
【０９５９】
(実施例6)
抗DR2、PD-1及びCD47抗原結合性ドメインを含む結合剤のin vitro及びin vivo試験
NCGマウスにおける確立された腫瘍モデル
多価及び多特異性結合剤の抗腫瘍有効性を決定するために、ヒト化NCGマウスにおける確立された腫瘍モデルを研究において使用した(図18、図22)。簡潔に述べれば、NCGマウス(5～6週齢、雌)はCharles River Laboratories社(St. Constant、QC)から購入した。DPBS中の腫瘍細胞(NCI-H82について800万細胞/マウス)をマウスの右脇腹の皮下(s.c.)に注射した。腫瘍が100mm^{3}まで成長してから、マウスを実験群(10又は9

マウス/群)に無作為に分けた。ヒトPBMC(1000万個の細胞)を静脈内(i.v.)に注射した。翌日、各々の群のマウスに週2回、計8用量で腹腔内(i.p.)により結合剤(28mg/kg)処置を与えた。ノギスを使用して腫瘍体積を測定し、マウスを週に2回計量した。腫瘍体積及び腫瘍増殖阻害を上記と同様に算出した(方法セクションにおける「CB-17 Fox Chase SCIDマウスにおける腫瘍予防腫瘍モデル」)。統計的検定をスチューデントt検定(両側)により行った。

【０９６０】

図18に示されるように、抗D2、抗PD-1及び抗CD47抗原結合性ドメインを含む結合剤は52%のTGIを示した。結果は、三特異性結合剤はin vivoで腫瘍成長を抑制できることを含意した。本明細書に開示される抗CD47抗原結合性ドメインを含む結合剤は、免疫細胞再方向付けのために他の活性化抗体よりも良好な安全性を提供することが予想される。

【０９６１】

in vitro T細胞動員アッセイ

腫瘍抗原(D2)及びT細胞を標的化する結合剤がT細胞を動員し、T細胞を腫瘍細胞とブリッジし得るかどうかを試験するために、T細胞を結合剤の存在下でNCI-H69細胞クラスターと共培養した。

【０９６２】

簡潔に述べれば、抗D2、抗PD1及び/又は抗CD47モジュール、並びにこのモジュールの組合せのバリエーションを含有する様々な結合剤について、NCI-H69 SCLC細胞クラスターへのT細胞動員のレベルを定量化した(図19)。懸濁NCI-H69細胞を収集し、12ウェルプレートに移し、37℃、5% CO_2のインキュベーターに72時間戻して、より大きい細胞クラスターを成長させた。72時間後に、5.0×10^5個のPBMC及び結合剤(25μg/mLの最終濃度)をNCI-H69細胞に加えた。プレートを37℃、5% CO_2のインキュベーターに24時間戻して、NCI-H69細胞クラスターにT細胞を動員させた。

【０９６３】

24時間後に、各々のウェルからの培地を微量遠心チューブに移し、各々のチューブを、5秒パルススピンのためにベンチトップミニ遠心分離機を使用して短く遠心分離した。上清を分離し、ペレットを150μLのフロー緩衝液(5mM EDTAを含むPBS)に再懸濁した。大細胞クラスターの効率的な分離を確実にするために明視野顕微鏡を使用してペレット及び上清画分を評価した。微量遠心チューブからの再懸濁されたペレットを96ウェルプレートに移した。プレートを1200RPMで遠心分離にかけて細胞をペレット化させ、プレートを反転して上清を除去し、Human TruStain FcX Block (BD Bioscience社、カタログ番号559925)をウェル当たりフロー緩衝液100μL当たり2μLで加え、氷上で10分間インキュベートした。プレートを1200RPMで遠心分離にかけて細胞をペレット化させ、別々のウェル中の適切なアイソタイプ対照を含めて、APCコンジュゲート抗ヒトCD3 (Cedarlane社、カタログ番号300312)及びFITCコンジュゲート抗ヒトCD69抗体(Cedarlane社、カタログ番号310904)をウェル当たりフロー緩衝液100μL当たり各0.5μLで加えた。蛍光コンジュゲート抗体の添加後に、プレートに蓋をし、氷上で30分間インキュベートした。インキュベーション期間の後に、プレートを1200RPMで遠心分離にかけて細胞をペレット化させ、150μlのフロー緩衝液で洗浄した。プレートを1200RPMで遠心分離にかけて細胞をペレット化させ、ウェル当たりフロー緩衝液100μL当たり1.0μLの7-AADを含有する7-AAD溶液に再懸濁した。

【０９６４】

細胞集団をフローサイトメトリーにより解析した。未加工リードをBD FACSCanto II機器上で収集した。全部で100,000個の事象をデータ解析のために収集した。全生細胞集団を、7-AAD陰性細胞(PerCP-Cy5.5)についてのゲーティングにより評価した。全T細胞集団を、CD3陽性細胞(APC)についてのゲーティングにより評価し、活性化T細胞集団を、二重CD3 (APC)及びCD69 (FITC)陽性細胞についてのゲーティングにより評価した。CD3 (APC)及びCD69 (FITC)の平均蛍光強度(MFI)を定量化し、処理群の間で

比較した。この報告に記載される全ての試料は3連で試験された。結果は平均+/-標準偏差を表した。

【０９６５】

図19に示されるように、結合剤はin vitroでT細胞をNCI-H69細胞クラスターに有効に動員することが見出された。

【０９６６】

CB-17 Fox Chase SCIDマウスにおける腫瘍予防腫瘍モデル

抗D2モジュールを含む結合剤を、実施例3に記載されるように腫瘍予防モデルにおいて試験した。

【０９６７】

簡潔に述べれば、ヒトPBMC及びNCI-H82細胞を1:5の比で共移植したことを除いて、NCGマウスにおける同様にNCI-H82細胞を接種した腫瘍予防モデルにおいて、結合剤(KC020;配列番号77、KC022;配列番号79、KC023;配列番号80、KC024;配列番号81、KC025;配列番号82、KC026;配列番号83)を試験した(図20A～B及び図24C)。

【０９６８】

図20Bに示されるように、KC001、KC009及びKC010(配列番号77)を含有する結合剤は、KC009及びKC010を有する他のD2モジュールと比較して74%の最良の有効性を示した(図20A&B)。KC001有効性データの優位性はまた、VHH-ヒンジ-CH2-CH3としてのD2有効性データと合致し(図20)、該データにおいて、KC001(KC013;配列番号73)は、NCI-H69、NCI-H510A、及びNCI-H727を含むいくつかの腫瘍モデルにおいて最良の有効性を示した。

【０９６９】

PBMC予備移植モデルにおけるKC015のin vivo有効性

PBMC予備移植NCI-H82異種移植片腫瘍モデルを使用してNCGマウスにおいてKC015の抗腫瘍活性を評価した(図21A)。KC020の抗腫瘍活性もまた、PBMC予備移植NCI-H69、RKO、及びSCLC-21H異種移植片腫瘍モデルにおいて研究した(図21B)。簡潔に述べれば、NCGマウス(5～6週齢、雌)はCharles River Laboratories社(St. Constant、QC)から購入した。1000万個のPBMCを腫瘍細胞移植の3日前にNCGマウスに移植した。処置をPBMC移植の10日後に開始し、週当たり2回で全部で8用量とした。研究において使用された陰性対照はPBSであった。式:1/2(長さ×幅^2)を使用して腫瘍体積を算出した。腫瘍増殖阻害(TGI)パーセンテージの算出のために、処置群をそのそれぞれの陰性対照と比較した。本明細書に記載されるようにTGIを算出した。統計的検定をスチューデントt検定(両側)により行った。

【０９７０】

研究の終わりに、動物を　　殺し、腫瘍及び肝臓を転移解析のために収集した。

【０９７１】

これらの実験の結果は、KC015(配列番号75)はPBMC予備移植モデルにおいてNCI-H82腫瘍成長を抑制することを示した。KC020(配列番号77)は、がんのヒトPBMC予備移植モデルにおいてNCI-H69、RKO及びSCLC-21H異種移植片腫瘍の成長を抑制した。

【０９７２】

SCIDマウスにおける確立された腫瘍モデルにおけるKC015のin vivo有効性

KC015結合剤の抗腫瘍有効性をSCIDマウスにおける確立されたMDA-MB-231腫瘍モデルにおいて評価した(図21C)。PBS中の腫瘍細胞(500万細胞/マウス)をSCIDマウス(5～6週齢、雌; Charles River Laboratories社(St. Constant、QC))の右脇腹の皮下(s.c.)に注射した。腫瘍が100mm^{3}まで成長してから、マウスを実験群(9匹のマウス/群)に無作為に分けた。翌日、各々の群のマウスに週1回、全部で8用量で腹腔内(i.p.)により結合剤(8mg/kg)処置を与えた。ノギスを使用して腫瘍体積を測定し、マウスを週に2回計量した。腫瘍体積及び腫瘍増殖阻害を上記と同様に算出した。統計的検定をスチューデントt検定(両側)により行った。

【０９７３】

図21Cに示されるように、確立されたMDA-MB-231腫瘍モデルはKC015を用いた処置で成長せず、この腫瘍モデルにおいて強力な抗腫瘍活性を指し示した。

【０９７４】

IgG4バージョンとIgG1バージョンとを対比した結合剤のin vivo有効性

IgG4は、この場合にT細胞殺傷に繋がりうるADCC効果、及びサイトカイン放出ストームを回避するための治療抗体のために一般的に使用される。IgG4 CH3ドメインを含む結合剤の抗腫瘍有効性を決定するために、ヒト化されたNCGマウスにおける確立された腫瘍モデルを上記のように使用した。

【０９７５】

図22に示されるように、結合剤のIgG4バージョンとIgG1バージョンとの間で有意差は観察されなかった(KC021(配列番号78)及びKC027:配列番号85を比較されたい)。

【０９７６】

腫瘍保有マウスモデルにおける結合剤体内分布のMicro-PET/CTイメージング

結合剤の放射性標識及びその体内分布のマイクロPET/CTイメージングを行った(図23)。Amicon(登録商標) Ultra-4 Centrifugal Filter (MWCO 30kDa、UFC803008)を使用して、結合剤の調製物を最初に0.1M 炭酸ナトリウム(pH 9.0)を用いて緩衝液交換した。結合剤を次に、14倍モル過剰のp-イソチオシアナトベンジルデスフェリオキサミン(p-NCS-Bz-DFO、Macrocyclics社)との反応によりデスフェリオキサミン(DFO)で修飾した。簡潔に述べれば、無水DMSO中のp-NCS-Bz-DFOの20mM (15μg/μL)溶液20～40μLを4～7mgの結合剤(0.1M NaHCO3緩衝液中3～4mg/mL、pH 9.0)と37℃で30分間、Excella E24 mixer (New Brunswick Scientific社)上で300rpmでの混合と共に反応させた。反応液を小さいアリコートに分割して抗体の架橋及び凝集を回避した。30分の反応後に、過剰なp-NCS-Bz-DFOを限外濾過により除去し、これは過剰な0.25M Na酢酸緩衝液、pH 5.5を使用して5000×gで5分間の遠心分離でAmicon Ultra-4遠心フィルターデバイス(Millipore、30kDaカットオフ)上で4回繰り返した。還元(2-メルカプトエタノール)及び非還元条件下での4～20% Tris-HClゲル(Bio-Rad社)上のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によりDFO結合剤の純度及び均質性を評価した。

【０９７７】

DFOコンジュゲーション後に、結合剤を以下のプロトコールにより^{89}Zrで放射性標識した。シュウ酸塩としての^{89}ZrをWashington University (St. Louis、MO)から購入し、2M $NaCO_3$(pH 10.0)と3分間インキュベートして溶液を中和した。次に、32mM ゲンチジン酸(5mg/mL)及び0.5Mの4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸(HEPES緩衝剤)を含有する0.25M 酢酸Na緩衝液(pH 7.0)を加え、続いてD2、PD-1及びCD47特異的抗原結合性ドメインを含む結合剤(KC020;配列番号77)(1～5.0mg/mL)を加えた。放射性標識を0.28mCi/mgの比活性で60～90分間、室温で行った。20mM Na_2CO_3中の22mM クエン酸(pH 5.0)中で展開したインスタント薄層シリカゲルクロマトグラフィー(ITLC-SG)により放射化学純度を測定した。

【０９７８】

放射性標識後に、[^{89}Zr]-DFO結合剤を、2つの異なるタイプの異種移植片(NCI-H69及びNCI-H82)を有するマウスに注射した。イソフルラン(Fresenius Kabi Canada Ltd.社)麻酔(5%で誘導、1.5～2%で維持)を使用してマウスを麻酔し、続いて[^{89}Zr]-DFO結合剤のi.v.注射を行い、200μL、2.86±0.2MBq、及び30mg/Kgを与えた。注射後24時間、96時間、及び144時間においてMediso nanoScan(登録商標) SPECT/CT/PET 82S systemを使用して動物をイメージングした。

【０９７９】

図23A及び図23Bに示されるように、放射性標識された結合剤は、NCI-H69及びNCI-H82の両方の異種移植片モデルにおいて腫瘍における蓄積を示すことが見出され、腫瘍抗原を介する結合剤の動員を示唆した。

【０９８０】

(実施例7)

hCD34+ヒト化NCGマウスモデルにおける結合剤のin vivo試験

hCD34+ヒト化NCGマウスはCharles River Laboratories社から購入した。腫瘍移植の1日前にフローサイトメトリーによりHSC生着レベルを評価した。マウスを2つの群に無作為化し、NCI-H69細胞を各々の動物の右脇腹の皮下(s.c)に移植した(動物当たり800万個の細胞)。腫瘍が平均で100mm^{3}の体積に達したら、陰性対照及び試験品をIP注射により週に2回投与した。腫瘍体積、腫瘍増殖阻害(TGI)パーセンテージ及び統計解析は実施例3に記載されるように行う。

【0981】

研究の終わりに、動物を　　殺し、腫瘍及び肝臓を転移解析のために収集した。

【0982】

図24A～Bに提示されるこれらの実験の結果は、KC020(配列番号77)はhCD34+ヒト化NCGマウスモデルにおいて肝臓へのNCI-H69細胞の転移を低減させることを示した。図24Cの結果もまたNCI-H82/PBMC共移植モデルにおけるKC020(配列番号77)の有効性を示した。

【0983】

(実施例8)

他の固形腫瘍における結合剤の試験

ヒト小細胞肺がんのNCI-H510A及びNCI-H727 s.c.予防的異種移植片モデルにおいてKC013、KC011、KC012、及びKC014を含む抗D2結合剤の抗腫瘍有効性を決定するために、雌SCIDマウスをCharle River Laboratories社から購入し、4～6週齢時に研究のために使用した。NCI-H510a細胞について、細胞を各々の動物の右脇腹の皮下(s.c)に、マウス当たり800万個の細胞で移植した。NCI-H727細胞について、細胞を各々の動物の右脇腹の皮下(s.c)に、マウス当たり100万及び600万個の細胞で移植した。翌日、ビヒクル対照及び試験品をi.p注射により週に1回投与した。腫瘍体積、腫瘍増殖阻害(TGI)パーセンテージ及び統計解析は実施例3に記載されるように行う。

【0984】

ヒト膵臓がんのPANC1 s.c.予防的異種移植片モデルにおいて抗D2結合剤の有効性を評価するために、雌SCIDマウスをCharles River Laboratories社から購入し、4～6週齢時に研究のために使用した。細胞を各々の動物の右脇腹の皮下(s.c.)に、各々500万個で移植した。処置を細胞移植の1日後に開始した。陰性対照抗体及び試験品をi.p.注射により週に1回投与した。腫瘍体積、腫瘍増殖阻害(TGI)パーセンテージ及び統計解析は実施例3に記載されるように行う。

【0985】

(実施例9)

安定性研究

20mg/mL(+/-0.5)の濃度の精製された結合剤の溶液を調製し、2つのバッチに分けた。1つのバッチを-80℃(ストレス負荷条件ではない)で貯蔵し、他のバッチを、3日間の撹拌(25℃)、5サイクルの凍結及び解凍、40℃で2週間の貯蔵、又は4時間及び48時間の低pH(3.5)処理を含む様々なストレス条件に供した。両方のバッチを、実施例3及び4に記載されるようにD2含有プロテオリポソーム(図25A及び図26A)、組換えPD-1 (Cedarlane社、カタログ番号10377-H08H-50)(図25B及び図26B)又は組換えCD47 (Cedarlane社、カタログ番号12283-H08H-200)(図25C及び図26C)への結合について試験した。

【0986】

図25及び図26に提示される結果は、KC020のその標的への結合は試験されたストレス条件により影響されないことを指し示す。

【0987】

追加的に、溶液の生物物理学的特徴(溶解性及び凝集)はこれらの条件下で有意に変化しなかった。

【０９８８】
類似した結果がいくつかの他の結合剤について得られた(データ示さず)。
【０９８９】
(実施例10)
SCLCのNCI-H82尾静脈転移モデルにおける結合剤の試験
NCGマウス(5～6週齢、雌)はCharles River Laboratories社(St. Constant、QC)から購入した。NCGマウスに50,000個のNCI-H82細胞を尾静脈注射を通じて接種した。マウスに腫瘍細胞注射の24時間前に腹腔内注射によりKC020処置を与えた。KC020を隔週で全部で8用量にわたり投与した。動物を研究の全持続期間にわたり体重損失及び全般的健康状態についてモニターした。全体的に、KC020処置は、ビヒクル処置された陰性対照群と比較して、NCI-H82 SCLCをi.v.で移植されたマウスにおいて生存を有意に長期化させた(図27)。
【０９９０】
in vivo生物発光イメージング研究のために、全部で20匹のNCGマウスを、PBS群、KC020 3mg/kg群、KC020 10mg/kg群及びKC020 30mg/kg群を含む4つの群に無作為に割り当てた。0日目に、全てのマウスにKC020又はPBSの1処置を与えた。KC020 3mg/kg群について、マウスにKC020処置の1日前に10mg/kgのヒトIgGの1処置を与えた。NCI-H82-ルシフェラーゼ細胞をNCGマウスに尾静脈注射を通じて、マウス当たり100,000個の細胞で接種した。全てのマウスをPBS又はKC020のいずれかを用いて、全部で8用量にわたり週に2回処置した。生物発光イメージングを腫瘍細胞接種の3週後に週に1回行った。イメージングの前に、マウスにDPBS中の15mg/mLのホタルルシフェラーゼ基質を、200μLの投与体積で腹腔内注射を通じて投薬した。この実験の結果は、KC020処置は、3mg/kgの最小用量を含む試験された全ての用量においても腫瘍発生を予防したことを示す。
【０９９１】
本明細書に提示される結果は、特に、本開示の結合剤は、その標的の各々に結合し、in vitro CPI活性を呈し、ヒトがんの予防的な異種移植片モデル及び確立された異種移植片モデルの両方においてin vivo腫瘍抑制有効性を示し、転移発生を予防し、ヒトがんの尾静脈モデルにおいてマウス生存を延長させることを指し示す。追加的に、本開示の結合剤は、生産性細胞株において非常に高い収率で製造され、加速安定性試験下で好都合な安定性を呈する。
【０９９２】
本明細書に記載される実施形態及び実施例は例示であり、請求項の範囲を制限することを意味しない。代替え物、改変物及び均等物を含む前述の実施形態のバリエーションが、請求項によって包含されることを本発明者らは意図する。本出願の引用リストは、参照によって本明細書に組み込まれる。
【０９９３】
参考文献
本出願の全体を通じて参照される全ての特許、特許出願及び刊行物は、参照により本明細書に組み込まれる。
【０９９４】
Angal, S. et al., A Single Amino Acid Substitution Abolishes the Heterogeneity of Chimeric Mouse/human IgG4 Antibody, Mol Immunol 30, 105-108, 1993
Chen X et al., Fusion Protein Linkers: Properties, Design and Functionality, Adv Drug Deliv Rev. 2013; 65(10):1357-1369.
Conrath, K.E. et al., Camel Single-Domain Antibodies as Modular Building Units in Bispecific and Bivalent Antibody Constructs. J. Biol. Chem. 2001, 276, 7346-7350.
Coppieters, K. et al., Formatted Anti-Tumor Necrosis Factor alpha VHH

Proteins Derived from Camelids Show Superior Potency and Targeting to Inflamed Joints in a Murine Model of Collagen-induced Arthritis. Arthritis Rheum. 2006, 54, 1856-1866.
Detallea L, et al., Generation and Characterisation of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 60(1) 2015
De Vlieger et al., Single-domain Antibodies and their Formatting to Combat Viral Infections, Antibodies 8(1), 1-22, 2019
Duggan S. Caplacizumab: First Global Approval. Drugs (2018) 78:1639-1642
Fleischmann R, et al., A Novel Individualized Treatment Approach in Open-Label Extension Study of Ozoralizumab (ATN-103) in Subjects with Rheumatoid Arthritis on a Background of Methotrexate. Abstract 1311, ACR/ARHP Annual Meeting (2012).
Fridy PC, et al., A Robust Pipeline for Rapid Production of Versatile Nanobody Repertoires. Nat Methods. 2014 December; 11(12): 1253-1260.
Godar M et al. Therapeutic Bispecific Antibody Formats: a Patent Applications Review (1994-2017) Expert Opinion on Therapeutic patents, 2018; 28(3):251-276
Ha, J-H et al. Immunoglobulin Fc Heterodimer Platform Technology: From Design to Applications in Therapeutic Antibodies and Proteins, Front Immunol, 2016; 7:394.
Hamers-Casterman C, et al., Naturally-occurring Antibodies Devoid of Light-chains. Nature 1993, 363:446-448.
Hmila, I. et al., VHH, Bivalent Domains and Chimeric Heavy Chain-only Antibodies with High Neutralizing Efficacy for Scorpion Toxin AahI'. Mol. Immunol. 2008, 45, 3847-3856.
Hultberg, A et al., Llama-derived Single Domain Antibodies to Build Multivalent, Super Potent and Broadened Neutralizing Anti-viral Molecules. PLoS One 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0017665.
Jahnichen S, et al, CXCR4 Nanobodies (VHH-based single variable domains) Potently Inhibit Chemotaxis and HIV-1 Replication and Mobilize Stem Cells. Proc Natl Acad Sci USA. (2010) 107: 20565-20570.
Kovalenko OV et al. Atypical Antigen Recognition Mode of a Shark Immunoglobulin New Antigen Receptor (IgNAR) Variable Domain Characterized by Humanization and Structural Analysis, J Biol Chem. 2013, 288:17408-17419
Muyldermans,S and Smider, 2016. Distinct Antibody Species: Structural Differences Creating Therapeutic Opportunities. Current Opinion in Immunology 2016, 40:7-13
Muyldermans, S et al., 1994. Sequence and Structure of VH Domain From Naturally Occurring Camel Heavy Chain Immunoglobulins Lacking Light Chains. Protein Eng. 7: 1129-1135.
Saunders K.O., Conceptual Approach to Modulating Antibody Effector Functions and Circuation Half-Life, Front. Immunol. 10:1296, 2019.
Schoen P, et al., Anti-RANKL Nanobody (登録商標) ALX-0141 Shows Sustained Biomarker Inhibition in a Phase I Study in Healthy Postmenopausal Women. DOI: 10.1530/boneabs.1.PP135 (2013)
Simmons, D.P et al., Dimerisation Strategies for Shark IgNAR Single Domain Antibody Fragments. J. Immunol. Methods 2006, 315, 171-184.

Svecova D, et al., A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 1 Study of Multiple Ascending Doses of Subcutaneous M1095, an Anti-Interleukin-17A/F Nanobody（登録商標）, in Moderate-to-Severe Psoriasis. J Am Acad Dermatol. 2019 Mar 26.
Tatusova, T. A, et al. (1999), BLAST 2 Sequences, a New Tool for Comparing Protein and Nucleotide Sequences, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250)
Van Roy M, et al., The Preclinical Pharmacology of the High Affinity Anti-IL-6R Nanobody（登録商標） ALX-0061 Supports its Clinical Development in Rheumatoid Arthritis. Arthritis Research & Therapy (2015) 17:135
Vincke C. et al. General Strategy to Humanize a Camelid Single-Domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold, J.Biol Chem. 2009, 284(5):3273-3284
Vu, K. B., et al., 1997. Comparison of Llama VH Sequences from Conventional and Heavy Chain Antibodies. Mol. Immunol. 34: 1121-1131.

【０９９５】

配列表

【０９９６】

【表４－１】

Table 3- 抗D2 VHHの配列

抗DR2 VHH	CDR1	CDR2	CDR3
KC001 (Kabat CDR)	ITAMN (配列番号1)	GISSSGKITYQDSVKG (配列番号2)	WAGARDAI (配列番号3)
KC001 (IMGT CDR)	EIIFSITA (配列番号4)	ISSSGKI (配列番号5)	NTWAGARDAI (配列番号6)
KC001 (VHH) (配列番号7)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASEIIFSITAMNWYRQAPGKQRELVAGISSSGKITYQDSVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNTWAGARDAIWGQGTQVTVSS		
KC002 (Kabat CDR)	NKDMG (配列番号8)	AIAKNNGSTYYADSVKG (配列番号9)	LTHRGASKFNY (配列番号10)
KC002 (IMGT CDR)	GDRITNKD (配列番号11)	IAKNNGST (配列番号12)	AGLTHRGASKFNY (配列番号13)
KC002 (VHH) (配列番号14)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDRITNKDMGWVRQAPGKGLEWVSAIAKNNGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGLTHRGASKFNYWGQGTLVTVSS		
KC003 (Kabat CDR)	RHAMS (配列番号15)	DIRSGDGGDGGTSYADSVKG (配列番号16)	GLWKILPST (配列番号17)
KC003 (IMGT CDR)	GFTFSRHA (配列番号18)	IRSGDGGDGGT (配列番号19)	ALGLWKILPST (配列番号20)
KC003 (VHH) (配列番号21)	QVQLQESGGGLAPPGGSLRLSCAASGFTFSRHAMSWVRQAPGKGLEWVSDIRSGDGGDGGTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCALGLWKILPSTRGRGTQVTVSS		

【０９９７】

【表４－２】

抗DR2 VHH	CDR1	CDR2	CDR3
KC004 (Kabat CDR)	QRAMS (配列番号22)	DIKSTGETSYADSVKG (配列番号23)	GLWKILPSV (配列番号24)
KC004 (IMGT CDR)	GLTFSQRA (配列番号25)	IKSTGET (配列番号26)	ALGLWKILPSV (配列番号27)
KC004 (VHH) (配列番号28)	QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGLTFSQRAMSWVRQAPGKGLEWISDIKSTGETSYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCALGLWKILPSVRGRGTQVTVSS		
KC005 (Kabat CDR)	LRSMG (配列番号29)	VITSSAASTNYADSVKG (配列番号30)	RGASRWYGTPSDY (配列番号31)
KC005 (IMGT CDR)	GSSLSLRS (配列番号32)	ITSSAAST (配列番号33)	NFRGASRWYGTPSDY (配列番号34)
KC005 (VHH) (配列番号35)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSLSLRSMGWYRQGPGKMRELVAVITSSAASTNYADSVKGRFTISFDNAKNTMYLQMNSLTPEDTAVYYCNFRGASRWYGTPSDYWGQGTQVTVSS		
KC006 (Kabat CDR)	LRSMG (配列番号36)	VITSSAASTNYADSVKG (配列番号37)	RGASRWYGTPSDY (配列番号38)
KC006 (IMGT CDR)	GSSLSLRS (配列番号39)	ITSSAAST (配列番号40)	NFRGASRWYGTPSDY (配列番号41)
KC006 (VHH) (配列番号42)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSLSLRSMGWYRQGPGKMRELVAVITSSAASTNYADSVKGRFTISFDNAKNTMYLQMNSLTPEDTAVYYCNFRGASRWYGTPSDYWGQGTQVTVSS		

【０９９８】

【表４－３】

抗DR2 VHH	CDR1	CDR2	CDR3
KC007 (Kabat CDR)	QRAMS (配列番号43)	DIRSTGDTSYADSVKG (配列番号44)	GLWKILPSA (配列番号45)
KC007 (IMGT CDR)	GFAFSQRA (配列番号46)	IRSTGDT (配列番号47)	ALGLWKILPSA (配列番号48)
KC007 (VHH) (配列番号49)	QVQLQESGGGLVQPGGSLLLSCAASGFAFSQRAMSWVRQAPGKGLEWVSDIRSTGDTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCALGLWKILPSARGRGTQVTVSS		
KC008 (Kabat CDR)	QRAMS (配列番号50)	DIRSTGDTSYADSVKG (配列番号51)	GLWKILPSA (配列番号52)
AKC008 (IMGT CDR)	GFTFSQRA (配列番号53)	IRSTGDT (配列番号54)	ALGLWKILPSA (配列番号55)
KC008 (VHH) (配列番号56)	QVQLQESGGGLVQPGGSLLLSCAASGFTFSQRAMSWVRQAPGKGLEWVSDIRSTGDTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCALGLWKILPSARGRGTQVTVSS		

【０９９９】

【表５】

Table 4- 抗PD-1 VHH

抗PD-1 VHH	CDR1	CDR2	CDR3
KC009 (Kabat CDR)	RSSMS (配列番号57)	IISSSGIITHYSDSVKG (配列番号58)	VLDDDSGDY (配列番号59)
KC009 (IMGT CDR)	GFTFSRSS (配列番号60)	ISSSGIIT (配列番号61)	NAVLDDDSGDY (配列番号62)
KC009 (VHH) (配列番号63)	QVQLQESGGGWVQPGGSLRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHYSDSVKGRFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDYWGQGTQVTVSS		

【１０００】

【表６】

Table 5- 抗CD47 VHH

抗CD47 VHH	CDR1	CDR2	CDR3
KC010 (Kabat CDR)	VNDIR (配列番号64)	RITGGGRTDYADSVKG (配列番号65)	WGRGY (配列番号66)
KC010 (IMGT CDR)	RFDFSVND (配列番号67)	ITGGGRT (配列番号68)	WGRGY (配列番号69)
KC010 (VHH) (配列番号70)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFDFSVNDIRWYRQAPGNERELVARITGGGRTDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCWGRGYWGQGTQVTVSS		

【１００１】

【表７－１】

Table 6- 1つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖の例示的な実施形態(VHH-ヒンジ-CH2-CH3)（Hisタグを含んでも含まなくてもよい）

配列番号 (特異性)	配列
KC011 (DR2) (配列番号71)	QVQLQESGGGLAPPGGSLRLSCAASGFTFSRHAMSWVRQAPGKGLEWVSDIRSGDGGDGGTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCALGLWKILPSTRGRGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
KC012 (DR2) (配列番号72)	QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGLTFSQRAMSWVRQAPGKGLEWISDIKSTGETSYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCALGLWKILPSVRGRGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
KC013 (DR2) (配列番号73)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASEIIFSITAMNWYRQAPGKQRELVAGISSSGKITYQDSVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCNTWAGARDAIWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
KC014 (DR2) (配列番号74)	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDRITNKDMGWVRQAPGKGLEWVSAIAKNNGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGLTHRGASKFNYWGQGTLVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【１００２】

【表７－２】

配列番号 (特異性)	配列
KC015 (CD47) 配列番号75	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFDFSVNDIRWYRQAPGNERELV ARITGGGRTDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCW GRGYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
KC016 (HEWL) 配列番号76	DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREGV AALYTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTC GATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【１００３】

【表８－１】

Table 7- 3つの抗原結合性ドメインを含むポリペプチド鎖の例示的な実施形態（Hisタグを含んでも含まなくてもよい）

配列番号 (特異性)	配列
KC020 配列番号77 (DR2;PD1;CD47)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASEIIFSITAMNWYRQAPGKQRELV AGISSSGKITYQDSVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCN TWAGARDAIWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLQESGGGWVQPGGS LRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHYSDSVKG RFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDYWGQGT QVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASR FDFSVNDIRWYRQAPGNERELVARITGGGRTDYADSVKGRFTISRDNA KNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCWGRGYWGQGTQVTVSS
KC021 配列番号78 (DR2;PD1;CD47)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASEIIFSITAMNWYRQAPGKQRELV AGISSSGKITYQDSVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCN TWAGARDAIWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQESLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLQESGGGWVQPGGS LRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHYSDSVKG RFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDYWGQGT QVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASR FDFSVNDIRWYRQAPGNERELVARITGGGRTDYADSVKGRFTISRDNA KNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCWGRGYWGQGTQVTVSS
KC022 配列番号79 (DR2;PD1;CD47)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSLSLRSMGWYRQGPGKMRE LVAVITSSAASTNYADSVKGRFTISFDNAKNTMYLQMNSLTPEDTAVYY CNFRGASRWYGTPSDYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLQESGGGW VQPGGSLRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHY SDSVKGRFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRL SCAASRFDFSVNDIRWYRQAPGNERELVARITGGGRTDYADSVKGRFT ISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCWGRGYWGQGTQVTVSS

【１００４】

【表８－２】

配列番号 (特異性)	配列
KC023 配列番号80 (DR2;PD1;CD47)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSLSLRSMGWYRQGPGKMRE LVAVITSSAASTNYADSVKGRFTISFDNAKNTMYLQMNSLTPEDTAVYY CNFRGASRWYGTPSDYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLQESGGGW VQPGGSLRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHY SDSVKGRFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRL SCAASRFDFSVNDIRWYRQAPGNERELVARITGGGRTDYADSVKGRFT ISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCWGRGYWGQGTQVTVSS
KC024 配列番号81 (DR2;PD1;CD47)	QVQLQESGGGLVQPGGSLLLSCAASGFTFSQRAMSWVRQAPGKGLE WVSDIRSTGDTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYY CALGLWKILPSARGRGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLQESGGGWVQPGGS LRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHYSDSVKG RFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDYWGQGT QVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASR FDFSVNDIRWYRQAPGNERELVARITGGGRTDYADSVKGRFTISRDNA KNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCWGRGYWGQGTQVTVSS
KC025 配列番号82 (DR2;PD1;CD47)	QVQLQESGGGLAPPGGSLRLSCAASGFTFSRHAMSWVRQAPGKGLE WVSDIRSGDGGDGGTSYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPED TAVYYCALGLWKILPSTRGRGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLQESGGGW VQPGGSLRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHY SDSVKGRFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRL SCAASRFDFSVNDIRWYRQAPGNERELVARITGGGRTDYADSVKGRFT ISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCWGRGYWGQGTQVTVSS

【１００５】

【表８－３】

配列番号 (特異性)	配列
KC026 配列番号83 (DR2;PD1;CD47)	QVQLQESGGGLVHPGGSLRLSCAASGLTFSQRAMSWVRQAPGKGLE WISDIKSTGETSYADSVKGRFTISRDNARNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CALGLWKILPSVRGRGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLQESGGGWVQPGGS LRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHYSDSVKG RFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDYWGQGT QVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASR FDFSVNDIRWYRQAPGNERELVARITGGGRTDYADSVKGRFTISRDNA KNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCWGRGYWGQGTQVTVSS
KC040 配列番号84 (DR2;HEWL; CD47)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASEIIFSITAMNWYRQAPGKQRELV AGISSSGKITYQDSVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCN TWAGARDAIWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGKAPAPAPAPAPKADVQLVESGGGSVQAGGS LRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREGVAALYTHTGNTYYTDSV KGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTCGATRKYVPVRFALDQ SSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPG GSLRLSCAASRFDFSVNDIRWYRQAPGNERELVARITGGGRTDYADSV KGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCWGRGYWGQGTQVTV SS
KC027 配列番号85 (D2;PD1;CD47) (IgG4)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASEIIFSITAMNWYRQAPGKQRELV AGISSSGKITYQDSVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCN TWAGARDAIWGQGTQVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGKAPAPAPAPAPKAQVQLQESGGGWVQPGGSLRL SCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHYSDSVKGRFTI SRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDYWGQGTQVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFDFS VNDIRWYRQAPGNERELVARITGGGRTDYADSVKGRFTISRDNAKNT VYLQMNNLKPEDTAVYYCWGRGYWGQGTQVTVSS

【１００６】

【表８－４】

配列番号 (特異性)	配列
KC028 配列番号86 (D2;PD1;CD47) (IgG4)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSLSLRSMGWYRQGPGKMRE LVAVITSSAASTNYADSVKGRFTISFDNAKNTMYLQMNSLTPEDTAVYY CNFRGASRWYGTPSDYWGQGTQVTVSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGKAPAPAPAPAPKAQVQLQESGGGWVQP GGSLRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHYSDS VKGRFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDYWG QGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCA ASRFDFSVNDIRWYRQAPGNERELVARITGGGRTDYADSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCWGRGYWGQGTQVTVSS
KC029 配列番号87 (D2;PD1;CD3)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSLSLRSMGWYRQGPGKMRE LVAVITSSAASTNYADSVKGRFTISFDNAKNTMYLQMNSLTPEDTAVYY CNFRGASRWYGTPSDYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLQESGGGW VQPGGSLRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHY SDSVKGRFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGSRGNNRGRTNYADSV KGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTL VTVSS

【１００７】

【表８－５】

配列番号 (特異性)	配列
KC030 配列番号88 (D2;PD1;CD3)	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSLSLRSMGWYRQGPGKMRE LVAVITSSAASTNYADSVKGRFTISFDNAKNTMYLQMNSLTPEDTAVYY CNFRGASRWYGTPSDYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLQESGGGW VQPGGSLRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHY SDSVKGRFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDY WGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGSRGNNRGRTNYADSV KGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTL VTVSS
KC031 配列番号89 (HEWL-HEWL-HEWL)	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREG VAALYTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYT CGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKEPKIPQPQPKPQPQPQPG GSGSAEAAAKAPKAPEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEY MTWFRQAPGKAREGVAALYTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMA YLRMDSVKSEDTAIYTCGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSI EYMTWFRQAPGKAREGVAALYTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKN MAYLRMDSVKSEDTAIYTCGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVT VSS

【１００８】

【表８－６】

配列番号 (特異性)	配列
KC032 配列番号90 (D2;HEWL;HEWL)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASEIIFSITAMNWYRQAPGKQRELV AGISSSGKITYQDSVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCN TWAGARDAIWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQESLSLSPGKEPKIPQPQPKPQPQPQPGGSGSAEAAAKA PKAPEVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGK AREGVAALYTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSED TAIYTCGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPG KAREGVAALYTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSE DTAIYTCGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSS
KC033 配列番号91 (D2;HEWL;CD3)	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASEIIFSITAMNWYRQAPGKQRELV AGISSSGKITYQDSVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCN TWAGARDAIWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQESLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLVESGGGSVQAGGSL RLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREGVAALYTHTGNTYYTDSVK GRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTCGATRKYVPVRFALDQSS YDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGSRGNNRGRTNYA DSVKGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWG RGTLVTVSS

【１００９】

【表８－７】

配列番号 (特異性)	配列
KC034 配列番号92 (HEWL;HEWL;CD3)	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREG VAALYTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYT CGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLVE SGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREGVAALYT HTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTCGATR KYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVI GSRGNNRGRTNYADSVKGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYY CNTAPLVAGRPWGRGTLVTVSS
KC035 配列番号93 (HEWL;HEWL;HEWL)	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREG VAALYTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYT CGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLVE SGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREGVAALYT HTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTCGATR KYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQL VESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREGVAAL YTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTCGA TRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSS

【１０１０】

【表８－８】

配列番号 (特異性)	配列
KC036 配列番号94 (HEWL;PD1; HEWL)	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREG VAALYTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYT CGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLQE SGGGWVQPGGSLRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSS GIITHYSDSVKGRFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDD DSGDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGSVQAG GSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREGVAALYTHTGNTYYTD SVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTCGATRKYVPVRFALD QSSYDYWGQGTQVTVSS
KC037 (D2;PD1:HEWL) 配列番号95	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASEIIFSITAMNWYRQAPGKQRELV AGISSSGKITYQDSVKGRFTISKDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCN TWAGARDAIWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQESLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLQESGGGWVQPGGS LRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSSGIITHYSDSVKG RFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDDDSGDYWGQGT QVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASG STDSIEYMTWFRQAPGKAREGVAALYTHTGNTYYTDSVKGRFTISQD KAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTCGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQG TQVTVSS

【表８－９】

配列番号 (特異性)	配列
KC038 配列番号96 (HEWL;PD1:CD47)	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREG VAALYTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYT CGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLQE SGGGWVQPGGSLRLSCVASGFTFSRSSMSWHRQAPGKERDLVAIISSS GIITHYSDSVKGRFTISRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYVCNAVLDD DSGDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPG GSLRLSCAASRFDFSVNDIRWYRQAPGNERELVARITGGGRTDYADSV KGRFTISRDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAVYYCWGRGYWGQGTQVTV SS
KC039 配列番号97 (HEWL;HEWL;HEWL)	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREG VAALYTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYT CGATRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPAPAPAPAPKAQVQLVE SGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREGVAALYT HTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTCGATR KYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQL VESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREGVAAL YTHTGNTYYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTCGA TRKYVPVRFALDQSSYDYWGQGTQVTVSS

【１０１１】

配列番号９８(天然ヒトIgG1ヒンジ領域)

EPKSCDKTHTCPPCP

配列番号９９(リンカー-HL1)

EPKIPQPQPKPQPQPQPGGSGSAEAAAKAPKAP

配列番号１００(柔軟性リンカー-FL2)

GGGGSGGGGS

配列番号１０１(柔軟性リンカー-FL18)

GGGGSGGGGSGGGGS

配列番号１０２(柔軟性リンカー-FL4)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

配列番号１０３(柔軟性リンカー-FL5)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

配列番号１０４(柔軟性リンカー)

(GGGGS)$_n$（nは1～10から選択される整数である）
配列番号105(剛性リンカー-RL5)
PAPAPKA
配列番号106(剛性リンカー-RL7)
APAPAPAPAPKA
配列番号107(剛性リンカー-RL12)
APAPAPAPAPAPAPAPAPAPKA
配列番号108(剛性リンカー)
(X(PAPAP))$_n$KA（nは1～10から選択される整数であり、Xは存在するか又は存在せず、Aである）
配列番号109(らせん状リンカー-RL1)
AEAAAKEAAAKA
配列番号110(らせん状リンカー-RL2)
AEAAAKEAAAKEAAAKA
配列番号111(らせん状リンカー-RL4)
AEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKEAAAKA
配列番号112(らせん状リンカー
X(EAAAK)$_n$Y（nは1～10、より好ましくは2～5から選択される整数であり、X及びYは独立して存在するか又は存在せず、好ましくはAである）
配列番号113　抗HEWL VHH（KC017）

【１０１２】
【化１】

XVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGSTDSIEYMTWFRQAPGKAREGVAALYTHTGNT
YYTDSVKGRFTISQDKAKNMAYLRMDSVKSEDTAIYTCGATRKYVPVRFALDQSSYDY
WGQGTQVTVSS

【１０１３】
(XはE又はQである)
配列番号114　抗4HEM VHH（KC018のVHH部分）

【１０１４】
【化２】

XVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASESTFSNYAMGWFRQAPGPEREFVATISQTGSHTY
YRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNNMKPEDTAVYYCAAGDNYYYTRTYEYDYWGQ
GTQVTVSS

【１０１５】
(XはE又はQである)
配列番号115　抗CD3 VHH（KC019）

【１０１６】
【化３】

XVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDIYKSFDMGWYRQAPGKQRDLVAVIGSRGNN
RGRTNYADSVKGRFTISRDGTGNTVYLLMNKLRPEDTAIYYCNTAPLVAGRPWGRGTL
VTVSS

【１０１７】
(XはE又はDである)
配列番号116　天然ヒトIgG1 CH3

【１０１８】
【化４】

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【１０１９】
配列番号１１７　天然ヒトIgG1 CH2
【１０２０】
【化５】

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

【１０２１】
配列番号１１８　変異型ヒトIgG1ヒンジ領域
EPKSSDKTHTCPPCP
配列番号１１９　変異型ヒトIgG1ヒンジ領域
EPKSSDKTHTSPPSP
配列番号１２０　変異型ヒトIgG1ヒンジ領域
DKTHTCPPC
配列番号１２１　天然ヒトIgG2ヒンジ領域
ERKCCVECPPCP
配列番号１２２　変異型ヒトIgG2ヒンジ領域
ERKSSVECPPCP
配列番号１２３　変異型ヒトIgG2ヒンジ領域
ERKSSVESPPCP
配列番号１２４　変異型ヒトIgG2ヒンジ領域
ERKSSVESPPSP
配列番号１２５　天然ヒトIgG3ヒンジ領域
ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPP
CPRCP
配列番号１２６　変異型ヒトIgG3ヒンジ領域
EPKSSDTPPPCPRCP
配列番号１２７　変異型ヒトIgG3ヒンジ領域
EPKSSDTPPPSPRCP
配列番号１２８　変異型ヒトIgG3ヒンジ領域
EPKSSDTPPPSPRSP
配列番号１２９　天然ヒトIgG4ヒンジ領域
ESKYGPPCPSCP
配列番号１３０　変異型ヒトIgG4ヒンジ領域
ESKYGPPCPPCP
配列番号１３１　変異型ヒトIgG4ヒンジ領域
ESKYGPPSPSCP
配列番号１３２　変異型ヒトIgG4ヒンジ領域)
ESKYGPPSPSSP
配列番号１３３　シグナルペプチド
MEWSWVFLFFLSVTTGVHS
配列番号１３４　エピトープタグ
HHHHHH

配列番号１３５　天然ヒトIgG1定常領域

【１０２２】

【化６】

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【１０２３】

配列番号１３６　変異型CH3ドメイン(鎖A-　変異D399N; K370E; E356Q)

【１０２４】

【化７】

GQPREPQVYTLPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【１０２５】

配列番号１３７　変異型CH3ドメイン(鎖B-　変異D399N; K439E; E357Q)

【１０２６】

【化８】

GQPREPQVYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLN
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

【１０２７】

配列番号１３８　変異型ヒトIgG1定常領域(鎖A-　変異D399N; K370E; E356Q)

【１０２８】

【化９】

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRQEMTKNQVSLTCLVEGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【１０２９】

配列番号１３９　変異型ヒトIgG1定常領域(鎖B-　変異D399N; K439E; E357Q)

【１０３０】

【化１０】

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREQMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLNSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQESLSLSPGK

【１０３１】

配列番号１４０　変異型ヒトIgG4定常領域

【１０３２】

【化１１】

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

【図面】

【図１】

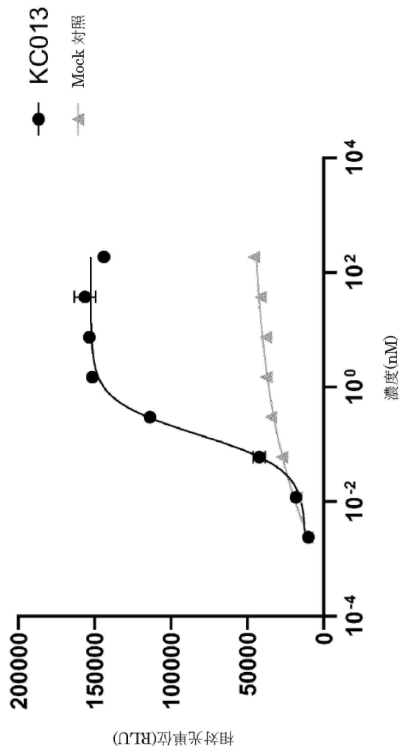


Figure 1

【図２】

名称	KC018		ドーパミン		KC011		KC012		KC013		KC014	
バイオセンサー	EC_{50} (pM)		EC_{50} (pM)		EC_{50} (pM)		EC_{50} (pM)		EC_{50} (pM)		EC_{50} (pM)	
Gαz	--	--	9.18	9.13	--	7.04	--	7.00	6.57	6.04	7.19	6.91
Gαs	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Gαq	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Gα15/16	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Gαi2	--	--	8.25	8.21	--	--	NS	NS	--	--	--	--
GαoA	--	--	8.98	8.64	--	--	--	--	--	--	--	--
Gα13	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Barr2	--	--	7.45	7.84	--	--	--	--	--	--	--	--

NS: 非飽和曲線
--: 検出なし

Figure 2

【図３】

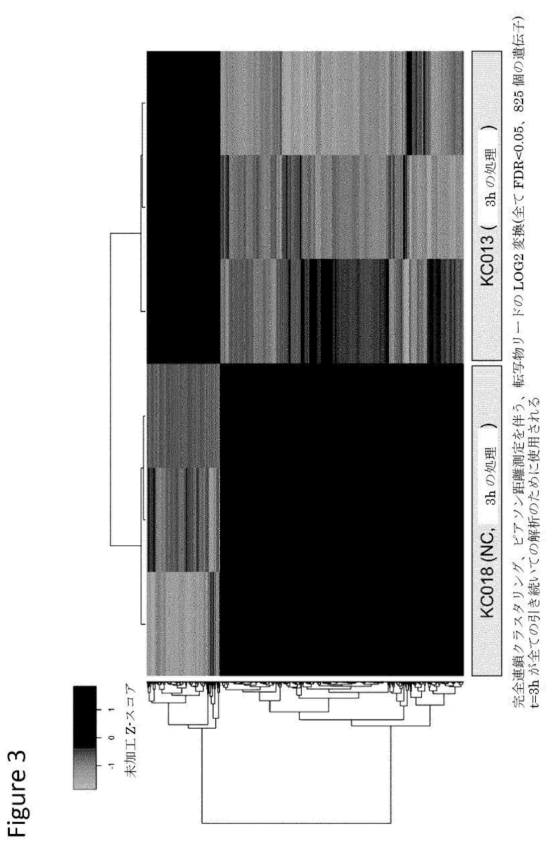


Figure 3

【図４】

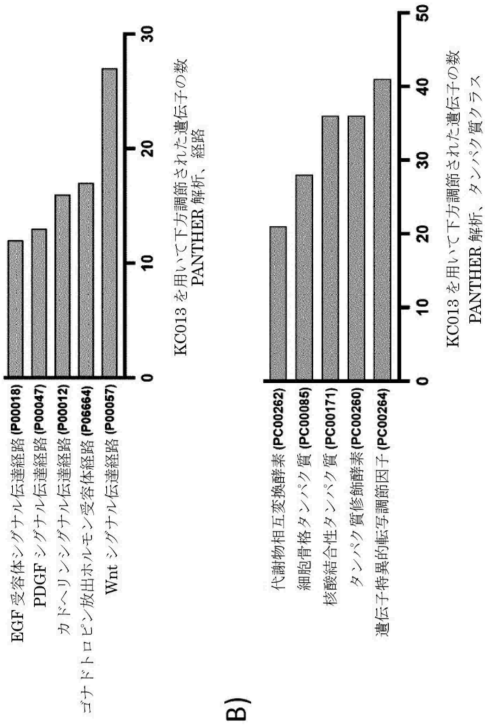


Figure 4

【図５】

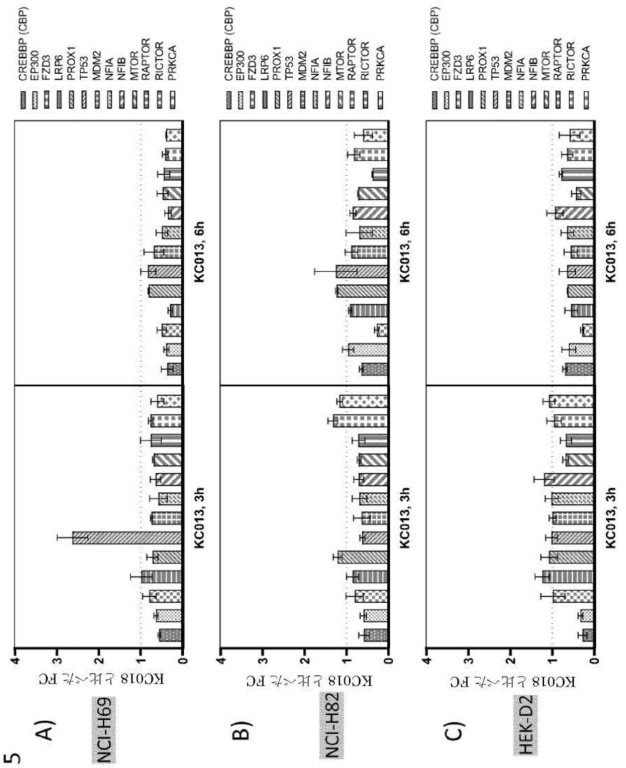
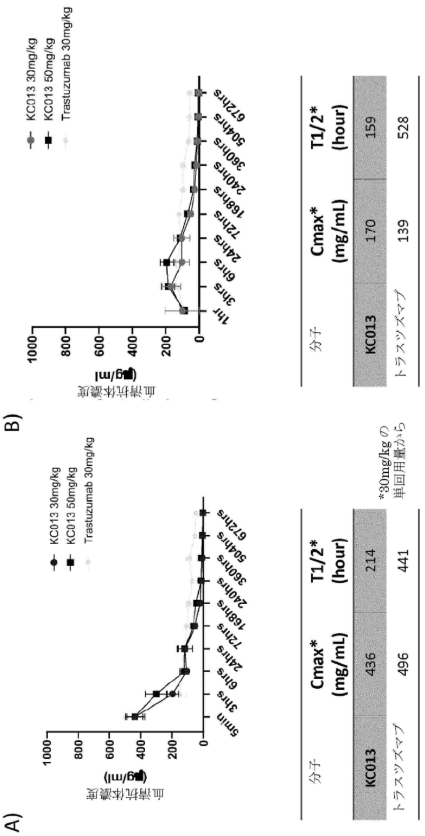


Figure 5

【図６】



分子	Cmax* (mg/mL)	T1/2* (hour)
KC013	436	214
トラスツズマブ	496	441

*30mg/kg の単回用量から

分子	Cmax* (mg/mL)	T1/2* (hour)
KC013	170	159
トラスツズマブ	139	528

Figure 6

【図７ＡＢ】

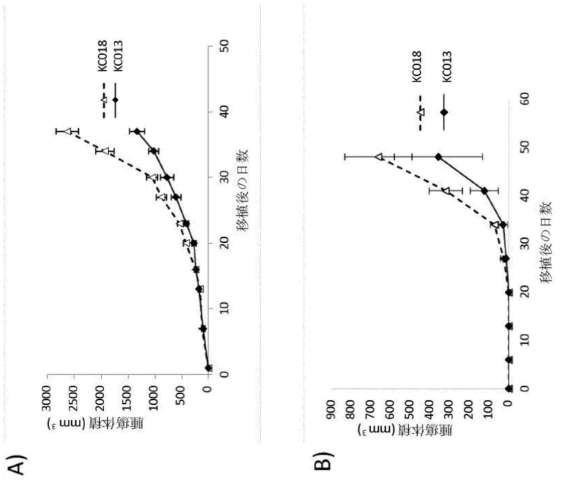


Figure 7

【図７Ｃ】

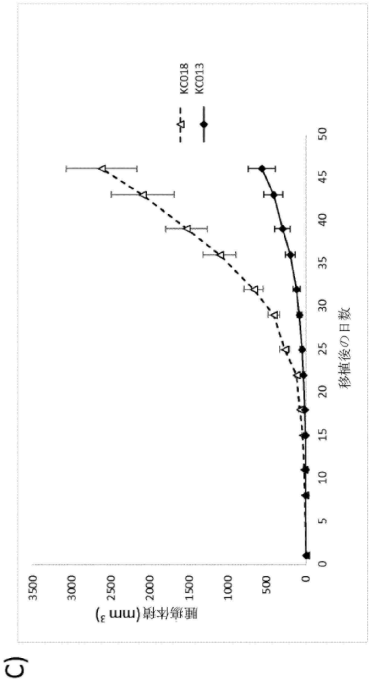


Figure 7

【図８】

	sdAb ID	TGI (%)				
		NCI-H69	NCI-H510A	NCI-H727 (1M)	NCI-H727 (6M)	PANC1 (5M)
DR2	KC013	**46**	**77**	**54**	**49**	-29
	KC014	**57**	**67**	26	12	9
	KC011	**53**	**76**	31	-2	11
	KC012	**43**	**61**	**43**	35	**55**

Figure 8

【図９Ａ】

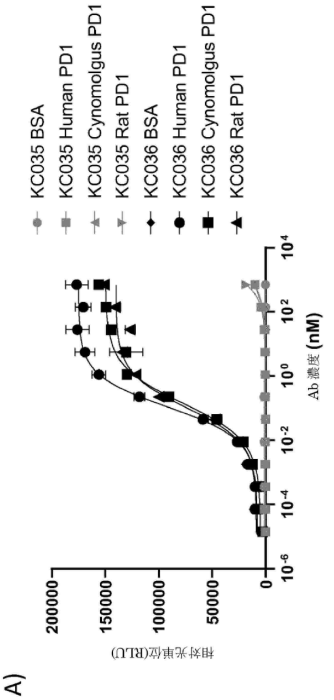


Figure 9

【図９Ｂ】

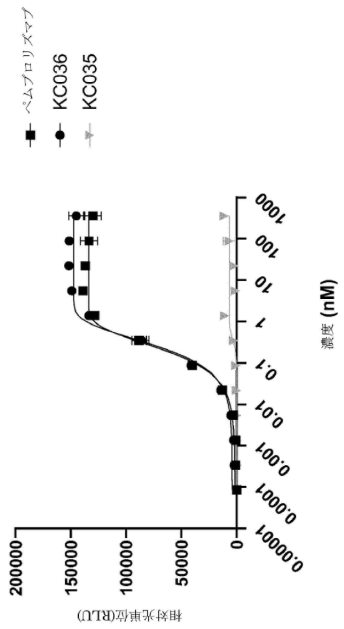


Figure 9
B)

【図９Ｃ】

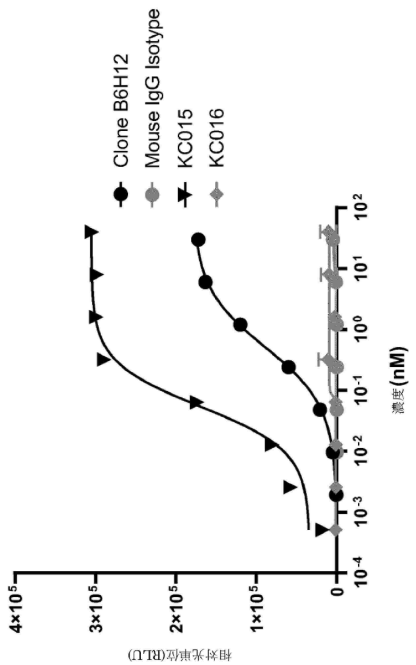


Figure 9
C)

【図９Ｄ】

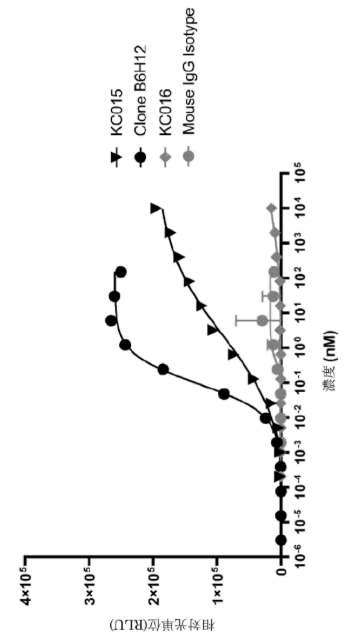


Figure 9
D)

【図９Ｅ】

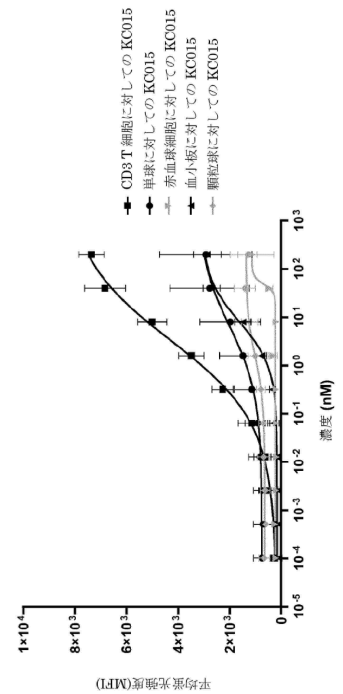


Figure 9
E)

【図１０】

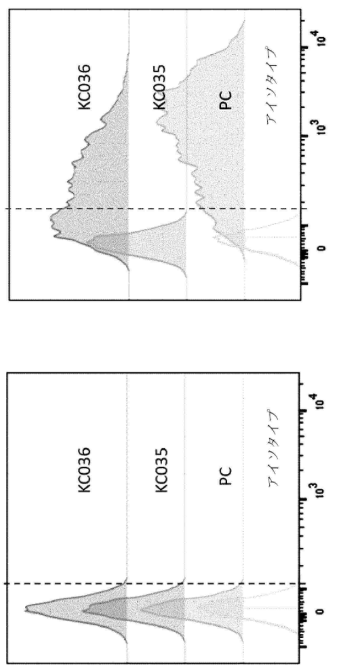


Figure 10

【図１１】

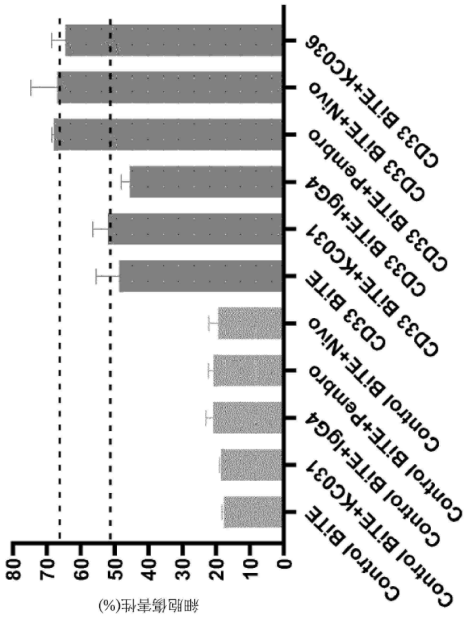


Figure 11

【図１２】

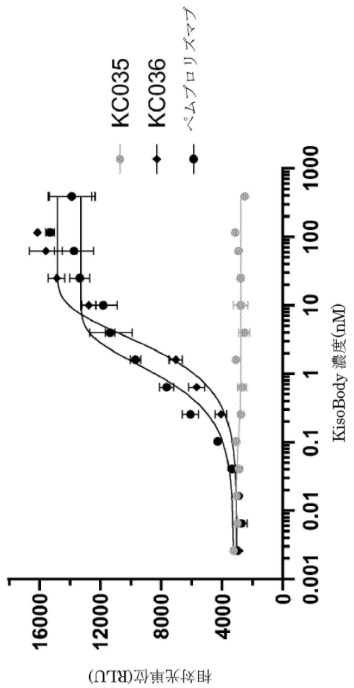


Figure 12

【図１３】

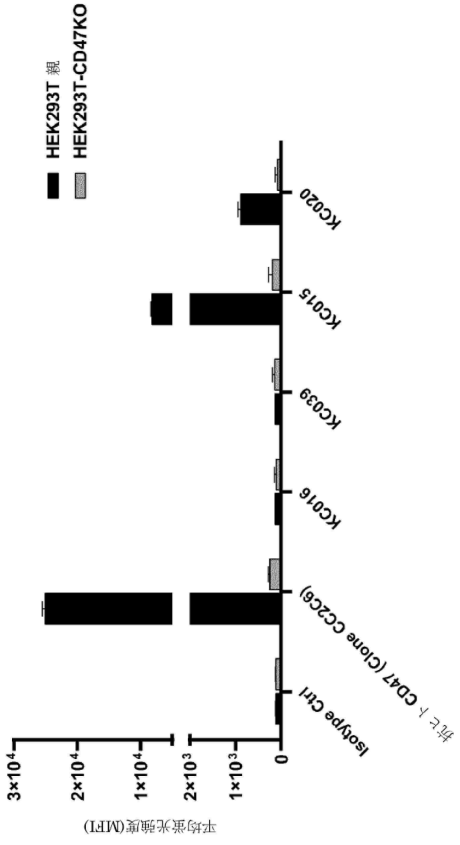


Figure 13

【図１４】

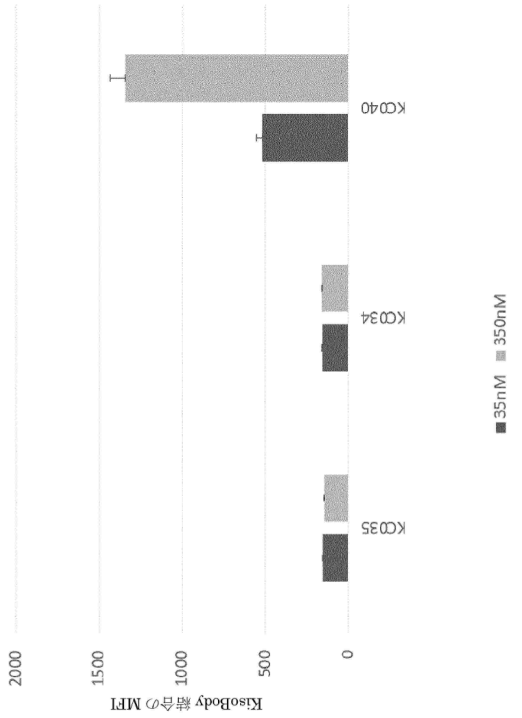


Figure 14

【図１５】

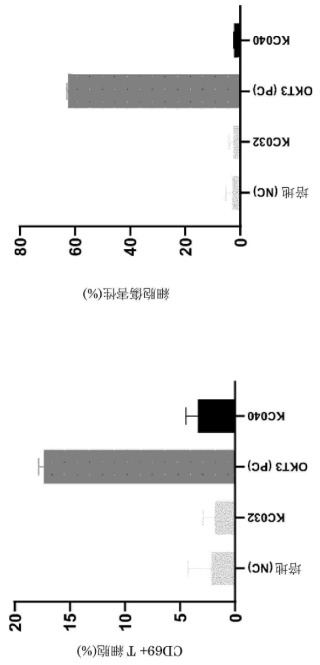


Figure 15

【図１６】

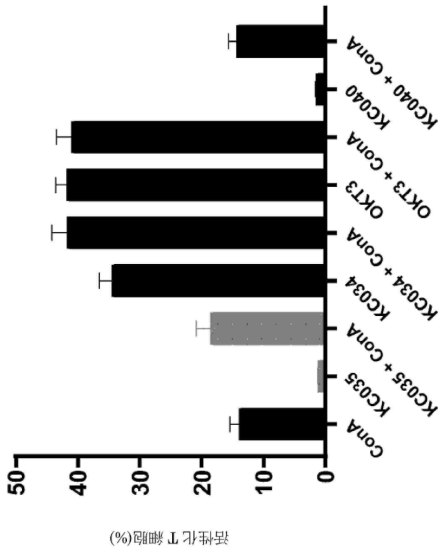


Figure 16

【図１７】

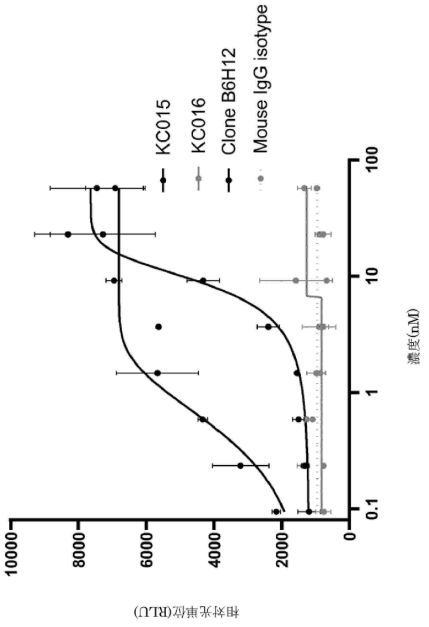


Figure 17

【図１８】

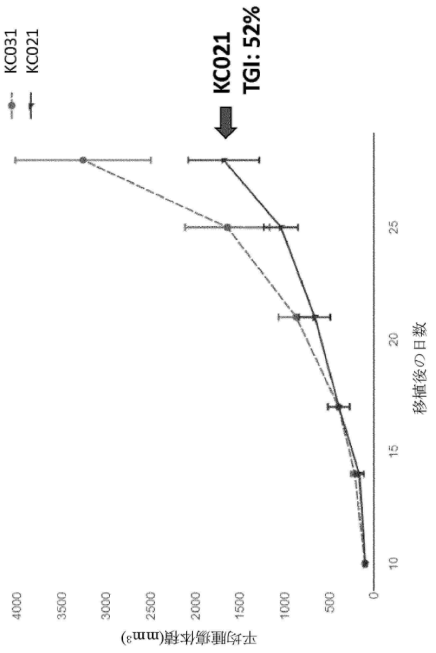


Figure 18

【図１９】

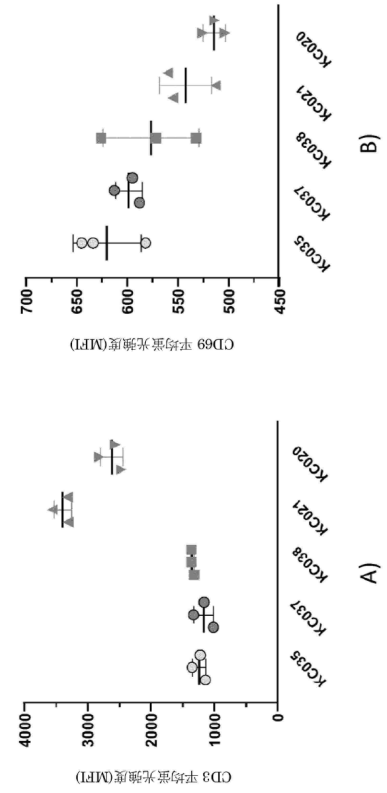
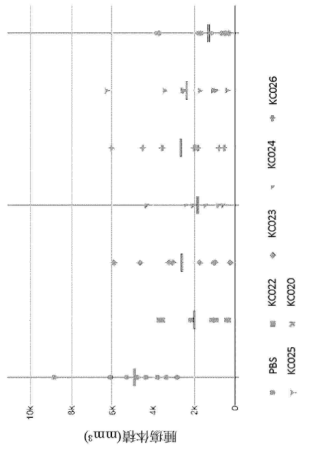


Figure 19

【図２０】

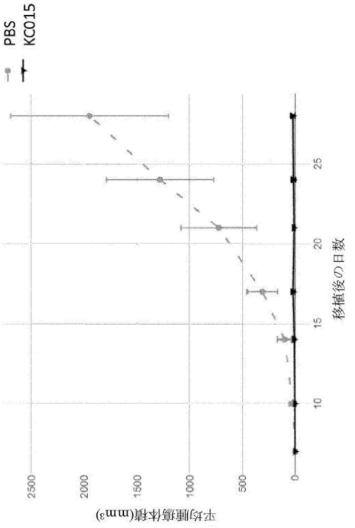


B)

ダンバシ質 ID	抗 D2 モジュール	TGI (%)	P 値 (TT)
KC020	KC001	74.02	0.001
KC024	KC007	63.02	0.001
KC022	KC005	59.78	0.002
KC025	KC003	52.05	0.008
KC023	KC006	47.17	0.016
KC026	KC004	46.07	0.016

Figure 20

【図２１ＡＢ】



B)

腫瘍	モデル	TGI
NCI-H69	PBMC 予備移植	53.11%
NCI-H82	共移植	74.2%
SCLC-21H	PBMC 予備移植	55.64%
RKO	PBMC 予備移植	49.32%

Figure 21

【図２１Ｃ】

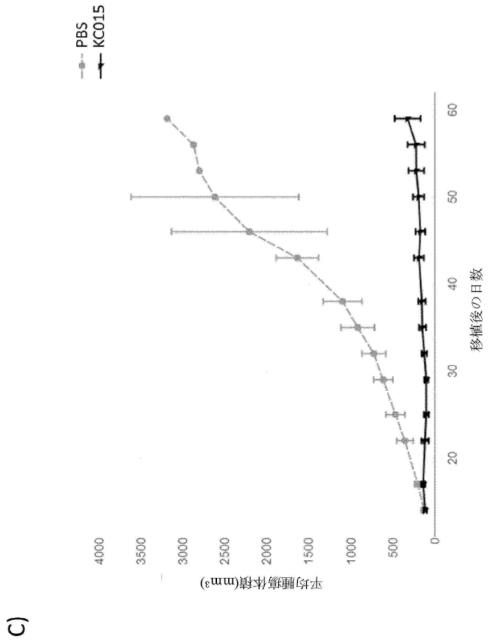


Figure 21

【図２２】

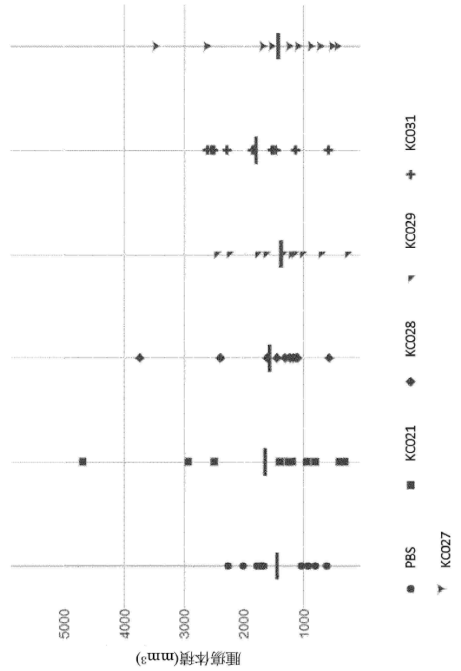


Figure 22

【図２３】

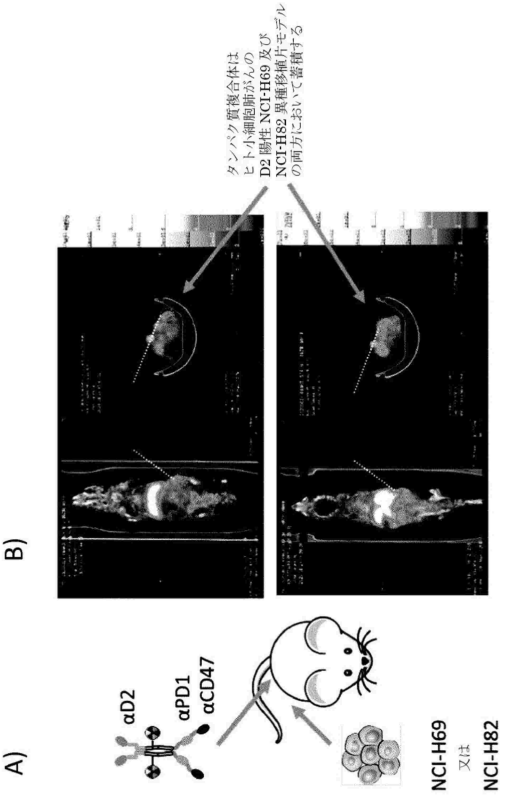
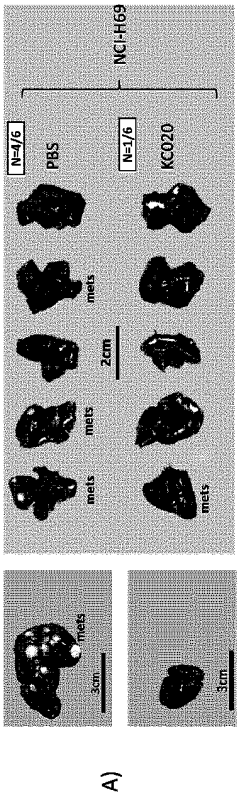


Figure 23

【図２４Ａ】



【図２４Ｂ】



【図２４Ｃ】

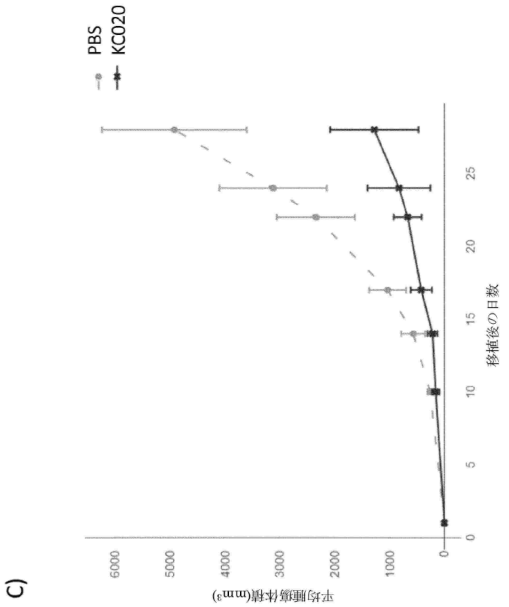


Figure 24

【図２５】

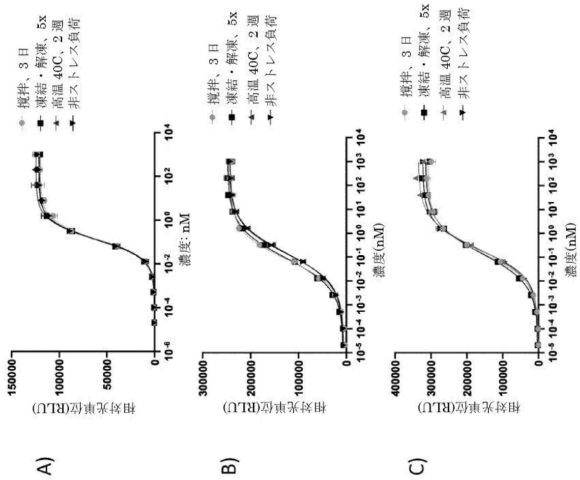


Figure 25

【図２６】

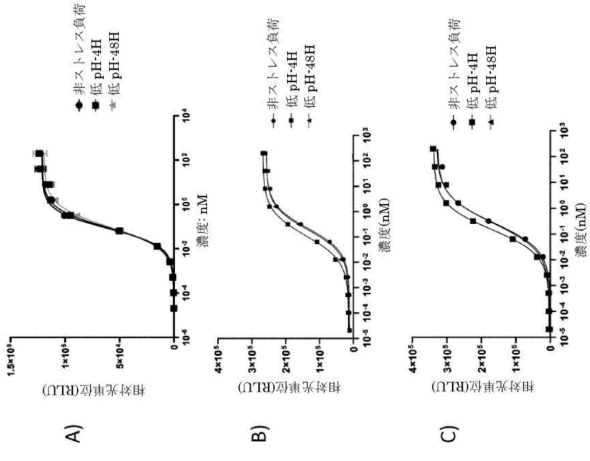


Figure 26

【図２７】

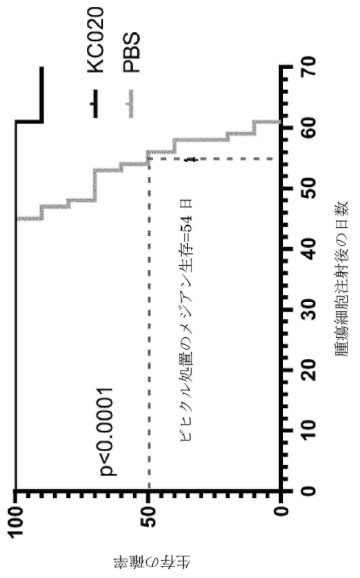


Figure 27

【配列表】

<u>２０２４５１２７４１０００００１．ａｐｐ</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: ***C07K 16/28*** (2006.01), ***A61K 39/44*** (2006.01), ***A61K 39/395*** (2006.01), ***A61K 49/00*** (2006.01), ***A61P 35/00*** (2006.01), ***A61P 35/04*** (2006.01) (more IPCs on the last page)

CPC: , A61K 39/44 (2020.01), A61K 39/39533 (2020.01), A61K 39/39558 (2020.01), A61K 49/00 (2020.01), A61P 35/00 (2020.01) (more CPCs on the last page)

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)
Keywords used across the whole IPC and CPC.

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

Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)
Databases: Questel Orbit, Google, Scopus, STN (CAPLUS, EMBASE, BIOSIS, BIOTECHABS), GenomeQuest.
Keywords: dopamine receptor d2, D2R, DR2, PD-1, PD1, CD47, heavy chain antibod, HCAb, single-domain antibod, sdAb, nanobod, VHH, binding domain.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KHAN, Z. U. et AL, "*Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 23 June 1998 (23-06-1998), Vol. 95(13), pp. 7731–7736, ISSN 00278424 <doi: 10.1073/pnas.95.13.7731> *whole document*	1, 4-144, and 148-183
A	WO 2021/004480 A1 (YIN, L. et AL) 14 January 2021 (14-01-2021) *whole document*	2-18, and 21-183
X, Y	WO 2011/051327 A2 (LOEW, A.) 5 May 2011 (05-05-2011) *SEQ ID NO:1*	1, 4-27, 36-136, 149-151, 153-and 183
X, Y	WO 2007/035092 A2 (VERRIPS, C.T. et AL) 29 March 2007 (29-03-2007) *SEQ ID NO:127*	2, 4-18 21-27, 36-136, 149-151, and 153-183

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

*	Special categories of cited documents:	"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
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"D"	document cited by the applicant in the international application	"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
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"&"	document member of the same patent family
"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		

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 July 2022 (07-07-2022)	08 July 2022 (08-07-2022)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476	Authorized officer Darryl Jones (873) 354-9761

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050442

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	US 2018/0222966 A1 (VERHEESEN, P. et AL) 9 August 2018 (09-08-2018) *SEQ ID NO:26*	3-18 21-27, 36-136, 149-151, and 153-183
X, Y	WO 2016/124768 A1 (BRANDENBURG, B. et AL) 11 August 2016 (11-08-2016) *SEQ ID NOs:97-99*	137-151 and 153-183

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050442

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

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

a. ☐ forming part of the international application as filed.

b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 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

International application No.
PCT/CA2022/050442

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

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

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Group 1: Claims 1, 4-28, 36-138, 144, and 148-183 (all partially) relate to a binding agent (claims 1, 4-28, 36-138, 144, and 148-156) that comprises one or more antigen binding domains, nucleic acids (claim 164) and vectors encoding (claim 165), compositions (claims 157-163), cells (claims 166 and 167), kits (claims 168 and 169), and methods (claims 170-183) comprising said binding agent, wherein at least one of the one or more antigen binding domains comprises the complementary determining regions (CDRs) of SEQ ID NOs:1-3 or SEQ ID NOs:4-6, or a VHH sequence having at least 75% identity to SEQ ID NO:7, corresponding to the dopamine receptor D2 (DR2) specific binding agent KC001.

Continued on extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:
Group 1: Claims 1, 4-28, 36-138, 144, and 148-183 (all partially);
Group 9: Claims 2, 4-18, and 21-183 (all partially); and
Group 10: Claims 3, 4-18, 21-145, and 148-183 (all partially).

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050442

Continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group 2: Claims 1, 4-27, 29, 36-136, 148-151, and 153-183 (all partially) relate to a binding agent (claims 1, 4-27, 29, 36-136, 148-151, and 153-156) that comprises one or more antigen binding domains, nucleic acids (claim 164) and vectors encoding (claim 165), compositions (claims 157-163), cells (claims 166 and 167), kits (claims 168 and 169), and methods (claims 170-183) comprising said binding agent, wherein at least one of the one or more antigen binding domains comprises the complementary determining regions (CDRs) of SEQ ID NOs:8-10 or SEQ ID NOs:11-13, or a VHH sequence having at least 75% identity to SEQ ID NO:14, corresponding to the dopamine receptor D2 (DR2) specific binding agent KC002.

Group 3: Claims 1, 4-27, 30, 36-136, 142, and 148-183 (all partially) relate to a binding agent (claims 1, 4-27, 30, 36-136, 142, and 148-156) that comprises one or more antigen binding domains, nucleic acids (claim 164) and vectors encoding (claim 165), compositions (claims 157-163), cells (claims 166 and 167), kits (claims 168 and 169), and methods (claims 170-183) comprising said binding agent, wherein at least one of the one or more antigen binding domains comprises the complementary determining regions (CDRs) of SEQ ID NOs:15-17 or SEQ ID NOs:18-20, or a VHH sequence having at least 75% identity to SEQ ID NO:21, corresponding to the dopamine receptor D2 (DR2) specific binding agent KC003.

Group 4: Claims 1, 4-27, 31, 36-136, 143, and 148-183 (all partially) relate to a binding agent (claims 1, 4-27, 31, 36-136, 143, and 148-156) that comprises one or more antigen binding domains, nucleic acids (claim 164) and vectors encoding (claim 165), compositions (claims 157-163), cells (claims 166 and 167), kits (claims 168 and 169), and methods (claims 170-183) comprising said binding agent, wherein at least one of the one or more antigen binding domains comprises the complementary determining regions (CDRs) of SEQ ID NOs:22-24 or SEQ ID NOs:25-27, or a VHH sequence having at least 75% identity to SEQ ID NO:28, corresponding to the dopamine receptor D2 (DR2) specific binding agent KC004.

Group 5: Claims 1, 4-27, 32, 36-136, 139, and 145-183 (all partially) relate to a binding agent (claims 1, 4-27, 32, 36-136, 139, and 145-156) that comprises one or more antigen binding domains, nucleic acids (claim 164) and vectors encoding (claim 165), compositions (claims 157-163), cells (claims 166 and 167), kits (claims 168 and 169), and methods (claims 170-183) comprising said binding agent, wherein at least one of the one or more antigen binding domains comprises the complementary determining regions (CDRs) of SEQ ID NOs:29-31 or SEQ ID NOs:32-34, or a VHH sequence having at least 75% identity to SEQ ID NO:35, corresponding to the dopamine receptor D2 (DR2) specific binding agent KC005.

Group 6: Claims 1, 4-27, 33, 36-136, 140, and 148-183 (all partially) relate to a binding agent (claims 1, 4-27, 33, 36-136, 140, and 148-156) that comprises one or more antigen binding domains, nucleic acids (claim 164) and vectors encoding (claim 165), compositions (claims 157-163), cells (claims 166 and 167), kits (claims 168 and 169), and methods (claims 170-183) comprising said binding agent, wherein at least one of the one or more antigen binding domains comprises the complementary determining regions (CDRs) of SEQ ID NOs:36-38 or SEQ ID NOs:39-41, or a VHH sequence having at least 75% identity to SEQ ID NO:42, corresponding to the dopamine receptor D2 (DR2) specific binding agent KC006.

Group 7: Claims 1, 4-27, 34, 36-136, 148-151, and 153-183 (all partially) relate to a binding agent (claims 1, 4-27, 34, 36-136, 148-151, and 153-156) that comprises one or more antigen binding domains, nucleic acids (claim 164) and vectors encoding (claim 165), compositions (claims 157-163), cells (claims 166 and 167), kits (claims 168 and 169), and methods (claims 170-183) comprising said binding agent, wherein at least one of the one or more antigen binding domains comprises the complementary determining regions (CDRs) of SEQ ID NOs:43-45 or SEQ ID NOs:46-48, or a VHH sequence having at least 75% identity to SEQ ID NO:49, corresponding to the dopamine receptor D2 (DR2) specific binding agent KC007.

Group 8: Claims 1, 4-27, 35-136, 141, and 148-183 (all partially) relate to a binding agent (claims 1, 4-27, 35-136, 141, and 148-156) that comprises one or more antigen binding domains, nucleic acids (claim 164) and vectors encoding (claim 165), compositions (claims 157-163), cells (claims 166 and 167), kits (claims 168 and 169), and methods (claims 170-183) comprising said binding agent, wherein at least one of the one or more antigen binding domains comprises the complementary determining regions (CDRs) of SEQ ID NOs:50-52 or SEQ ID NOs:53-55, or a VHH sequence having at least 75% identity to SEQ ID NO:56, corresponding to the dopamine receptor D2 (DR2) specific binding agent KC008.

Group 9: Claims 2, 4-18, and 21-183 (all partially) relate to a binding agent (claims 2, 4-18, and 21-156) that comprises one or more antigen binding domains, nucleic acids (claim 164) and vectors encoding (claim 165), compositions (claims 157-163), cells (claims 166 and 167), kits (claims 168 and 169), and methods (claims 170-183) comprising said binding agent, wherein at least one of the one or more antigen binding domains comprises the complementary determining regions (CDRs) of SEQ ID NOs:57-59 or SEQ ID NOs:60-62, or a VHH sequence having at least 75% identity to SEQ ID NO:63, corresponding to the PD-1 specific binding agent KC009.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050442

Continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group 10: Claims 3, 4-18, 21-145, and 148-183 (all partially) relate to a binding agent (claims 3, 4-18, 21-145, and 148-156) that comprises one or more antigen binding domains, nucleic acids (claim 164) and vectors encoding (claim 165), compositions (claims 157-163), cells (claims 166 and 167), kits (claims 168 and 169), and methods (claims 170-183) comprising said binding agent, wherein at least one of the one or more antigen binding domains comprises the complementary determining regions (CDRs) of SEQ ID NOs:64-66 or SEQ ID NOs:67-69, or a VHH sequence having at least 75% identity to SEQ ID NO:70, corresponding to the CD47 specific binding agent KC010.

Note, embodiments which encompass multiple groups of inventions (for example a binding agent comprising one or more antigen binding domains from different invention groups such as the binding agent KC020 which comprises SEQ ID NOs: 7, 63, and 70) may only be claimed with one invention group.

Reference is made to the following documents:

D1: KHAN, Z. U. et AL, "*Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 23 June 1998 (23-06-1998), Vol. 95(13), pp. 7731–7736, ISSN 00278424 <doi: 10.1073/pnas.95.13.7731>

D2: WO 2021/004480 A1 (YIN, L. et AL) 14 January 2021 (14-01-2021)

D1 discloses the production of subtype-specific antibodies comprising antigen binding domains that target the dopamine receptor D2 short and D2 long isoforms.

D2 discloses an anti-CD47 and anti-PD-1 bispecific antibody comprising a first antigen binding domain that specifically binds to CD47 and a second antigen binding domain comprising a single domain antibody (sdAb) that specifically binds to PD-1, preparation methods and therapeutic uses thereof.

As required by PCT Rule 13.1, the application shall relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. The common inventive concept linking the inventions of Groups 1-8 is seen as a binding agent specific to dopamine receptor D2 (DR2). However, this concept is already independently known from **D1**, which discloses DR2 specific antibodies (binding agents). The common inventive concept linking the inventions of Groups 1-8 with Group 9 or Group 10, or Group 9 with Group 10 is seen as a binding agent comprising an antigen binding domain. However, this concept is already independently known from each of **D1** or **D2**, where **D1** discloses antibodies (binding agents) comprising DR2 specific antigen binding domains and **D2** discloses an antibody (a binding agent) comprising both PD-1 and CD47 specific antigen binding domains. Thus the features of DR2, PD-1, and CD47 specific binding agents comprising antigen binding domains was already known in the art, and cannot serve as a single general inventive concept *a posteriori* linking the claimed subject matter.

Therefore, the requirement of unity of invention referred to in PCT Rule 13.1 has not been fulfilled because there is no technical feature among the alleged inventions identified above that defines a contribution over the prior art and the claimed inventions are not linked so as to form a single general inventive concept.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2022/050442

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2021004480A1	14 January 2021 (14-01-2021)	CN114072426A	18 February 2022 (18-02-2022)
		EP3998287A1	18 May 2022 (18-05-2022)
WO2011051327A2	05 May 2011 (05-05-2011)	WO2011051327A3	30 June 2011 (30-06-2011)
WO2007035092A2	29 March 2007 (29-03-2007)	WO2007035092A3	12 July 2007 (12-07-2007)
		AU2006292871A1	29 March 2007 (29-03-2007)
		CA2622968A1	29 March 2007 (29-03-2007)
		EP1934611A2	25 June 2008 (25-06-2008)
		JP2009508521A	05 March 2009 (05-03-2009)
		US2010323905A1	23 December 2010 (23-12-2010)
US2018222966A1	09 August 2018 (09-08-2018)	AR102550A1	08 March 2017 (08-03-2017)
		AU2014261434A1	12 November 2015 (12-11-2015)
		AU2014261434B2	16 April 2020 (16-04-2020)
		AU2014273418A1	05 November 2015 (05-11-2015)
		AU2014273418B2	23 April 2020 (23-04-2020)
		AU2020205327A1	06 August 2020 (06-08-2020)
		BR112015027430A2	25 July 2017 (25-07-2017)
		BR112015027430A8	24 December 2019 (24-12-2019)
		BR112017009330A2	19 December 2017 (19-12-2017)
		CA2910632A1	04 December 2014 (04-12-2014)
		CA2910874A1	06 November 2014 (06-11-2014)
		CA2910874C	22 March 2022 (22-03-2022)
		CA2966548A1	12 May 2016 (12-05-2016)
		CN105358698A	24 February 2016 (24-02-2016)
		CN105358699A	24 February 2016 (24-02-2016)
		DK2992100T3	09 December 2019 (09-12-2019)
		EP2992100A1	09 March 2016 (09-03-2016)
		EP2992100B1	04 September 2019 (04-09-2019)
		EP2992101A1	09 March 2016 (09-03-2016)
		EP2992101B1	10 October 2018 (10-10-2018)
		EP3215624A2	13 September 2017 (13-09-2017)
		EP3597758A1	22 January 2020 (22-01-2020)
		ES2703192T3	07 March 2019 (07-03-2019)
		ES2762151T3	22 May 2020 (22-05-2020)
		HRP20192182T1	21 February 2020 (21-02-2020)
		HUE047580T2	28 May 2020 (28-05-2020)
		JP2016522186A	28 July 2016 (28-07-2016)
		JP6388917B2	12 September 2018 (12-09-2018)
		JP2019014715A	31 January 2019 (31-01-2019)
		JP6720252B2	08 July 2020 (08-07-2020)
		JP2016526015A	01 September 2016 (01-09-2016)
		JP6967347B2	17 November 2021 (17-11-2021)
		JP2017536134A	07 December 2017 (07-12-2017)
		JP7089877B2	23 June 2022 (23-06-2022)
		JP2019178136A	17 October 2019 (17-10-2019)
		JP2021061843A	22 April 2021 (22-04-2021)
		PL2992100T3	30 April 2020 (30-04-2020)
		PL2992101T3	31 May 2019 (31-05-2019)
		PT2992100T	16 December 2019 (16-12-2019)
		TR201819577T4	21 January 2019 (21-01-2019)
		US2016075769A1	17 March 2016 (17-03-2016)
		US9803003B2	31 October 2017 (31-10-2017)
		US2018022791A1	25 January 2018 (25-01-2018)
		US10400033B2	03 September 2019 (03-09-2019)
		US2018179551A1	28 June 2018 (28-06-2018)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050442

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
		US10858666B2	08 December 2020 (08-12-2020)
		US2019352379A1	21 November 2019 (21-11-2019)
		US11028154B2	08 June 2021 (08-06-2021)
		US2016145325A1	26 May 2016 (26-05-2016)
		US2021253677A1	19 August 2021 (19-08-2021)
		US2021340556A1	04 November 2021 (04-11-2021)
		WO2014177595A1	06 November 2014 (06-11-2014)
		WO2014191146A1	04 December 2014 (04-12-2014)
		WO2016071438A2	12 May 2016 (12-05-2016)
		WO2016071438A3	23 June 2016 (23-06-2016)
		ZA201507757B	21 December 2016 (21-12-2016)
		ZA201507758B	25 January 2017 (25-01-2017)
WO2016124768A1	11 August 2016 (11-08-2016)	AU2016214304A1	20 July 2017 (20-07-2017)
		AU2016214304B2	11 November 2021 (11-11-2021)
		BR112017016417A2	27 March 2018 (27-03-2018)
		CA2975655A1	11 August 2016 (11-08-2016)
		CN107207611A	26 September 2017 (26-09-2017)
		CN107207611B	09 November 2021 (09-11-2021)
		EA201791735A1	30 November 2017 (30-11-2017)
		EA038407B1	24 August 2021 (24-08-2021)
		EP3253411A1	13 December 2017 (13-12-2017)
		HK1243925A1	27 July 2018 (27-07-2018)
		IL253653D0	28 September 2017 (28-09-2017)
		IL253653A	31 October 2021 (31-10-2021)
		JP2018505677A	01 March 2018 (01-03-2018)
		JP6772157B2	21 October 2020 (21-10-2020)
		JP2020171288A	22 October 2020 (22-10-2020)
		KR20170107562A	25 September 2017 (25-09-2017)
		MX2017010009A	24 October 2017 (24-10-2017)
		MY186585A	28 July 2021 (28-07-2021)
		PH12017501216A1	15 January 2018 (15-01-2018)
		SG10202103618XA	28 May 2021 (28-05-2021)
		SG11201705614QA	30 August 2017 (30-08-2017)
		US2018016323A1	18 January 2018 (18-01-2018)
		US10370435B2	06 August 2019 (06-08-2019)
		US2019359693A1	28 November 2019 (28-11-2019)
		US10703804B2	07 July 2020 (07-07-2020)
		US2020299364A1	24 September 2020 (24-09-2020)
		US11136379B2	05 October 2021 (05-10-2021)
		ZA201705300B	26 May 2021 (26-05-2021)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2022/050442

IPC:
C07K 16/30 (2006.01) , ***C07K 16/46*** (2006.01)

CPC:
A61P 35/04 (2020.01) , C07K 16/28 (2020.01) , C07K 16/30 (2020.01) , C07K 16/46 (2020.01) , C07K 19/00 (2020.01) , C07K 2317/565 (2020.01)

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	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C07K	16/18		
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C07K	16/28		
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46		
C07K	*16/30*	*(2006.01)*	C07K	16/30		
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00		
C07K	*17/00*	*(2006.01)*	C07K	17/00		
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*35/04*	*(2006.01)*	A61P	35/04		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	D	
A61K	*47/64*	*(2017.01)*	A61K	39/395	N	
			A61K	47/64		

(32)優先日　令和4年1月20日(2022.1.20)
(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,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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,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．ＰＬＵＲＯＮＩＣ

・３５７６・スイート・４３１０・キソジ・バイオテクノロジー・インコーポレイテッド内
(72)発明者　リチャード・ワーガチャック
カナダ・ケベック・Ｈ２Ｘ・３Ｐ９・モントリオール・アヴニュ・デュ・パルク・３５７６・スイート・４３１０・キソジ・バイオテクノロジー・インコーポレイテッド内
(72)発明者　ウェンヤン・ホウ
カナダ・ケベック・Ｈ２Ｘ・３Ｐ９・モントリオール・アヴニュ・デュ・パルク・３５７６・スイート・４３１０・キソジ・バイオテクノロジー・インコーポレイテッド内
(72)発明者　ルイス・ダ・クルス
カナダ・ケベック・Ｈ２Ｘ・３Ｐ９・モントリオール・アヴニュ・デュ・パルク・３５７６・スイート・４３１０・キソジ・バイオテクノロジー・インコーポレイテッド内
(72)発明者　デイヴィッド・エス・ヤング
カナダ・ケベック・Ｈ２Ｘ・３Ｐ９・モントリオール・アヴニュ・デュ・パルク・３５７６・スイート・４３１０・キソジ・バイオテクノロジー・インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考）　4B065　AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C076　CC41 EE59 FF31
4C085　AA13 BB11 EE01
4H045　AA11 AA30 BA10 BA41 BA50 BA60 DA76 EA20 FA74