(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-538141
(P2024-538141A)
(43)公表日　令和6年10月18日(2024.10.18)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46	ZNA	4B064	
C07K	*16/30*	*(2006.01)*	C07K	16/30		4B065	
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		4C085	
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4H045	
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15			

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全103頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-522609(P2024-522609)
(86)(22)出願日　令和4年10月14日(2022.10.14)
(85)翻訳文提出日　令和6年5月24日(2024.5.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2022/078160
(87)国際公開番号　WO2023/064929
(87)国際公開日　令和5年4月20日(2023.4.20)
(31)優先権主張番号　63/256,417
(32)優先日　令和3年10月15日(2021.10.15)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/370,897
(32)優先日　令和4年8月9日(2022.8.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

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

(54)【発明の名称】　活性化可能なポリペプチド複合体

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

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）であって、
（ａ）（ｉ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、前記ＶＨ１と前記ＶＬ１が一緒になって第１の標的に特異的に結合する第１の標的化ドメインを形成する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）、（ｉｉｉ）第１の切断可能部分（ＣＭ１）；（ｉｖ）第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、及び（ｖ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、を含む第１のポリペプチドと；
（ｂ）（ｉ）第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）であって、前記ＶＨ２と前記ＶＬ２が一緒になって第２の標的に特異的に結合する第２の標的化ドメインを形成する、前記ＶＬ２、（ｉｉ）第２のマスキング部分（ＭＭ２）、及び（ｉｉｉ）第２の切断可能部分（ＣＭ２）、を含む第２のポリペプチドと；
（ｃ）（ｉ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）を含み、かつ（ｉｉ）免疫グロブリン可変ドメインを含まない、第３のポリペプチドと、
を含み、
ＭＭ１が、前記第１の標的への前記第１の標的化ドメインの結合を妨げるペプチドであり、ＭＭ２が、前記第２の標的への前記第２の標的化ドメインの結合を妨げるペプチドである、
前記活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）。
【請求項２】
前記第１の標的がＴ細胞抗原ポリペプチドであり、前記第２の標的ががん細胞表面抗原である、請求項１に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３】
前記第１の標的ががん細胞表面抗原であり、前記第２の標的がＴ細胞抗原ポリペプチドである、請求項１に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項４】
前記Ｔ細胞抗原ポリペプチドがＣＤ３のε鎖である、請求項１～３のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項５】
前記第１のポリペプチドが、前記がん細胞表面抗原標的化ドメインＶＨ２と前記単量体Ｆｃドメインとの間に重鎖ＣＨ１ドメインをさらに含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項６】
前記第１のポリペプチドが、前記ＣＨ１ドメインと前記第１の単量体Ｆｃドメインの間に免疫グロブリンヒンジ領域（ＨＲ１）をさらに含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項７】
前記第１のポリペプチドが、
ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ－ＶＨ２－ＣＨ１－ＨＲ１－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、それぞれの「－」が独立して直接的または間接的な連結である、請求項６に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項８】
前記第２のポリペプチドが、軽鎖定常ドメインＣＬ１をさらに含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項９】
前記第２のポリペプチドが、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２－ＣＬ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含む、請求項８に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項１０】

前記第３のポリペプチドが、免疫グロブリンヒンジ領域（ＨＲ２）をさらに含む、請求項１～９のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項１１】
前記第３のポリペプチドが、ＨＲ２－Ｆｃ２のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含む、請求項１～１０のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項１２】
前記第１のポリペプチドのＨＲ１と前記第２のポリペプチドのＨＲ２が、同じアミノ酸配列を含む、請求項６または請求項１０に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項１３】
前記第１のポリペプチドのＨＲ１と前記第２のポリペプチドのＨＲ２が、異なるアミノ酸配列を含む、請求項６または請求項１０に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項１４】
前記第１、第２、及び／または第３のポリペプチドが、１つ以上のリンカーを含む、請求項１～１３のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項１５】
以下の：
（ａ）ＭＭ１とＣＭ１の間；
（ｂ）ＭＭ２とＣＭ２の間；
（ｂ）ｓｃＦｖの重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインの間；
（ｃ）重鎖可変ドメインとＣＨ１ドメインの間；
（ｄ）ＣＨ１ドメインとヒンジ領域の間；
（ｅ）ヒンジ領域とＦｃドメインの間；
（ｇ）ＣＭ２と軽鎖可変ドメインの間；
（ｈ）軽鎖可変ドメインとＣＬの間；
（ｉ）ＣＨ１ドメインと第２のＦｃドメインの間；
（ｊ）ＣＨ１ドメインとヒンジ領域の間；及び／または
（ｋ）ヒンジ領域と第２のＦｃドメインの間、
の位置のうちの１つ以上にリンカーを含む、請求項１４に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項１６】
前記リンカー（複数可）が約１アミノ酸～約２０アミノ酸を含む、請求項１４または１５に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項１７】
ＭＭ１がリンカーＬ１を介してＣＭ１に連結される、請求項１～１６のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項１８】
ＭＭ２がリンカーＬ２を介してＣＭ２に連結される、請求項１～１６のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項１９】
前記活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体が、Ｌ１とＬ２の両方を含む、請求項１７または１８のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２０】
ＭＭ２がリンカーＬ３を介してＣＭ２に連結され、ＣＭ２がリンカーＬ４を介してｓｃＦｖに連結される、請求項１９に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２１】
Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、及び／またはＬ４のアミノ酸配列が同一である、請求項１４～２０のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項２２】
ＬＬ１、Ｌ２、Ｌ３、及び／またはＬ４のうちの少なくとも１つのアミノ酸配列が異なる、請求項１４～２０のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２３】
ＣＭ１のアミノ酸配列とＣＭ２のアミノ酸配列が同一である、請求項１～２２のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２４】
ＣＭ１のアミノ酸配列とＣＭ２のアミノ酸配列が異なる、請求項１～２２のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２５】
ＣＭ１とＣＭ２がそれぞれ、腫瘍微小環境に存在するプロテアーゼの基質を含む、請求項１～２５のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２６】
ＣＭ１とＣＭ２がそれぞれ独立して、同じプロテアーゼの基質を含む、請求項１～２５のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２７】
ＣＭ１とＣＭ２が、異なるプロテアーゼの基質を含む、請求項１～２５のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２８】
ＣＭ１とＣＭ２がそれぞれ独立して、表３に示されるプロテアーゼの群から選択されるプロテアーゼの基質を含む、請求項２３～２７のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項２９】
ＣＭ１とＣＭ１のうちの少なくとも１つが、セリンプロテアーゼまたはマトリックスメタロペプチダーゼ（ＭＭＰ）からなる群から選択されるプロテアーゼの基質を含む、請求項２３～２７のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３０】
ＣＭ１及び／またはＣＭ２が、配列番号２、配列番号１４、配列番号７３～１１１、または配列番号１５６～１５９のアミノ酸配列を含む、請求項１～２９のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３１】
前記ＭＭ１及び／または前記ＭＭ２が、約５個のアミノ酸～約４０個のアミノ酸を含む、請求項１～３０のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項３２】
それぞれのリンカーが独立して：
（ｉ）（ＧＳ）ｎ（式中、ｎは１～１０の整数である）、（ＧＧＳ）ｎ（式中、ｎは少なくとも１の整数である）、（ＧＧＧＳ）ｎ（配列番号４０）、（ＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号１２６）（式中、ｎは少なくとも１の整数である）、（式中、ｎは少なくとも１の整数である）、（ＧＳＧＧＳ）ｎ（配列番号４１）（式中、ｎは少なくとも１の整数である）、ＧＳＳＧＧＳＧＧＳＧ（配列番号１２）、ＧＧＳＧ（配列番号４２）、ＧＧＳＧＧ（配列番号４３）、ＧＳＧＳＧ（配列番号４４）、ＧＳＧＧＧ（配列番号４５）、ＧＧＧＳＧ（配列番号４６）、及びＧＳＳＳＧ（配列番号４７）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号４８）、ＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号４９）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５０）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５１）、ＧＧＧＧＳ（配列番号５２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５３）、ＧＧＧＳ（配列番号５４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号５５）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号５６）、ＧＳＳＧＧＳＧＧＳＧ（配列番号５７）、ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５８）、ＧＧＧＳＳＧＧＳ（配列番号１２７）、及びＧＳからなる群から選択されるグリシン－セリンベースのリンカー；ならびに（ｉｉ）ＧＳＴＳ

ＧＳＧＫＰＧＳＳＥＧＳＴ（配列番号５９）、ＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣＰＡＰＥＦＬＧ（配列番号６０）、ＧＧＳＬＤＰＫＧＧＧＧＳ（配列番号６１）、ＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ（配列番号６２）、ＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＳ（配列番号６３）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＫＧ（配列番号６４）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＳＧＳＴＫＧ（配列番号６５）、及びＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＧＥＧＳＴＫＧ（配列番号６６）からなる群から選択される、グリシン及びセリン、ならびにリジン、トレオニン、またはプロリンのうちの少なくとも１つを含むリンカー
からなる群から選択される、請求項１５～３１のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項３３】

前記第１のポリペプチドが、配列番号３４のアミノ酸配列を有するヒンジ（ヒンジ１）を含む、請求項１～３２のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項３４】

前記第２のポリペプチドが、配列番号３５のアミノ酸配列を有するヒンジ（ヒンジ２）を含む、請求項１～３３のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。

【請求項３５】

請求項１～３４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体と薬学的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。

【請求項３６】

水と、請求項１～３４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体と、を含む組成物。

【請求項３７】

５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または最大９９％の水を含む、請求項３６に記載の組成物。

【請求項３８】

請求項３５に記載の医薬組成物または請求項３６に記載の組成物を含むキット。

【請求項３９】

請求項１～３４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体の前記第１のポリペプチド、前記第２のポリペプチド、及び／または前記第３のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。

【請求項４０】

請求項１～３４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体の前記第１のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。

【請求項４１】

請求項１～３４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体の前記第２のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。

【請求項４２】

請求項１～３４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体の前記第３のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。

【請求項４３】

請求項３９～４２のいずれか１項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項４４】

請求項４３に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項４５】

活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体を産生する方法であって：
（ａ）請求項４４に記載の宿主細胞を、前記活性化可能なＨＢＰＣを生成するのに十分な条件下で、液体培地中で培養することと；
（ｂ）前記活性化可能なＨＢＰＣを回収することと、

を含む、前記方法。
【請求項４６】
対象の疾患を治療する方法であって、請求項１～３４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体または請求項３５もしくは３６に記載の医薬組成物の治療有効量を前記対象に投与することを含む、前記方法。
【請求項４７】
前記対象がヒトである、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記疾患ががんである、請求項４６または４７に記載の前記方法。
【請求項４９】
腫瘍増殖の阻害を必要とする対象での腫瘍増殖の阻害における使用のための、請求項１～３４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体または請求項３５に記載の医薬組成物または請求項３６に記載の組成物。
【請求項５０】
がんを治療するための医薬の製造における、請求項１～３４のいずれか１項に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体または請求項３５に記載の医薬組成物または請求項３６に記載の組成物の使用。
【請求項５１】
活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体であって、
（ａ）（ｉ）単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）であって、前記ｓｃＦｖが、第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、ＶＨ１とＶＬ１が一緒になってＴ細胞抗原ポリペプチドに特異的に結合するＴ細胞抗原標的化ドメインを形成する前記ｓｃＦｖ、（ｉｉ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）、（ｉｉｉ）第１の切断可能部分（ＣＭ１）；（ｉｖ）第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、（ｖ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、（ｖｉ）重鎖ＣＨ１ドメイン、及び（ｖｉｉ）前記ＣＨ１ドメインと前記Ｆｃ１の間の免疫グロブリンヒンジ領域を含む、第１のポリペプチドと；
（ｂ）（ｉ）前記ＶＨ２と対形成する場合にがん細胞表面抗原に特異的に結合する第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）、（ｉｉ）第２のマスキング部分（ＭＭ２）、（ｉｉｉ）第２の切断可能部分（ＣＭ２）、及び（ｉｖ）軽鎖定常ドメインＣＬ１を含む、第２のポリペプチドと；
（ｃ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）及び免疫グロブリンヒンジ領域（ＨＲ２）を含み、免疫グロブリン可変ドメインを含まない、第３のポリペプチドと；
を含み、
前記第１のポリペプチドが、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ１－ＶＨ２－ＣＨ１－ＨＲ１－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み；
前記第２のポリペプチドが、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２－ＣＬ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み；
前記第３のポリペプチドが、ＨＲ２－Ｆｃ２のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を有し、それぞれの「－」は独立して直接的または間接的な連結である、前記活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体。
【請求項５２】
活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）であって、
（ａ）（ｉ）がん細胞表面抗原に特異的に結合する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）、及び（ｉｉｉ）第１の切断可能部分（ＣＭ１）；（ｉｖ）重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、（ｖ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、（ｖｉ）重鎖ＣＨ１ドメイン、及び（ｖｉｉ）前記ＣＨ１ドメインと前記第１の単量体Ｆｃドメインの間の免疫グロブリンヒンジ領域、を含むがん細胞表面抗原標的化ドメインを含む、第１のポリペプチドと；
（ｂ）（ｉ）前記第１のポリペプチドのＶＨ２と対形成する場合にＴ細胞抗原ポリペプチドに特異的に結合する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）、（ｉｉ）第２のマスキング部分（Ｍ

Ｍ２）、（ｉｉｉ）第２の切断可能部分（ＣＭ２）、及び（ｉｖ）軽鎖定常ドメインＣＬ１、を含む第２のポリペプチドと；
（ｃ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）及び免疫グロブリンヒンジ領域を含む、第３のポリペプチドと；
を含み、
前記第１のポリペプチドが、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ１－ＶＨ２－ＣＨ１－ＨＲ１－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み；
前記第２のポリペプチドが、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２－ＣＬ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み；
前記第３のポリペプチドが、ＨＲ２－Ｆｃ２のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を有し、それぞれの「－」が独立して直接的または間接的な連結であり、前記第３のポリペプチドが、免疫グロブリン可変ドメインを含まない、前記活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）。
【請求項５３】
活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）であって、
（ａ）（ｉ）がん細胞表面抗原に特異的に結合する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）、及び（ｉｉｉ）第１の切断可能部分（ＣＭ１）；及び重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、（ｉｖ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、（ｖ）重鎖ＣＨ１ドメイン、及び前記ＣＨ１ドメインと（ｖｉｉ）前記第１の単量体Ｆｃドメインの間の免疫グロブリンヒンジ領域、を含む第１のポリペプチドと；
（ｂ）（ｉ）前記第１のポリペプチドのＶＨ２と対形成する場合にＴ細胞抗原ポリペプチドに特異的に結合する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）、（ｉｉ）第２のマスキング部分（ＭＭ２）、（ｉｉｉ）第２の切断可能部分（ＣＭ２）、及び（ｉｖ）軽鎖定常ドメインＣＬ１を含む、第２のポリペプチドと；
（ｃ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）及び免疫グロブリンヒンジ領域からなる、第３のポリペプチドと；
を含み、
前記第１のポリペプチドが、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ１－ＶＨ２－ＣＨ１－ＨＲ１－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を有し；
前記第２のポリペプチドが、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２－ＣＬ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を有し；
前記第３のポリペプチドが、ＨＲ２－Ｆｃ２のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を有し、それぞれの「－」が独立して直接的または間接的な連結であり、前記第３のポリペプチドが、免疫グロブリン可変ドメインを含まない、前記活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）。
【請求項５４】
ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）であって、
（ａ）（ｉ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、前記ＶＨ１と前記ＶＬ１が一緒になって第１の標的に特異的に結合する第１の標的化ドメインを形成する、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、及び（ｉｉｉ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、を含む第１のポリペプチドと、
（ｂ）第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）を含み、前記ＶＨ２と前記ＶＬ２が一緒になって、第２の標的に特異的に結合する第２の標的化ドメインを形成する、第２のポリペプチドと、
（ｃ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）を含み、免疫グロブリン可変ドメインを含まない、第３のポリペプチドと、
を含む、前記ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０２１年１０月１５日に出願された米国仮出願第６３／２５６，４１７号及び２０２２年８月９日に出願された米国仮出願第６３／３７０，８９７号の優先権の権益を主張し、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
ＥＦＳ　ＷＥＢ経由で電子的に提出された配列表への参照
本出願で提出された電子的に提出された配列表（４６８１＿００２ＰＣ０２＿Ｓｅｑｌｉｓｔｉｎｇ＿ＳＴ２６．ｘｍｌ、サイズ：１９０，１９３バイト、作成日：２０２２年１０月１３日）の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００３】
本開示は、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）ならびにその製造方法及び使用方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
腫瘍抗原特異的Ｔ細胞の生成と活性化は、腫瘍退縮の発生と媒介の免疫媒介の制御に関与している。これには、複数のＴ細胞共刺激受容体と負のＴ細胞調節因子、または共抑制受容体が協調して作用して、Ｔ細胞の活性化、増殖、エフェクター機能の獲得または喪失を制御することが必要である。しかしながら、腫瘍細胞には多数の免疫回避機構があるため、がん患者では腫瘍特異的Ｔ細胞応答を開始して維持することが困難である。しかしながら、Ｔ細胞をがん治療に利用する試みがなされてきた。このようなアプローチとしては、がん細胞上の表面標的抗原に結合し、さらにＴ細胞上のＣＤ３などのＴ細胞表面ポリペプチドにも結合するＴ細胞誘導二重特異性抗体の使用が挙げられる。一般に、それぞれの標的に結合することにより、Ｔ細胞誘導二重特異性はＴ細胞をがん細胞に物理的に近接させ、細胞傷害性Ｔ細胞タンパク質及び酵素が腫瘍細胞を攻撃してアポトーシスを引き起こし、それによってがん細胞を殺傷することができる。
【０００５】
がんの治療には潜在的に有望な種類の治療薬であるが、オンターゲットの腫瘍外毒性及び製造上の課題など、克服すべきハードルがある。したがって、安全性プロファイルが改善され、製造可能性も改善された免疫療法の選択肢が必要とされている。
【発明の概要】
【０００６】
本明細書では、（ａ）（ｉ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、ＶＨ１とＶＬ１が一緒になって第１の標的に特異的に結合する第１の標的化ドメインを形成する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）、（ｉｉｉ）第１の切断可能部分（ＣＭ１）；（ｉｖ）第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、及び（ｖ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、を含む第１のポリペプチドと；（ｂ）（ｉ）第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）であって、ＶＨ２とＶＬ２が一緒になって第２の標的に特異的に結合する第２の標的化ドメインを形成するＶＬ２、（ｉｉ）第２のマスキング部分（ＭＭ２）、及び（ｉｉｉ）第２の切断可能部分（ＣＭ２）、を含む第２のポリペプチドと；（ｃ）（ｉ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）を含み、かつ（ｉｉ）免疫グロブリン可変ドメインを含まない、第３のポリペプチドと、を含む、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）が提供される。いくつかの態様では、第１の標的はＴ細胞抗原ポリペプチドであり、第２の標的はがん細胞表面抗原である。いくつかの態様では、第１の標的はがん細胞表面抗原であり、第２の標的はＴ細胞抗原ポリペプチドである。いくつかの態様では、Ｔ細胞抗原ポリペプチドは、ＣＤ３のイプシロン鎖である。
【０００７】
いくつかの態様では、第１のポリペプチドは、抗原標的化ドメインＶＨ２と単量体Ｆｃドメインとの間に重鎖ＣＨ１ドメインをさらに含む。

【０００８】
いくつかの態様では、第１のポリペプチドは、ＣＨ１ドメインと第１の単量体Ｆｃドメインとの間に免疫グロブリンヒンジ領域（ＨＲ１）をさらに含む。
【０００９】
いくつかの態様では、第１のポリペプチドは、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ－ＶＨ２－ＣＨ１－ＨＲ１－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、それぞれの「－」は独立して直接的または間接的な連結である。
【００１０】
本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、第２のポリペプチドは軽鎖定常ドメインＣＬ１をさらに含む。いくつかの態様では、第２のポリペプチドは、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２－ＣＬ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、それぞれの「－」は独立して直接的または間接的な連結である。
【００１１】
本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、第３のポリペプチドは免疫グロブリンヒンジ領域（ＨＲ２）をさらに含む。いくつかの態様では、第３のポリペプチドは、ＨＲ２－Ｆｃ２のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、「－」は直接的または間接的な連結である。
【００１２】
本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、第１のポリペプチドのＨＲ１と第２のポリペプチドのＨＲ２は同じアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、第１のポリペプチドのＨＲ１と第２のポリペプチドのＨＲ２は、異なるアミノ酸配列を含む。
【００１３】
本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、第１、第２、及び／または第３のポリペプチドは、１つ以上のリンカーを含む。
【００１４】
いくつかの態様では、活性化可能なＨＢＰＣは、以下の位置の１つ以上にリンカーを含む：（ａ）ＭＭ１とＣＭ１の間；（ｂ）ＭＭ２とＣＭ２の間；（ｂ）ｓｃＦｖの重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインの間；（ｃ）重鎖可変ドメインとＣＨ１ドメインの間；（ｄ）ＣＨ１ドメインとヒンジ領域の間；（ｅ）ヒンジ領域とＦｃドメインの間；（ｇ）ＣＭ２と軽鎖可変ドメインの間；（ｈ）軽鎖可変ドメインとＣＬの間；（ｉ）ＣＨ１ドメインと第２のＦｃドメインの間；（ｊ）ＣＨ１ドメインとヒンジ領域の間；及び／または（ｋ）ヒンジ領域と第２のＦｃドメインの間。いくつかの態様では、リンカー（複数可）は、約１～約２０個のアミノ酸を含む。
【００１５】
本明細書に記載される活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、ＭＭ１は、リンカーＬ１を介してＣＭ１に連結される。いくつかの態様では、ＭＭ２は、リンカーＬ２を介してＣＭ２に連結される。いくつかの態様では、活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体は、Ｌ１とＬ２の両方を含む。いくつかの態様では、ＭＭ２はリンカーＬ３を介してＣＭ２に連結され、ＣＭ２はリンカーＬ４を介してｓｃＦｖに連結される。いくつかの態様では。
【００１６】
本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、及び／またはＬ４のアミノ酸配列は同じである。いくつかの態様では、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、及び／またはＬ４のうちの少なくとも１つのアミノ酸配列が異なる。
【００１７】
本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、ＣＭ１のアミノ酸配列とＣＭ２のアミノ酸配列は同じである。いくつかの態様では、ＣＭ１のアミノ酸配列とＣＭ２のアミノ酸配列は異なる。
【００１８】

本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、ＣＭ１とＣＭ２はそれぞれ、腫瘍微小環境に存在するプロテアーゼの基質を含む。いくつかの態様では、ＣＭ１とＣＭ２はそれぞれ独立して、同じプロテアーゼの基質を含む。いくつかの態様では、ＣＭ１とＣＭ２は、異なるプロテアーゼの基質を含む。いくつかの態様では、ＣＭ１とＣＭ２は、それぞれ独立して、表３に示されるプロテアーゼの群から選択されるプロテアーゼの基質を含む。いくつかの態様では、ＣＭ１とＣＭ２の少なくとも１つは、セリンプロテアーゼ及びマトリックスメタロペプチダーゼ（ＭＭＰ）からなる群から選択されるプロテアーゼの基質を含む。いくつかの態様では、ＣＭ１及び／またはＣＭ２は、配列番号２、配列番号１４、配列番号７３～１１１、または配列番号１５６～１５９のアミノ酸配列を含む。

【００１９】

本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、ＭＭ１及び／またはＭＭ２は、約５個のアミノ酸～約４０個のアミノ酸を含む。

【００２０】

本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、それぞれのリンカーは以下からなる群から独立して選択される：（ｉ）（ＧＳ）ｎ（式中、ｎは少なくとも１の整数であり、いくつかの態様では、ｎは１～１０の整数である）、（ＧＧＳ）ｎ（式中、ｎは少なくとも１の整数であり、いくつかの態様では、ｎは１～１０の整数である）、（ＧＧＧＳ）ｎ（配列番号４０）（式中、ｎは少なくとも１の整数であり、いくつかの態様では、ｎは１～１０の整数である）、（ＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号１２６）（式中、ｎは少なくとも１の整数である）、（ＧＳＧＧＳ）ｎ（配列番号４１）（式中、ｎは少なくとも１の整数であり、いくつかの態様では、ｎは１～１０の整数である）、ＧＳＳＧＧＳＧＧＳＧ（配列番号１２）、ＧＧＳＧ（配列番号４２）、ＧＧＳＧＧ（配列番号４３）、ＧＳＧＳＧ（配列番号４４）、ＧＳＧＧＧ（配列番号４５）、ＧＧＧＳＧ（配列番号４６）、及びＧＳＳＳＧ（配列番号４７）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号４８）、ＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号４９）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５０）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５１）、ＧＧＧＧＳ（配列番号５２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５３）、ＧＧＧＳ（配列番号５４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号５５）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号５６）、ＧＳＳＧＧＳＧＧＳＧＧ（配列番号５７）、ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５８）、ＧＧＧＳＳＧＧＳ（配列番号１２７）、及びＧＳからなる群から選択されるグリシン－セリンベースのリンカー；ならびに（ｉｉ）グリシン及びセリン、ならびにリジン、トレオニン、またはプロリンのうちの少なくとも１つを含むリンカー、例えば、ＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＳＥＧＳＴ（配列番号５９）、ＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣＰＡＰＥＦＬＧ（配列番号６０）、ＧＧＳＬＤＰＫＧＧＧＧＳ（配列番号６１）、ＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ（配列番号６２）、ＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＳ（配列番号６３）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＫＧ（配列番号６４）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＳＧＳＴＫＧ（配列番号６５）、及びＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＧＥＧＳＴＫＧ（配列番号６６）からなる群から選択されるリンカー。

【００２１】

本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、第１のポリペプチドは、配列番号３４のアミノ酸配列を有するヒンジ（ＨＲ）（ヒンジ１）を含む。本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、第２のポリペプチドは、配列番号３５のアミノ酸配列を有するヒンジ（ＨＲ）（ヒンジ２）を含む。

【００２２】

また、本明細書では、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣと、薬学的に許容される担体と、を含む組成物も提供される。いくつかの態様では、組成物は水と、活性化可能なＨＢＰＣと、を含む。いくつかの態様では、組成物は、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または最大９９％の水を含む。

【００２３】
本明細書に記載の医薬組成物を含むキットも本明細書で提供される。
【００２４】
また、本明細書では、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣの第１のポリペプチド、第２のポリペプチド、及び／または第３のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸も提供される。いくつかの態様では、活性化可能なＨＢＰＣの第１のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸が提供される。いくつかの態様では、活性化可能なＨＢＰＣの第２のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸が提供される。いくつかの態様では、活性化可能なＨＢＰＣの第３のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸が提供される。本明細書に記載の核酸を含むベクターも本明細書に提供される。また、本明細書では、本明細書に記載のベクターを含む宿主細胞も提供される。
【００２５】
また、本明細書では、活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体を生成する方法であって、（ａ）活性化可能なＨＢＰＣを生成するのに十分な条件下で宿主細胞を液体培地中で培養することと；（ｂ）活性化可能なＨＢＰＣを回収することと、を含む方法も提供される。
【００２６】
また、本明細書では、治療有効量の活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）またはその医薬組成物を対象に投与することを含む、対象における疾患を治療する方法も提供される。いくつかの態様では、対象はヒトである。いくつかの態様では、疾患はがんである。
【００２７】
また、本明細書では、腫瘍増殖の阻害を必要とする対象における腫瘍増殖の阻害に使用するための、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）及びその医薬組成物も提供される。
【００２８】
また、本明細書では、がんを治療するための医薬の製造に使用するための、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）及びその医薬組成物も提供される。
【００２９】
また、本明細書では：（ａ）（ｉ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、ＶＨ１とＶＬ１が一緒になってＴ細胞抗原ポリペプチドに特異的に結合するＴ細胞抗原標的化ドメインを形成する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）、（ｉｉｉ）第１の切断可能部分（ＣＭ１）、（ｉｉｉ）軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）と対形成する場合にがん細胞表面抗原に特異的に結合する重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、（ｉｖ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、（ｖ）重鎖ＣＨ１ドメイン、及び（ｖｉ）ＣＨ１ドメインとＦｃ１の間の免疫グロブリンヒンジ領域、を含む第１のポリペプチドと；（ｂ）（ｉ）ＶＨ２と対形成する場合にがん細胞表面抗原に特異的に結合する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）、（ｉｉ）第２のマスキング部分（ＭＭ２）、（ｉｉｉ）第２の切断可能部分（ＣＭ２）、及び（ｉｖ）軽鎖定常ドメインＣＬ１、を含む第２のポリペプチドと；（ｃ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）及び免疫グロブリンヒンジ領域（ＨＲ２）を含む第３のポリペプチドと、を含み、第３のポリペプチドが免疫グロブリン可変ドメインを含まず、第１のポリペプチドが、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ１－ＶＨ２－ＣＨ１－ＨＲ１－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、第２のポリペプチドが、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２－ＣＬ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、第３のポリペプチドが、ＨＲ２－Ｆｃ２のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、それぞれの「－」が独立して直接的または間接的な連結である、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）も提供される。

【００３０】
また、本明細書では：（ａ）（ｉ）がん細胞表面抗原に特異的に結合する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）、（ｉｉｉ）第１の切断可能部分（ＣＭ１）、（ｉｖ）第２のポリペプチドの軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）と対形成する場合にＴ細胞抗原ポリペプチドに特異的に結合する重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、（ｖ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、（ｖｉ）重鎖ＣＨ１ドメイン、及び（ｖｉｉ）ＣＨ１ドメインと第１の単量体Ｆｃドメインの間の免疫グロブリンヒンジ領域（ＨＲ１）、を含む第１のポリペプチドと；（ｂ）（ｉ）第１のポリペプチドのＶＨ２と対形成する場合にＴ細胞抗原ポリペプチドに特異的に結合する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）、（ｉｉ）第２のマスキング部分（ＭＭ２）、（ｉｉｉ）第２の切断可能部分（ＣＭ２）、及び（ｉｖ）軽鎖定常ドメインＣＬ１、を含む第２のポリペプチドと；（ｃ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）及び免疫グロブリンヒンジ領域（ＨＲ２）を含む第３のポリペプチドと、を含み、第１のポリペプチドが、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ１－ＶＨ２－ＣＨ１－ＨＲ１－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、第２のポリペプチドが、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２－ＣＬ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、第３のポリペプチドが、ＨＲ２－Ｆｃ２のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、それぞれの「－」が直接的または間接的な連結を表し、第３のポリペプチドが、免疫グロブリン可変ドメインを含まない、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）も提供される。

【００３１】
また、本明細書では：（ａ）（ｉ）がん細胞表面抗原に特異的に結合する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）、及び（ｉｉｉ）第１の切断可能部分（ＣＭ１）、及び重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、（ｉｉｉ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、重鎖ＣＨ１ドメイン、及びＣＨ１ドメインと第１の単量体Ｆｃドメインの間の免疫グロブリンヒンジ領域（ＨＲ１）、を含む第１のポリペプチドと；（ｂ）（ｉ）第１のポリペプチドのＶＨ２と対形成する場合にＴ細胞抗原ポリペプチドに特異的に結合する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）、（ｉｉ）第２のマスキング部分（ＭＭ２）、（ｉｉｉ）第２の切断可能部分（ＣＭ２）、及び軽鎖定常ドメインＣＬ１、を含む第２のポリペプチドと；（ｃ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）及び免疫グロブリンヒンジ領域（ＨＲ２）からなる第３のポリペプチドと、を含み、第１のポリペプチドが、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ１－ＶＨ２－ＣＨ１－ＨＲ１－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を有し、第２のポリペプチドが、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２－ＣＬ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を有し、第３のポリペプチドが、ＨＲ２－Ｆｃ２のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を有し、それぞれの「－」が独立して直接的または間接的な連結であり、第３のポリペプチドが、免疫グロブリン可変ドメインを含まない、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）も提供される。

【００３２】
また、本明細書では：（ａ）（ｉ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、ＶＨ１とＶＬ１が一緒になって第１の標的に特異的に結合する第１の標的化ドメインを形成する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、及び（ｉｉｉ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、を含む第１のポリペプチドと；（ｂ）第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）を含み、ＶＨ２とＶＬ２が一緒になって第２の標的に特異的に結合する第２の標的化ドメインを形成する、第２のポリペプチドと；（ｃ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）を含み、かつ免疫グロブリン可変ドメインを含まない第３のポリペプチドと、を含む、ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）が提供される。

【図面の簡単な説明】

【００３３】
【図１】本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣの概略図である。

【図２Ａ】ＣＩ１０６（活性化可能なダブルアーム、二価抗ＣＤ３、抗ＥＧＦＲ二重特異性抗体対照）、複合体－５７（活性化可能なＨＢＰＣ）、及び複合体－６７（活性化可能なＨＢＰＣ）、ならびに活性化されたＣＩ１０６、活性化された複合体－５７、及び活性化された複合体－６７によるＥＧＦＲへの結合を示す。
【図２Ｂ】ＣＩ１０６（対照）、複合体－５７（活性化可能なＨＢＰＣ）、複合体－６７（活性化可能なＨＢＰＣ）、ならびに活性化されたＣＩ１０６、活性化された複合体－５７、及び活性化された複合体－６７によるＣＤ３への結合を示す。
【図３Ａ】活性化されたＣＩ１０６（対照）、複合体－５７、及び複合体－６７、ならびにＣＩ１０６（ダブルアーム、二価二重特異性対照構築物）、及び複合体－５７での処理後のＨＴ２９細胞に対する細胞傷害性を示す。
【図３Ｂ】ＣＩ１０６（対照）、複合体－６７、活性化されたＣＩ１０６（対照）、及び活性化された複合体－６７での処理後のＨＴ２９細胞に対する細胞傷害性を示す。
【図４】ビヒクル、１．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０６（対照）、ならびに０．２、０．６、及び１．８ｍｇ／ｋｇの複合体－６７での処置後の、ＨＴ２９－ｌｕｃ２異種移植片腫瘍モデルにおける腫瘍体積を時間の関数として示す。
【図５】ビヒクル、０．３ｍｇ／ｋｇ、及び１ｍｇ／ｋｇの活性化された複合体－６７及び複合体－６７での処置後の、ＨＣＴ１１６異種移植片腫瘍モデルにおける腫瘍体積を時間の関数として示す。
【図６】ＣＩ１０６（対照）、複合体－５７、及び複合体－６７の濃度に対する単量体のパーセンテージ（％）を示す。
【図７】マスクされた活性化可能なＨＢＰＣ（複合体－３３９）、マスクされていない活性化可能なＨＢＰＣ対照（複合体－３４２）、代替フォーマット２の活性化可能なポリペプチド（複合体－２３１）、及び代替フォーマット２のマスクされていない対照ポリペプチド（複合体－１６４）の細胞溶解のパーセンテージとして細傷害性を示す。
【図８】Ａ～Ｃは、ＨＴ２９細胞（Ａ）、ＨＣＴ１１６細胞（Ｂ）、またはＪｕｒｋａｔ細胞（Ｃ）の表面上に発現するＥＧＦＲ及びＣＤ３へのＣＩ１０７結合のフローサイトメトリー評価を示す。見かけのＫｄは、ＨＴ２９細胞での２重の実験とＪｕｒｋａｔ細胞での３重の実験から計算された。
【図９Ａ】ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞におけるＣＩ１０７によって媒介される細胞傷害性のパーセントを示す。４８時間の培養後、ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２の生存率及び細胞傷害性を未処理の対照と比較して測定した。
【図９Ｂ】ＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞におけるＣＩ１０７によって媒介される細胞傷害性のパーセントを示す。４８時間の培養後、ＨＴ２９－Ｌｕｃ２の生存率及び細胞傷害性を未処理の対照と比較して測定した。
【図９Ｃ】ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞におけるＣＩ１０７によって媒介される細胞傷害性のパーセントを示す。１６時間の培養後、ＣＤ６９発現をフローサイトメトリーで測定した。ＭＦＩ、平均蛍光強度。
【図９Ｄ】ＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞におけるＣＩ１０７によって媒介される細胞傷害性のパーセントを示す。１６時間の培養後、ＣＤ６９発現をフローサイトメトリーで測定した。ＭＦＩ、平均蛍光強度。
【図１０Ａ】１６時間の培養後に測定された、ＣＩ１０７での処理後のサイトカイン（ＩＦＮ－γ）放出を示す。
【図１０Ｂ】１６時間の培養後に測定された、ＣＩ１０７での処理後のサイトカイン（ＩＬ－２）放出を示す。
【図１０Ｃ】１６時間の培養後に測定された、ＣＩ１０７での処理後のサイトカイン（ＩＬ－６）放出を示す。
【図１０Ｄ】１６時間の培養後に測定された、ＣＩ１０７での処理後のサイトカイン（ＭＣＰ－１）放出を示す。
【図１０Ｅ】１６時間の培養後に測定された、ＣＩ１０７での処理後のサイトカイン（ＴＮＦ－α）放出を示す。

【図１１】ＨＴ２９－Ｌｕｃ２腫瘍を有し、ヒトＰＢＭＣが移植されたマウスにおける試験ＴＣＢでの処置後の腫瘍体積を示す。（Ａ）マウスを、ビヒクル（ＰＢＳ）または０．３ｍｇ／ｋｇのＣＩ０２０、ＣＩ０１１、ＣＩ０４０、もしくはＣＩ０４８で３週間、週に１回処置した（１群あたりｎ＝８）。腫瘍体積を週に２回測定した。（Ｂ）ＨＴ２９－Ｌｕｃ２腫瘍を有し、ヒトＰＢＭＣが移植されたＮＳＧマウスを、ビヒクルまたは１ｍｇ／ｋｇのＣＩ０２０、ＣＩ０１１、ＣＩ０４０、もしくはＣＩ０４８で処置した。投与の７日後に腫瘍を採取し、ＣＤ３の免疫組織化学を行った。濃い染色はＣＤ３＋細胞を示す。

【図１２】Ａ～Ｂは、ＨＴ２９（Ａ）及びＨＣＴ１１６（Ｂ）の異種移植片腫瘍における週に１回、３週間のＣＩ１０７による処置後の腫瘍体積を示す。腫瘍体積を週に２回測定した。＊ｐ＜０．５；＊＊ｐ＜０．０１；＊＊＊＊ｐ＜０．０００１。

【図１３】Ａ～Ｂは、ＣＩ１０７の投与８時間後に測定されたＩＬ－６（Ａ）及びＩＦＮ－γ（Ｂ）のレベルを示す。Ｃは、ＣＩ１０７の投与から４８時間後の血清化学分析によって測定されたアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）のレベルを示す（Ｃ）。Ｄは、抗イディオタイプ捕捉及び抗ヒトＦｃ検出を使用するＥＬＩＳＡによって測定されたＡｃｔ－ＣＩ１０７及びＣＩ１０７の血漿濃度を示す。ＣＩ１０７の線は、２．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７を投与された３匹の個々の動物からのデータを表す。Ａｃｔ－ＴＣＢの線は、０．０６ｍｇ／ｋｇまたは０．１８ｍｇ／ｋｇのＡｃｔ－ＴＣＢを投与された単一の動物を表す。

【発明を実施するための形態】

【００３４】

本開示を、より容易に理解することができるように、特定の用語を最初に定義する。本出願で使用される場合、本明細書で明示的に規定されている場合を除き、以下のそれぞれの用語は以下に示す意味を有するものとする。さらなる定義は、本出願全体を通して記載されている。

【００３５】

定義

本明細書で使用される場合、「活性化可能なポリペプチド複合体」という用語は、一緒になって抗原結合領域、マスキング部分（ＭＭ）、及び切断可能部分（ＣＭ）を形成する少なくとも１つの可変重鎖ドメインと少なくとも１つの可変軽鎖ドメインを有するポリペプチドを指す。ここで、ＭＭは、プロテアーゼによって切断可能なＣＭを介して（直接的または間接的に）抗原結合領域に結合している。

【００３６】

「活性化可能な」という用語は、「ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体」または「ＨＢＰＣ」という用語と関連して使用される場合、本明細書では、その結合活性が、ＨＢＰＣの構造に付加された１つ以上のマスキング部分の存在によって損なわれるＨＢＰＣを指す。「活性化された」及び「活性化（ａｃｔ－）」という用語はそれぞれ、活性化されたＨＢＰＣを指すために使用することができる。「活性化された」及び「マスクされていない」という用語は、本明細書では交換可能に使用される。

【００３７】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指す総称である。

【００３８】

本明細書で使用される場合、「Ｔ細胞」という用語は、さまざまな細胞媒介免疫反応に関与する胸腺由来のリンパ球として定義される。本明細書で使用される場合、「制御性Ｔ細胞」という用語は、抑制的な特性を有するＣＤ４$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ＦｏｘＰ３$^{+}$Ｔ細胞を指す。「Ｔｒｅｇ」は、本明細書において使用される制御性Ｔ細胞の略語である。

【００３９】

本明細書で使用される場合、「ヘルパーＴ細胞」という用語は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を指す。ヘルパーＴ細胞は、ＭＨＣクラスＩＩ分子に結合した抗原を認識する。ヘルパーＴ細胞

には、Th_1とTh_2という少なくとも２種類あり、それぞれ異なるサイトカインを産生する。ヘルパーＴ細胞は活性化されるとＣＤ２５$^+$になるが、ＦｏｘＰ３$^+$になるのは一時的にのみである。

【００４０】

本明細書で使用される場合、「細胞傷害性Ｔ細胞」という用語は、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞を指す。細胞傷害性Ｔ細胞は、ＭＨＣクラスＩ分子に結合した抗原を認識する。

【００４１】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗原結合タンパク質（例えば、抗体）を抗原に結合することに関与する、抗原結合タンパク質（例えば、抗体）の重鎖または軽鎖のドメインを指す。抗体などの抗原結合タンパク質の重鎖及び軽鎖の可変領域またはドメイン（それぞれＶＨ及びＶＬ）は、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる、より保存された領域が散在する超可変領域（ＨＶＲ）または相補性決定領域（ＣＤＲ）などの超可変領域（または、配列及び／または構造的に定義されたループの形式が超可変である可能性のある超可変領域）にさらに細分することができる。一般に、それぞれの重鎖可変領域には３つのＨＶＲ（ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、ＨＶＲ－Ｈ３）またはＣＤＲ（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３）があり、それぞれの軽鎖可変領域には３つのＨＶＲ（ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ３）またはＣＤＲ（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３）がある。「フレームワーク領域」及び「ＦＲ」は、重鎖及び軽鎖の可変領域の非ＨＶＲ部分または非ＣＤＲ部分を指すことが当該技術分野で知られている。一般に、それぞれの全長重鎖可変領域には４つのＦＲ（ＦＲ－Ｈ１、ＦＲ－Ｈ２、ＦＲ－Ｈ３、及びＦＲ－Ｈ４）があり、それぞれの全長軽鎖可変領域には４つのＦＲ（ＦＲ－Ｌ１、ＦＲ－Ｌ２、ＦＲ－Ｌ３、及びＦＲ－Ｌ４）がある。それぞれのＶＨ及びＶＬ内では、３つのＨＶＲまたはＣＤＲと４つのＦＲが、典型的にはアミノ末端からカルボキシ末端に次の順序で配置される：ＨＶＲの場合はＦＲ１、ＨＶＲ１、ＦＲ２、ＨＶＲ２、ＦＲ３、ＨＶＲ３、ＦＲ４、または、ＣＤＲの場合はＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ Ｊ．Ｍｏｔ． Ｂｉｏｌ．，１９５，９０１－９１７（１９８７）も参照されたい）。単一のＶＨまたはＶＬドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体を、相補的なＶＬまたはＶＨドメインのライブラリをそれぞれスクリーニングして、抗原に結合する抗体由来のＶＨまたはＶＬドメインを用いて単離してもよい。例えば、Ｐｏｒｔｏｌａｎｏ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：８８０－８８７（１９９３）；Ｃｌａｒｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８（１９９１）を参照されたい。

【００４２】

本明細書で使用される場合、「重鎖可変領域」（ＶＨ）という用語は、重鎖ＨＶＲ－Ｈ１、ＦＲ－Ｈ２、ＨＶＲ－Ｈ２、ＦＲ－Ｈ３、及びＨＶＲ－Ｈ３を含む領域を指す。例えば、重鎖可変領域は、重鎖ＣＤＲ－Ｈ１、ＦＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ２、ＦＲ－Ｈ３、及びＣＤＲ－Ｈ３を含み得る。いくつかの態様では、重鎖可変領域は、ＦＲ－Ｈ１の少なくとも一部及び／またはＦＲ－Ｈ４の少なくとも一部も含む。

【００４３】

本明細書で使用される場合、「重鎖定常領域」という用語は、少なくとも３つの重鎖定常ドメイン、C_H1、C_H2、及びC_H3を含む領域を指す。非限定的な例示的な重鎖定常領域としては、γ、δ、及びαが挙げられる。非限定的な例示的な重鎖定常領域としては、ε及びμも挙げられる。

【００４４】

本明細書で使用される場合、「軽鎖可変領域」（ＶＬ）という用語は、軽鎖ＨＶＲ－Ｌ１、ＦＲ－Ｌ２、ＨＶＲ－Ｌ２、ＦＲ－Ｌ３、及びＨＶＲ－Ｌ３を含む領域を指す。いくつかの態様では、軽鎖可変領域は、軽鎖ＣＤＲ－Ｌ１、ＦＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ２、ＦＲ－Ｌ３、及びＣＤＲ－Ｌ３を含む。いくつかの態様では、軽鎖可変領域は、ＦＲ－Ｌ１及び／またはＦＲ－Ｌ４も含む。

【００４５】
本明細書で使用される場合、「軽鎖定常領域」という用語は、軽鎖定常ドメイン、C_Lを含む領域を指す。非限定的な例示的な軽鎖定常領域としては、λ及びκが挙げられる。
【００４６】
本明細書で使用される場合、「軽鎖」（ＬＣ）という用語は、リーダー配列を伴うまたは伴わない、少なくとも軽鎖可変領域を含むポリペプチドを指す。いくつかの態様では、軽鎖は、軽鎖定常領域の少なくとも一部を含む。本明細書で使用される場合、「全長軽鎖」という用語は、リーダー配列を伴うかまたは伴わない、軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含むポリペプチドを指す。
【００４７】
「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子、または免疫グロブリン（Ｉｇ）分子の免疫学的に活性な部分（すなわち、抗原に特異的に結合する（それと免疫反応する）抗原結合部位を含む分子）を指す。抗体またはポリペプチドの「抗原結合部分」（「抗原結合断片」とも呼ばれる）は、標的抗原に特異的に結合する抗体またはポリペプチドの１つ以上の部分を指す。抗体及び抗原結合部分としては、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、ドメイン抗体、一本鎖抗体、Ｆａｂ及びＦ（ａｂ’）$_2$断片、ｓｃＦｖ、Ｆｄ断片、Ｆｖ断片、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）断片、二重親和性リターゲティング抗体（ＤＡＲＴ）、二重可変ドメイン免疫グロブリン、単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）、及び任意選択で合成リンカーによって結合され得る２つ以上の単離されたＣＤＲの組み合わせ、及びＦａｂ発現ライブラリが挙げられるが、これらに限定されない。非ヒト抗体、例えばラクダ科動物の抗体は、ヒトにおけるその免疫原性を低下させるために、組換え法によってヒト化され得る。
【００４８】
本明細書で特定されるＣＤＲ配列は、Ａｂｈｉｎａｎｄａｎ，Ｋ．Ｒ．ａｎｄ Ｍａｒｔｉｎ，Ａ．Ｃ．Ｒ．（２００８）“Ａｎａｌｙｓｉｓ ａｎｄ ｉｍｐｒｏｖｅｍｅｎｔｓ ｔｏ Ｋａｂａｔ ａｎｄ ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌｌｙ ｃｏｒｒｅｃｔ ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ ｏｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎｓ”，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，４５，３８３２－３８３９に記載されているように、Ｋａｂａｔナンバリングシステム（すなわち、「Ｋａｂａｔ ＣＤＲ」）に従って決定され、この内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。Ｋａｂａｔ ＣＤＲは、ＣＤＲ－Ｌ１：残基Ｌ２４～Ｌ３４；ＣＤＲ－Ｌ２：残基Ｌ５０～Ｌ５６；ＣＤＲ－Ｌ３：残基Ｌ８９～Ｌ９７；ＣＤＲ－Ｈ１：残基Ｈ３１～Ｈ３５；ＣＤＲ－Ｈ２：残基Ｈ５０～Ｈ６５；及びＣＤＲ－Ｈ３：残基Ｈ９５～Ｈ１０２として定義され、ここで、「Ｌ」は軽鎖可変ドメインを指し、「Ｈ」は重鎖可変ドメインを指す。
【００４９】
「特異的に結合する」または「免疫特異的に結合する」とは、標的化ドメイン、抗体、または抗原結合断片が、所望の抗原の１つ以上の抗原決定基と反応し、他のポリペプチドとは反応しないか、またははるかに低い親和性（$K_d > 10^{-6}$）で結合することを意味し、ここで、より小さいＫｄは、より大きい親和性を表す。選択されたポリペプチドの免疫学的な結合特性は当該技術分野で周知の方法によって定量化され得る。１つのそのような方法は、抗原結合部位／抗原複合体形成及び解離の速度の測定を伴い、それらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、及び両方向において速度に等しく影響する幾何的パラメータに依存する。したがって、「オン速度定数」（k_{on}）と「オフ速度定数」（k_{off}）の両方は、濃度ならびに会合及び解離の実際の速度を計算することによって決定することができる。（Ｎａｔｕｒｅ ３６１：１８６－８７（１９９３））を参照されたい）。k_{off}/k_{on}の比率は、親和性に関連しないすべてのパラメータの解除を可能にし、解離定数Ｋｄに等しい。（一般に、Ｄａｖｉｅｓ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ａｎｎｕａｌ Ｒｅｖ Ｂｉｏｃｈｅｍ ５９：４３９－４７３を参照されたい）。いくつかの態様では、その対応する抗原に特異的に結合する抗原標的化ドメイン、抗体、または抗原結合断片は、標的抗原に対して約１０μＭ未満、いくつかの態様では、約１

００μＭ未満のＫｄ　を示す。
【００５０】
免疫グロブリンは、ＩｇＡ、分泌型ＩｇＡ、ＩｇＧ、及びＩｇＭが挙げられるがこれらに限定されない、一般に知られているアイソタイプのいずれかに由来し得る。ＩｇＧサブクラスも当業者には周知であり、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４が挙げられるが、これらに限定されない。「アイソタイプ」とは、抗体のクラスまたはサブクラス（例えば、ＩｇＭまたはＩｇＧ１）を指し、これは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる。
【００５１】
「抗抗原」抗体またはポリペプチドは、抗原に特異的に結合する抗体またはポリペプチドを指す。例えば、抗ＣＤ３ポリペプチドはＣＤ３に特異的に結合する。
【００５２】
本明細書で使用される場合、「ＭＭ」及び「マスキング部分」という用語は、標的化ドメインとその対応する抗原との結合を妨げるペプチドを指すために交換可能に使用される。例えば、ＭＭ１は、第１の標的への第１の標的化ドメインの結合を妨げるペプチドであり、ＭＭ２は、第２の標的への第２の標的化ドメインの結合を妨げるペプチドである。マスキング部分が標的化ドメインのその対応する標的への結合を妨げる程度は、その「マスキング効率」によって定量化される。「マスキング効率」及び「ＭＥ」という用語は、以下のように決定される比率を指すために、本明細書では交換可能に使用される。
ＭＥ＝　ＥＣ５０、活性化可能なＨＢＰＣ（すなわち、プロテアーゼで切断されていない）
　　ＥＣ５０、活性化されたＨＢＰＣ
【００５３】
本明細書で使用される場合、「ＣＭ」及び「切断可能部分」という用語は、プロテアーゼによる切断を受けやすいペプチドを指すために交換可能に使用される。ＣＭのプロテアーゼ媒介切断により、活性化可能なＨＢＰＣの構造からＭＭが放出され、それによって「活性化された」（すなわち、マスクされていない）生成物が生成され、それぞれの対応する「活性化された」（すなわち、マスクされていない）第１の標的化ドメイン及び／または第２の標的化ドメインは自由にその対応する標的に結合する。
【００５４】
本明細書で使用される場合、「単離されたポリヌクレオチド」という用語は、組換えポリヌクレオチドまたは合成起源のポリヌクレオチドを指し、その起源のために、「単離されたポリヌクレオチド」は、（１）「単離されたポリヌクレオチド」が天然に見出されるポリヌクレオチドのすべてまたは一部分とは結合していないか、（２）天然には連結していないポリヌクレオチドに作動可能に連結しているか、または（３）より大きな配列の一部として天然には存在しない。本開示によるポリヌクレオチドには、第１、第２、及び第３のポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。
【００５５】
本明細書で使用される場合、「作動可能に連結している」という用語は、そのように記載されている構成要素の位置が、それらがそれらの意図される様式で機能することを可能にする関係にあることを指す。コード配列に「作動可能に連結している」制御配列は、コード配列の発現が制御配列と適合する条件下で達成されるような方法で連結している。
【００５６】
本明細書で議論されるように、本明細書に記載されるアミノ酸配列（すなわち、それぞれの参照配列）の小さなバリエーションは、得られる類似体配列が参照配列に対して、少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、９０％、９５％、最も好ましくは９９％の配列同一性を維持する限り、本開示に包含されるものとして企図される。具体的には、保存的アミノ酸置換が企図される。保存的置換は、それらの側鎖の性質について関連するアミノ酸のファミリー内で起こる置換である。アミノ酸は、以下のファミリーに分けることができる：（１）酸性アミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸である；（２）塩基性アミノ酸は、リジン、アルギニン、ヒスチジンである；（３）非極性アミノ酸は、

アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンである；（４）無電荷極性アミノ酸は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシンである。親水性アミノ酸としては、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、セリン、及びトレオニンが挙げられる。疎水性アミノ酸としては、アラニン、システイン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、及びバリンが挙げられる。アミノ酸の他のファミリーとしては、（ｉ）脂肪族ヒドロキシファミリーであるセリン及びトレオニン、（ｉｉ）アミド含有ファミリーであるアスパラギン及びグルタミン、（ｉｉｉ）脂肪族ファミリーであるアラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン、ならびに（ｉｖ）芳香族ファミリーであるフェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンが挙げられる。例えば、本明細書に記載のポリペプチド及びポリペプチド複合体内での、ロイシンのイソロイシンまたはバリンとの、アスパラギン酸のグルタミン酸との、トレオニンのセリンとの独立した置換、またはアミノ酸の構造的に関連したアミノ酸との類似した置換は、特に、置換がＣＤＲまたはフレームワーク領域内のアミノ酸に関与しない場合、結合または結果として得られる分子の特性に対して主要な影響を及ぼさないと予想することが妥当である。アミノ酸の変化が機能性ポリペプチド複合体をもたらすかどうかは、得られる分子、すなわち得られる類似体配列の特異的活性をアッセイすることによって容易に決定することができる。アッセイは、本明細書に詳細に記載されている。類似体の好適なアミノ末端及びカルボキシ末端は、機能的ドメインの境界近くで生じる。構造的ドメイン及び機能的ドメインは、ヌクレオチド及び／またはアミノ酸配列データを公的または私有の配列データベースと比較することによって特定することができる。好ましくは、構造及び／または機能が既知である他のタンパク質内で生じる、配列モチーフまたは予想されるタンパク質立体構造ドメインを特定するために、コンピュータ化比較法が使用される。既知の三次元構造へと折り畳まれるタンパク質配列を特定するための方法は、既知である。例えば、Ｂｏｗｉｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５３：１６４（１９９１）を参照されたい。したがって、前述の例は、当業者が、本開示に従う構造的ドメイン及び機能的ドメインを定義するために使用することができる配列モチーフ及び構造的立体構造を認識できることを実証する。

【００５７】

保存的アミノ酸置換は、参照配列の構造的特徴を実質的には変更しないだろう（例えば、置換アミノ酸は、参照配列において生じるヘリックスを破壊する傾向も、参照配列を特徴付ける他の種類の二次構造を破壊する傾向もないだろう）。当該技術分野で認識されているポリペプチドの二次構造及び三次構造の例は、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ（Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８４））；Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｔｏ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ（Ｃ．Ｂｒａｎｄｅｎ　ａｎｄ　Ｊ．Ｔｏｏｚｅ，ｅｄｓ．，Ｇａｒｌａｎｄ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．（１９９１））；及びＴｈｏｒｎｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　３５４：１０５（１９９１）に記載されている。

【００５８】

例示的なアミノ酸置換としてはまた、（１）ＣＭを含む切断可能なリンカー内におけるもの以外の活性化可能なポリペプチドの領域内のタンパク質分解に対する感受性を低減するもの、（２）酸化に対する感受性を低減するもの、（３）タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変更するもの、（４）抗原に対する結合親和性を変更するもの、及び（４）そのような類似体の他の物理化学的または機能的特性を与えるか、修飾するものが挙げられる。このようなアミノ酸置換は、本明細書に記載のアッセイを使用する既知の変異導入法及び／または指向性分子進化法を使用して同定することができる。例えば、国際公開番号第ＷＯ２００１／０３２７１２号、米国特許第７，４３２，０８３号、米国特許公開第２００４／０１８０３４０号、及び米国特許第６，２９７，０５３号を参照でき、これらのそれぞれは参照により本明細書に組み込まれる。類似体は、活性化可能なＨＢＰ

Ｃ内の参照配列に１つ以上の変異を導入することによって調製され得る。例えば、単一または複数のアミノ酸置換は、天然に存在する参照配列において（好ましくは、分子内接触を形成するドメイン（複数可）以外のポリペプチドの部分において）なされてもよい。

【００５９】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」または「薬理学的に適合する」とは、生物学的に望ましくないか、または他の理由で望ましくないことはない物質を意味し、例えば、この物質は、望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、またはそれが含まれる組成物の他のいずれかの成分と有害な方法で相互作用することなく、個体または対象に投与される医薬組成物に組み入れることができる。薬学的に許容される担体または賦形剤は、例えば、毒物学的試験及び製造試験の必要な基準を満たしている、及び／または米国食品医薬品局が作成する不活性成分ガイドに含まれている。

【００６０】

本明細書で使用される場合、「患者」としては、がんに罹患している任意の患者が挙げられる。本明細書で使用される場合、「対象」及び「患者」という用語は、交換可能に用いられている。

【００６１】

「がん」、「がん性」または「悪性」という用語は、制御されていない細胞増殖を典型的に特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指すか、または説明する。がんの例としては、例えば、切除不能の黒色腫または転移性黒色腫などの黒色腫、白血病、リンパ腫、芽細胞腫、がん腫、及び肉腫が挙げられる。このようながんのより具体的な例としては、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病（Ｐｈ＋ＡＬＬ）、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、胃腸癌、腎臓癌、卵巣癌、肝臓癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、前立腺癌、甲状腺癌、神経芽細胞腫、膵臓癌、多形性膠芽腫、子宮頸癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、結腸癌、頭頸部癌、胃癌、胚細胞腫瘍、小児肉腫、鼻腔内ナチュラルキラー、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、及び慢性リンパ性白血病（ＣＭＬ）が挙げられる。

【００６２】

本明細書で使用される場合、「腫瘍」という用語は、前がん病変を含む、良性（非がん性）または悪性（がん性）の、過剰な細胞増殖または増殖から生じる任意の組織塊を指す。

【００６３】

「投与すること」とは、当業者に知られているさまざまな方法と送達系のいずれかを用いた、治療剤を含む組成物の対象への物理的な導入を指す。本明細書に開示される製剤の投与経路としては、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、脊髄または他の非経口投与経路、例えば注射または注入によるものが挙げられる。本明細書で使用される場合、「非経口投与」という語句は、経腸投与と局所投与以外の、通常は注射による投与方法を意味し、非限定的に、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、リンパ内、病巣内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、及び胸骨内の注射及び注入、ならびにインビボエレクトロポレーションが含まれる。いくつかの態様では、製剤は非経口以外の経路を介して投与され、いくつかの態様では経口で投与される。非経口以外の経路としては、局所、表皮または粘膜の投与経路、例えば、鼻腔内、膣内、直腸内、舌下、または局所によるものが挙げられる。また、投与することは、例えば１回、複数回、及び／または１つ以上の長い期間にわたって行うことができる。

【００６４】

対象の「治療」または「療法」は、疾患に関連する症状、合併症または状態、または生化学的兆候の進行、発生、重症度または再発を逆転させ、軽減し、改善し、阻害し、遅らせることを目的として、対象に対して行われる任意のタイプの介入もしくはプロセス、または対象への活性剤の投与を指す。

【００６５】

本明細書で使用される場合、「効果的な治療」とは、有益な効果、例えば疾患または障

害の少なくとも１つの症状の改善をもたらす治療を指す。有益な効果は、ベースラインを超える改善、すなわち、本方法による治療の開始前に行われた測定または観察を超える改善の形をとることができる。有益な効果は、腫瘍マーカーの有害な進行を阻止、減速、遅らせる、または安定化するという形をとることもできる。効果的な治療とは、がんに関連する少なくとも１つの症状の軽減を指す場合がある。このような効果的な治療は、例えば、患者の疼痛を軽減し、病変の大きさ及び／または数を減少させ、腫瘍の転移を減少または予防し、及び／または腫瘍の増殖を遅らせることができる。

【００６６】

「有効量」という用語は、所望の生物学的、治療的、及び／または予防的結果をもたらす薬剤の量を指す。その結果は、疾患の徴候、症状、または病因の１つ以上の減少、軽減、好転、低下、遅延、及び／または緩和、あるいは生物学的システムの任意の他の望ましい変化であり得る。固形腫瘍に関して、有効量は、腫瘍を縮小させる、及び／または腫瘍の増殖速度を低下させる（例えば、腫瘍の増殖を抑制する）、または他の望ましくない細胞増殖を遅延させるのに十分な量を含む。いくつかの態様では、有効量は、腫瘍の再発を予防または遅延させるのに十分な量である。有効量は１回または複数回の投与で投与することができる。薬物または組成物の有効量は、（ｉ）がん細胞の数を減らすことができ、（ｉｉ）腫瘍サイズを低減することができ、（ｉｉｉ）末梢臓器へのがん細胞浸潤を阻害し、抑制し、ある程度緩徐化し、そして停止させることができ、（ｉｖ）腫瘍転移を阻害することができ（すなわち、ある程度緩徐化し、そして停止させることができ）、（ｖ）腫瘍増殖を阻害することができ、（ｖｉ）腫瘍の発症及び／または再発を予防または遅延させることができ、及び／または（ｖｉｉ）がんに関連する症状のうちの１つ以上をある程度軽減することができる。

【００６７】

「免疫応答」とは、免疫系の細胞（例えば、Ｔリンパ球、Ｂリンパ球、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、樹状細胞、及び好中球）ならびに免疫系の細胞、または、肝臓、脾臓、及び／または骨髄によって産生される可溶性高分子（抗体、サイトカイン、及び補体を含む）の作用であって、侵入する病原体、病原体の感染した細胞もしくは組織、がん性細胞もしくはその他の異常細胞、または自己免疫もしくは病的炎症の場合は、正常なヒト細胞もしくは組織への選択的な標的化、結合、損傷、破壊、及び／または脊椎動物の体からの排除をもたらす作用を指す。

【００６８】

本開示の活性化可能なポリペプチドの概略図、例えば図１は、排他的であることを意図したものではない。リンカー、スペーサー、及びシグナル配列などの他の配列要素は、そのような概略図において列挙された配列要素の前、後、またはそれらの間に存在し得る。ＭＭ及びＣＭは、抗体またはポリペプチドのＶＬではなく抗体またはポリペプチドのＶＨに結合することができ、またその逆も可能であることも理解されるべきである。

【００６９】

選択肢（例えば、「または」）の使用は、選択肢の一方、両方、またはそれらの任意の組み合わせのいずれかを意味すると理解されるべきである。本明細書で使用される場合、不定冠詞「ａ」または「ａｎ」は、列挙または一覧に示された任意の構成要素の「１つ以上」を指すと理解されるべきである。

【００７０】

「及び／または」という用語は、本明細書で使用される場合、他のものを伴ってまたは伴わずに、２つの特定の特徴または構成要素のそれぞれの具体的な開示として受け取られるべきである。したがって、本明細書において「Ａ及び／またはＢ」などの語句で使用される場合、「及び／または」という用語は、「Ａ及びＢ」、「ＡまたはＢ」、「Ａ」（単独）、ならびに「Ｂ」（単独）を含むものとする。同様に、「Ａ、Ｂ、及び／またはＣ」などの語句で使用されるとき、「及び／または」という用語は、次の態様のそれぞれを包含することを意図する：Ａ、Ｂ、及びＣ；Ａ、Ｂ、またはＣ；ＡまたはＣ；ＡまたはＢ；ＢまたはＣ；Ａ及びＣ；Ａ及びＢ；Ｂ及びＣ；Ａ（単独）；Ｂ（単独）；ならびにＣ（単

独）。
【００７１】
それぞれの態様が本明細書において「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ」（～を含む）という文言によって記述される場合、「ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ」（～からなる）及び／または「ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ」（～から本質的になる）によって記述される同様の他の態様も提供されるものと理解される。
【００７２】
「約」という用語は、当業者によって決定されるような特定の値または組成についての許容可能な誤差範囲内である値または組成を指し、値または組成を測定する、または決定する方法、すなわち、測定システムの限界に部分的に依存する。例えば、「約」または「本質的に含む」は、当該技術分野の慣例に従って、１標準偏差以内または１を超える標準偏差を意味することができる。代替的に、「約」または「本質的に含む」は、最大１０％または２０％（すなわち、±１０％または±２０％）の範囲を意味することもできる。例えば、約３ｍｇには、２．７ｍｇと３．３ｍｇ（１０％）の間、または２．４ｍｇと３．６ｍｇ（２０％）の間の任意の数が含まれ得る。さらに、特に生物学的システムまたはプロセスに関して、この用語は、値の最大１桁または最大５倍を意味することができる。別段に記載されない限り、本出願及び特許請求の範囲に特定の値または組成が提供される場合、「約」の意味は、特定の値または組成について許容可能な誤差範囲内にあることを仮定するとみなされる。
【００７３】
本明細書に記載される場合、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比率範囲または整数範囲は、特に指定しない限り、列挙される範囲内の任意の整数の値を含み、必要に応じて、その分数（整数の１／１０及び１／１００など）を含むものと理解される。
【００７４】
別段の定義がなされないかぎり、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本開示が関連する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有するものとする。例えば、ｔｈｅ　Ｃｏｎｃｉｓｅ　Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ　ｏｆ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｕｏ，Ｐｅｉ－Ｓｈｏｗ，２ｎｄ　ｅｄ．，２００２，ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ；Ｔｈｅ　Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ　ｏｆ　Ｃｅｌｌ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，５ｔｈ　ｅｄ．，２０１３，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ；及びｔｈｅ　Ｏｘｆｏｒｄ　Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ　ｏｆ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，２００６，Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓは、本開示で使用される多くの用語の一般的な辞書を当業者に提供する。
【００７５】
単位、接頭辞、及び記号は、それらのＳｙｓｔｅｍｅ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　ｄｅ　Ｕｎｉｔｅｓ（ＳＩ）で承認された形式で示される。数値範囲は、その範囲を定義する数を含むものとする。本明細書中で提供する見出しは、本明細書全体を参照することによって有し得る本開示のさまざまな態様を制限するものではない。したがって、上で定義された用語は、明細書全体を参照することによってより完全に定義される。
【００７６】
本発明の種々の態様は、以下のサブセクションでさらに詳細に説明される。
【００７７】
活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）
本開示は：
（ａ）
（ｉ）　第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、ＶＨ１とＶＬ１が一緒になって第１の標的に特異的に結合する第１の標的化ドメインを形成する、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、
（ｉｉ）　第１のマスキング部分（ＭＭ１）、

（ｉｉｉ）　第１のプロテアーゼに対する第１の基質を含む第１の切断可能部分（ＣＭ１）、
（ｉｖ）　第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、及び
（ｖ）　第一の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）
を含む第１のポリペプチドと；
（ｂ）
（ｉ）　第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）であって、ＶＨ２とＶＬ２は一緒になって第２の標的に特異的に結合する第２の標的化ドメインを形成する、ＶＬ２、
（ｉｉ）　第２のマスキング部分（ＭＭ２）、及び
（ｉｉｉ）第２のプロテアーゼに対する第２の基質を含む第２の切断可能部分（ＣＭ２）
を含む、第２のポリペプチドと；
（ｃ）
（ｉ）　第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）、
を含む、第３のポリペプチドと、
を含み、
第３のポリペプチドが免疫グロブリン可変ドメインを含まず、
ＭＭ１が、第１の標的への第１の標的化ドメインの結合を妨げるペプチドであり、ＭＭ２は、第２の標的への第２の標的化ドメインの結合を妨げるペプチドである、
活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体を提供する。

【００７８】

いくつかの態様では、本開示の活性化可能なＨＢＰＣは、腫瘍微小環境においてより多く見られる状態において選択的に活性化する。しかしながら、そのような活性化が起こるまでは、その標的に結合する能力は損なわれている。したがって、本開示の活性化可能な二重特異性抗体（すなわち、活性化可能なＨＢＰＣ）は、オフターゲット結合を最小限に抑えることによって標的関連毒性を低減する可能性を有する。構造的に、本開示の活性化可能なＨＢＰＣは、それぞれの標的に対して結合ドメインを１つだけ有する（すなわち、「一価」）。さらに、これらの活性化可能なＨＢＰＣは実質的な濃度依存性の凝集を示さないと思われるため、比較的高い製品純度及び高い生産性レベルでの活性化可能なＨＢＰＣ（活性化可能な二重特異性抗体）の製造が可能になる。

【００７９】

いくつかの態様では、第１のポリペプチドは、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ－ＶＨ２－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、それぞれの「－」は独立して直接的または間接的な連結である。本明細書で使用される場合、「直接的な連結」は、ＨＢＰＣの２つのペプチドの直接的なコンジュゲーションを指し、「間接的な連結」は、連結分子、例えばスペーサーまたはリンカーを使用するコンジュゲーションを指す。以下に示すように、上記の構造を有する活性化可能なＨＢＰＣは、別の構造を有する活性化可能な二重特異性抗体と比較して、（活性化された場合の）活性及びマスキング効率の増加、ならびに凝集耐性の改善を有利に示す。

【００８０】

いくつかの態様では、第１の標的と第２の標的のうちの１つは、例えば、Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、単核エフェクター細胞（例えば、骨髄性単核細胞など）、マクロファージ、及び／または別の免疫エフェクター細胞などの白血球などの免疫エフェクター細胞上の表面抗原である。本明細書で使用される場合、「標的」及び「抗原」という用語は、互換可能に使用される。適切な免疫エフェクター細胞標的としては、例えば、ＣＤ３、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＧＩＴＲ、ＨＶＥＭ、ＩＣＯＳ、ＮＫＧ２Ｄ、ＯＸ４０などが挙げられる。本開示のいくつかの態様では、第１の標的と第２の標的のうちの少なくとも１つはＣＤ３である。特定の態様では、第１の標的はＣＤ３である。

【００８１】

特定の態様では、第１の標的と第２の標的は異なる生物学的標的であり、それに応じて、第１の標的化ドメイン（すなわち、ＶＬ１及びＶＨ１）と第２の標的化ドメイン（すな

わち、ＶＬ２及びＶＨ２）も異なる。いくつかの態様では、第１の標的と第２の標的のうちの１つはＣＤ３ポリペプチドである（そして、それに応じて、第１の標的化ドメインと第２の標的化ドメインのうちの１つはＣＤ３ポリペプチド標的化ドメインである）。いくつかの態様では、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）は、Ｔ細胞抗原ポリペプチド（すなわち、第１の標的）に対する第１の標的ドメインを一緒に形成するＶＨ１及びＶＬ１と、例えば、腫瘍関連抗原または腫瘍特異的抗原（すなわち、第２の標的）などのがん細胞表面抗原に対する第２の標的化ドメインを一緒になって形成するＶＨ２及びＶＬ２と、を含む。例示的ながん細胞表面抗原としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ＥＧＦＲ；ＰＳＡ；ＰＡＰ；ＣＥＡ；ＡＦＰ；ＨＣＧ；ＬＤＨ；エノラーゼ２；ＣＡ　１５－３、及びＣＡ　２７．２９、ならびに表１に提供される例示的な標的。他の態様では、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）は、がん細胞表面抗原（すなわち、第１の標的）に対する第１の標的化ドメインを一緒になって形成するＶＨ１及びＶＬ１と、Ｔ細胞抗原ポリペプチドに対する第２の標的化ドメインを一緒になって形成するＶＨ２及びＶＬ２と、を含む。

表１：例示的な標的

1-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LAG-3	STEAPl
α-4 インテグリン	CD56	DLK1	ヒアルロニダーゼ	LIF-R	STEAP2
α-V インテグリン	CD64	DLL4	ICOS	Lewis X	TAG-72
α4β1 インテグリン	CD70	DPP-4	IFNα	LIGHT	TAPA1
α4β7 インテグリン	CD7l	DSG1	IFNβ	LRP4	TGFβ
AGR2	CD74	ECFR	IFNγ	LRRC26	TIGIT
抗 Lewis-Y		EGFRviii	IgE	MCSP	TIM-3
アペリン J 受容体	CD80	エンドセリン B 受容体 (ETBR)	IgE 受容体 (FceRI)	メソテリン	TLR2
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MRP4	TLR4
B7-H4	CD86	EpCAM	IGFlR	MUCl	TLR6
BAFF		EPHA2	IL1B	ムチン-16 (MUC16、CA-125)	TLR7
BTLA	CD117	EPHB2	TLlR	Na/K ATP アーゼ	TLR8
C5 補体	CD125	ERBB3	TL2	好中球エラスターゼ	TLR9
C-242	CD132 (IL-2RG)	RSV の F タンパク質	IL11	NCF	TMEM31
CA9	CD133	FAP	IL12	ニカストリン	TNFα
CA19-9 (Lewis a)	CD137	FGF-2	IL12p40	Notch 受容体	TNFR
炭酸脱水酵素 9	CD138	FGF8	IL-12R、IL-12Rβ1	Notch 1	TNFRS12A
CD2	CD166	FGFRl	IL13	Notch 2	TRAIL-R1
CD3	CD172A	FGFR2	IL13R	Notch 3	TRAIL-R2

【００８２】

一態様では、がん細胞抗原は増殖因子受容体である。増殖因子受容体は、増殖因子に結合する受容体である。増殖因子は、細胞の増殖を刺激できる天然に存在する物質である。増殖因子には、アドレノメデュリン、上皮増殖因子、線維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、形質転換増殖因子、腫瘍壊死因子など、さまざまな種類がある。それぞれのタイプの増殖因子には、制御に役立ち得る特殊な機能または細胞プロセスがある。増殖因子受容体ドメインにはシステインが豊富に含まれており、さまざまな真核生物のタンパク質に含まれている。受容体は、チロシンキナーゼなどの酵素によるシグナル伝達に関与する。増殖因子受容体の種類は異なるが、それらは、隣接する２つのジスルフィドを有するβヘアピンを含むジスルフィド結合フォールドとして増殖因子受容体ドメインを含む一般的な構造を有している。

【００８３】
本開示のいくつかの態様では、第１のポリペプチドは、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ－ＶＨ２－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、それぞれの「－」は独立して直接的または間接的な連結である。
【００８４】
いくつかの態様では、Ｔ細胞抗原ポリペプチドはＣＤ３である。本明細書で使用される場合、「ＣＤ３」または「分化抗原群３」という用語は、Ｔ細胞受容体複合体のサブユニットである６本の鎖のタンパク質複合体を指す。（Ｊａｎｅｗａｙ　ｅｔ　ａｌ．，ｐ．１６６，９^{ｔｈ}　ｅｄ．）。ＴＣＲのα：βヘテロ二量体は、ＣＤ３サブユニットと会合して、ＴＣＲ細胞表面抗原受容体を完成させる。２つのＣＤ３ε鎖、ＣＤ３γ鎖、及びＣＤ３δ鎖、ならびにＣＤ３ζ鎖のホモ二量体によってＴ細胞受容体複合体が完成する。この複合体は、主要組織適合性複合体クラスＩ及びＩＩに結合するペプチドの認識に関与し、Ｔ細胞の活性化に関与する。ＣＤ３抗原は、成熟Ｔリンパ球及び胸腺細胞のサブセットによって発現される。本明細書で使用される場合、ＣＤ３は、霊長類（例えば、ヒト）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物源由来であり得る。この用語は、「全長」のプロセシングされていないＣＤ３（例えば、プロセシングされていない、もしくは修飾されていないＣＤ３εまたはＣＤ３γ）、ならびに細胞内のプロセシングの結果生じるＣＤ３の任意の形態を包含する。この用語は、例えば、スプライスバリアントまたは対立遺伝子バリアントを含む、ＣＤ３の天然に存在するバリアントも包含する。本明細書に記載の抗ＣＤ３標的化ドメインは、ヒト野生型ＣＤ３Ｅ（ＮＣＢＩアクセッション番号ＮＭ＿０００７３３．３）に特異的に結合することができる。
【００８５】
本開示のいくつかの態様では、Ｔ細胞抗原ポリペプチドはＣＤ３のイプシロン鎖である。いくつかの態様では、ｓｃＦｖ（例えば、抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ）は、重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含む。
【００８６】
いくつかの態様では、本開示は、表２に提供される抗ＣＤ３抗体のＶＨ　ＣＤＲ１～３及びＶＬ　ＣＤＲ１～３を含む抗体またはその抗原結合断片（例えば、ｓｃＦｖ）を提供する。別の態様では、抗体またはその抗原結合断片（例えば、ｓｃＦｖ）は、それぞれ配列番号３～５のＶＨ　ＣＤＲ１～３、及び配列番号６～８のＶＬ　ＣＤＲ１～３を含む。別の態様では、抗体またはその抗原結合断片（例えば、ｓｃＦｖ）は、それぞれ配列番号１２８、４、１３０のＶＨ　ＣＤＲ１～３、及びそれぞれ配列番号１３１～１３３のＶＬ　ＣＤＲ１～３を含む。別の態様では、抗体またはその抗原結合断片（例えば、ｓｃＦｖ）は、それぞれ配列番号３～５のＶＨ　ＣＤＲ１～３及び、それぞれ配列番号１４４、７、１４６のＶＬ　ＣＤＲ１～３を含む。別の態様では、抗体またはその抗原結合断片（例えば、ｓｃＦｖ）は、それぞれ配列番号１２８、４、１３０のＶＨ　ＣＤＲ１～３及び、それぞれ配列番号１４５、１３２、１３３のＶＬ　ＣＤＲ１～３を含む。
【００８７】
当該技術分野で知られている多くの抗ＣＤ３抗体のいずれかの可変ドメイン及び／またはｓｃＦｖは、本開示の活性化可能なＨＢＰＣでの使用に適している。いくつかの態様では、ｓｃＦｖは、ＣＤ３εへの結合に特異的であり、ＣＤ３εに結合する抗体もしくはその断片、例えば、ＣＨ２５２７、ＦＮ１８、Ｈ２Ｃ、ＯＫＴ３、ＳＰ３４、２Ｃ１１、ＵＣＨＴ１、Ｉ２Ｃ、Ｖ９、それらのバリアントなどであるか、それらに由来する。本開示の活性化可能なＨＢＰＣでの使用に適した抗ＣＤ３抗体（及び／またはその可変ドメイン）ならびにマスキング部分としては、例えば、国際公開番号第ＷＯ２０１３／１６３６３１号、第ＷＯ２０１５／０１３６７１号、第ＷＯ２０１６／０１４９７４号、第ＷＯ２０１９／０７５４０５号、及び第ＷＯ２０１９／２１３４４４号に記載されているものが挙げられ、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。本開示の活性化可能なＨＢＰＣは、表２に列挙される例示的な抗ＣＤ３　ＶＬ　ＣＤＲ及びＶＨ　ＣＤＲのいずれかを含み得る。

表２．

抗CD3抗体	VH			VL			抗CD3マスク
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3	
1	KYAMN (配列番号3)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (配列番号4)	HGNFGNSYISYWAY (配列番号5)	GSSTGAVTSGNYPN (配列番号6)	GTKFLAP (配列番号7)	VLWYSNRWV (配列番号8)	VSTTCWWDPPCTPNT (配列番号1)
2	TYAMN (配列番号128)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (配列番号4)	HGNFGNSYVSWFAY (配列番号130)	RSSTGAVTTSNYAN (配列番号131)	GTNKRAP (配列番号132)	ALWYSNLWV (配列番号133)	GYLWGCEWNCGGITT (配列番号72)
3	KYAMN (配列番号3)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (配列番号4)	HGNFGNSYISYWAY (配列番号5)	GSSTGAVTSGYYPN (配列番号144)	GTKFLAP (配列番号7)	ALWYSNRWV (配列番号146)	GYRWGCEWNCGGITT (配列番号68)
4	KYAMN (配列番号3)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (配列番号4)	HGNFGNSYISYWAY (配列番号5)	GSSTGAVTSGYYPN (配列番号144)	GTKFLAP (配列番号7)	ALWYSNRWV (配列番号146)	MMYCGGNEVLCGPRV (配列番号67)
5	KYAMN (配列番号3)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (配列番号4)	HGNFGNSYISYWAY (配列番号5)	GSSTGAVTSGYYPN (配列番号144)	GTKFLAP (配列番号7)	ALWYSNRWV (配列番号146)	VYYCGGNESLCGERR (配列番号147)
6	TYAMN (配列番号128)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (配列番号4)	HGNFGNSYVSWFAY (配列番号130)	RSSTGAVTTSNYAN (配列番号131)	GTNKRAP (配列番号132)	ALWYSNLWV (配列番号133)	MMYCGGNEVLCGPRV (配列番号67)
7	TYAMN (配列番号128)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (配列番号4)	HGNFGNSYVSWFAY (配列番号130)	RSSGAVTTSNYAN (配列番号145)	GTNKRAP (配列番号132)	ALWYSNLWV (配列番号133)	GYRWGCEWNCGGITT (配列番号68)
8	TYAM	RIRSKYNN	HGNFGNS	RSSTGAV	GTNKRA	ALWYS	VYYCGG

	N (配列番号 128)	YATYYADSVKD (配列番号 4)	YVSWFAY (配列番号 130)	TTSNYAN (配列番号 131)	P (配列番号 132)	NLWV (配列番号 133)	NESLCGERR (配列番号 147)
9	TYAMN (配列番号 128)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (配列番号 4)	HGNFGNSYVSWFAY (配列番号 130)	RSSTGAVTTSNYAN (配列番号 131)	GTNKRAP (配列番号 132)	ALWYSNLWV (配列番号 133)	WYSGGCEAFCGILSS (配列番号 148)
10	TYAMN (配列番号 128)	RIRSKYNNYATYYADSVKD (配列番号 4)	HGFGNSYVSWFAY (配列番号 143)	RSSTGAVTTSNYAN (配列番号 131)	GTNKRAP (配列番号 132)	ALWYSNLWV (配列番号 133)	FMCQQRMWGNEFCHQ (配列番号 149)

他の適切な抗ＣＤ３マスキング部分（例えば、ＭＭ１）としては、例えば、ＹＳＬＷＧＣＥＷＧＣＤＲＧＬＹ（配列番号１５０）、ＧＹＲＷＧＣＥＷＮＣＧＧＩＴＴ（配列番号６８）、ＹＳＡＣＥＭＦＧＥＶＥＣＣＦＣ（配列番号１５１）、ＷＹＳＧＧＣＥＡＦＣＧＩＬＳＳ（配列番号１４８）、ＧＹＳＧＧＣＥＦＲＣＹＱＬＹＳ（配列番号１５２）、ＫＦＣＨＣＧＹＹＣＲＶＣＴＬＫ（配列番号１５３）、ＬＧＣＮＮＬＷＧＮＥＦＣＨＰＶ（配列番号１５４）、及びＧＨＰＣＷＧＮＥＳＹＣＨＴＨＳ（配列番号１５５）が挙げられる。

【００８８】

本開示のいくつかの態様では、第１のポリペプチドは、ＶＨ２と単量体Ｆｃドメインとの間に配置された重鎖ＣＨ１ドメインをさらに含む。本開示のいくつかの態様では、第１のポリペプチドは、ＣＨ１ドメインと第１の単量体Ｆｃドメインとの間に配置された免疫グロブリンヒンジ領域（ＨＲ１）をさらに含む。

【００８９】

本開示のいくつかの態様では、第１のポリペプチドは、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ－ＶＨ２－ＣＨ１－ＨＲ１－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、それぞれの「－」は独立して直接的または間接的な連結である。

【００９０】

いくつかの態様では、がん細胞抗原は、腫瘍細胞分化抗原または他の腫瘍関連抗原である。腫瘍細胞上で発現する一部の抗原は、分化の少なくともある段階中に、腫瘍が発生した細胞系統の非悪性細胞上でも発現する。したがって、これらの系統特異的抗原は分化マーカーと考えることができる。悪性細胞は通常、その腫瘍細胞が由来する正常な細胞型に特徴的である遺伝子の少なくとも一部を発現するため、がん細胞上に分化マーカーが見られる。したがって、これらの正常な分化抗原の存在は、治療用抗体の細胞破壊効果を単一細胞系統に制限するのに役立つ。

【００９１】

本開示の活性化可能なＨＢＰＣの概略図が図１に提供され、これは、（ａ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）１００、第１の切断可能部分（ＣＭ１）１０１、ｓｃＦｖ１０２（リンカーを介して接続されたＶＨ１及びＶＬ１の配列を含む）、一緒に１０３として示される第２の重鎖可変ドメインＶＨ２（上）及びＣＨ１ドメイン（下）を含み、１０３はヒンジ領域１０９を介して第１のＦｃドメイン１０４に連結されている、第１のポリペプチドと；

（ｂ）第２のマスキング部分（ＭＭ２）１０５、第２の切断可能部分（ＣＭ２）１０６、

ならびに、一緒に１０７として示される第２の軽鎖可変ドメインＶＬ２（上）及び定常軽鎖ドメイン（下）を含む第２のポリペプチドと；
（ｃ）ヒンジ領域１１０及び第２のＦｃドメイン１０８を含む第３のポリペプチドと、
を描写する。図１に示すように、第１のＦｃドメインと第２のＦｃドメインは互いに結合し、第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）と第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）は、第２の標的に特異的に結合する第２の標的化ドメインを形成する。いくつかの態様では、ｓｃＦｖは抗ＣＤ３　ｓｃＦｖであり、第１の標的はＣＤ３であり、ＶＨ２とＶＬ２は腫瘍関連抗原結合ドメインまたは腫瘍特異的抗原結合ドメインを形成する（すなわち、第２の標的は腫瘍関連抗原または腫瘍特異的抗原である）。例示的な抗ＣＤ３、抗ＥＧＦＲ活性化可能ＨＢＰＣ及び他の抗ＣＤ３、抗腫瘍関連抗原ＨＢＰＣは、以下の実施例においてより詳細に記載される。

【００９２】

本開示のいくつかの態様では、活性化可能なＨＢＰＣは、重鎖ＣＤＲ１（ＶＨ　ＣＤＲ１、本明細書ではＣＤＲＨ１とも呼ばれる）、ＣＤＲ２（ＶＨ　ＣＤＲ２、本明細書ではＣＤＲＨ２とも呼ばれる）、及びＣＤＲ３（ＶＨ　ＣＤＲ３、本明細書ではＣＤＲＨ３とも呼ばれる）、ならびに可変軽鎖ＣＤＲ１（ＶＬ　ＣＤＲ１、本明細書ではＣＤＲＬ１とも呼ばれる）、ＣＤＲ２（ＶＬ　ＣＤＲ２、本明細書ではＣＤＲＬ２とも呼ばれる）、及びＣＤＲ３（ＶＬ　ＣＤＲ３、本明細書ではＣＤＲＬ３とも呼ばれる）を含む例示的な抗ＣＤ３　ｓｃＦｖを含む。

【００９３】

本開示のいくつかの態様では、ｓｃＦｖは、（ｉ）アミノ酸配列ＫＹＡＭＮ（配列番号３）を含むＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号４）を含むＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＩＳＹＷＡＹ（配列番号５）を含むＣＤＲ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）と；（ｉ）アミノ酸配列ＧＳＳＴＧＡＶＴＳＧＮＹＰＮ（配列番号６）を含むＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＫＦＬＡＰ（配列番号７）を含むＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＶＬＷＹＳＮＲＷＶ（配列番号８）を含むＣＤＲ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）と、を含む。

【００９４】

本開示のいくつかの態様では、ＶＨ１は、配列番号９に対して、少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である重鎖可変ドメインを含む。本開示のいくつかの態様では、ＶＬ１は、配列番号１０に対して、少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である軽鎖可変ドメインを含む。

【００９５】

本開示のいくつかの態様では、第１のポリペプチドｓｃＦｖは、配列番号９の重鎖可変を含む。本開示のいくつかの態様では、第１のポリペプチドｓｃＦｖは、配列番号１０の軽鎖可変ドメインを含む。

【００９６】

いくつかの態様では、ＶＨ１は、（ｉ）アミノ酸配列ＫＹＡＭＮ（配列番号３）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号４）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＩＳＹＷＡＹ（配列番号５）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含み；ＶＬ１は、（ｉ）アミノ酸配列ＧＳＳＴＧＡＶＴＳＧＮＹＰＮ（配列番号６）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＫＦＬＡＰ（配列番号７）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＶＬＷＹＳＮＲＷＶ（配列番号８）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含み、ＭＭ１は配列番号１のアミノ酸配列を含む。

【００９７】
代替的な態様では、単鎖可変断片は、（ｉ）アミノ酸配列ＴＹＡＭＮ（配列番号１２８）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号１２９）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＶＳＷＦＡＹ（配列番号１３０）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）と；（ｉ）アミノ酸配列ＲＳＳＴＧＡＶＴＴＳＮＹＡＮ（配列番号１３１）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＮＫＲＡＰ（配列番号１３２）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＡＬＷＹＳＮＬＷＶ（配列番号１３３）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含む、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）と、を含む。

【００９８】
本開示のこれらの態様のいくつかでは、ＶＨ１は配列番号１３４のアミノ酸配列を含む。本開示の特定の態様では、ＶＬ１は配列番号１３５のアミノ酸配列を含む。本開示の特定の態様では、ｓｃＦｖは、配列番号１２２（配列番号１３４及び１３５を含む）のアミノ酸配列を含む。

【００９９】
本開示のいくつかの態様では、ＶＨ１は、配列番号１３４と、少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。本開示のいくつかの態様では、ＶＬ１は、配列番号１３５と、少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。

【０１００】
本開示のいくつかの態様では、第１のポリペプチド単鎖可変断片は、（ｉ）アミノ酸配列ＴＹＡＭＮ（配列番号１２８）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号１２９）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＶＳＷＦＡＹ（配列番号１３０）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含む重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）を含み、配列番号１３５と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である重鎖可変ドメインを含む。

【０１０１】
本開示のいくつかの態様では、ＶＬ１は、（ｉ）アミノ酸配列ＲＳＳＴＧＡＶＴＴＳＮＹＡＮ（配列番号１３１）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＮＫＲＡＰ（配列番号１３２）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＡＬＷＹＳＮＬＷＶ（配列番号１３３）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含むアミノ酸配列を含み、ＶＬ１のアミノ酸配列は、配列番号１３５と少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一である。

【０１０２】
これらの態様のいくつかでは、ＶＨ１は、（ｉ）アミノ酸配列ＴＹＡＭＮ（配列番号１２８）を含むＶＨ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＲＩＲＳＫＹＮＮＹＡＴＹＹＡＤＳＶＫＤ（配列番号１２９）を含むＶＨ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＨＧＮＦＧＮＳＹＶＳＷＦＡＹ（配列番号１３０）を含むＶＨ　ＣＤＲ３を含み；ＶＬ１は、（ｉ）アミノ酸配列ＲＳＳＴＧＡＶＴＴＳＮＹＡＮ（配列番号１３１）を含むＶＬ　ＣＤＲ１、（ｉｉ）アミノ酸配列ＧＴＮＫＲＡＰ（配列番号１３２）を含むＶＬ　ＣＤＲ２、及び（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＡＬＷＹＳＮＬＷＶ（配列番号１３３）を含むＶＬ　ＣＤＲ３を含み、ＭＭ１は配列番号７２のアミノ酸配列を含む。

【０１０３】
上述のように、第１のポリペプチドは、単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）をさらに含む。

当該技術分野で知られているＦｃドメインは、本開示の活性化可能なＨＢＰＣでの使用に適しており、本明細書において以下にさらに詳細に記載される。

【０１０４】

本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、第１のポリペプチドは、ＶＨ２とＦｃ１との間に配置された重鎖ＣＨ１ドメインをさらに含む。本明細書に記載の活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）のいくつかの態様では、第１のポリペプチドは、ＶＨ２とＦｃ１との間に配置された免疫グロブリンヒンジ領域をさらに含む。ＣＨ１ドメインが存在するいくつかの態様では、免疫グロブリンヒンジ配列は、ＣＨ１ドメインとＦｃ１ドメインとの間に配置される。

【０１０５】

本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、第１のポリペプチドは、ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ－ＶＨ２－ＣＨ１－ヒンジ領域（ＨＲ１）－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、それぞれの「－」は、独立して、直接的または間接的な（例えば、リンカーを介した）連結である。

【０１０６】

本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、第１のポリペプチドは、本明細書において以下にさらに詳細に記載する１つ以上の任意選択のリンカーをさらに含む。

【０１０７】

本開示のいくつかの態様では、活性化可能なＨＢＰＣは、配列番号２３または配列番号２４に示されるアミノ酸配列を有するＦｃ１を含む第１のポリペプチドを含む。本開示のいくつかの態様では、活性化可能なＨＢＰＣは、ヒンジ－１（配列番号３４）またはヒンジ－２（配列番号３５）の配列を有するヒンジ領域を含む第１のポリペプチドを含む。

【０１０８】

本開示のいくつかの態様では、活性化可能なＨＢＰＣは、ＶＬ　ＣＤＲ１、ＶＬ　ＣＤＲ２、及びＶＬ　ＣＤＲ３を含む軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）を含む標的化ドメインを含む第２のポリペプチドを含む。

【０１０９】

本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、第２のポリペプチドは、１つ以上のリンカーを含む。いくつかの態様では、ＭＭ２はリンカーを介してＣＭ２に結合される。

【０１１０】

いくつかの態様では、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣの第２のポリペプチドは、約１～約２０個のアミノ酸を含むリンカーをさらに含む。本開示での使用に適したリンカーは、以下でより詳細に論じられる。

【０１１１】

いくつかの態様では、第２のポリペプチドは、定常軽鎖ドメイン（ＣＬ）をさらに含む。例示的なＣＬとしては、当該技術分野で知られているＣＬのいずれかが挙げられる。いくつかの態様では、第２のポリペプチドは、配列番号２５のアミノ酸配列を有するＣＬを含む。これらの態様の特定のものでは、第２のポリペプチドは、ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２－ＣＬのアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、それぞれの「－」は独立して直接的または間接的な（例えば、リンカーを介した）連結である。

【０１１２】

いくつかの態様では、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣの第３のポリペプチドは、単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）を含み、免疫グロブリン可変ドメインを含まない。Ｆｃ２は、本明細書で議論されるＦｃドメインのいずれかを含むことができる。

【０１１３】

いくつかの態様では、本明細書に開示される活性化可能なＨＢＰＣは、ヒンジ領域－Ｆｃ２のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含む第３のポリペプチドを含み、それぞれの「－」は、独立して、直接的または間接的な（例えば、リンカーを介した）連

結である。いくつかの態様では、「－」は直接的な連結である。特定の態様では、第３のポリペプチドは、ヒンジ領域及びＦｃ２から本質的になるか、またはヒンジ領域及びＦｃ２からなる。いくつかの態様では、第３のポリペプチドは、配列番号２８（任意選択でＣ末端リジンを有する、すなわち配列番号２９）を含むアミノ酸配列を有するＦｃ２を含む。一態様では、第３のポリペプチドは、配列番号３５のアミノ酸配列を含むヒンジと、配列番号２８（任意選択でＣ末端リジンを有する、すなわち、配列番号２９）のアミノ酸配列を含むＦｃ２とを含む。特定の一態様では、第１のポリペプチドは、配列番号３４のアミノ酸配列を含むヒンジと、配列番号２３（任意選択でＣ末端リジンを有する、すなわち、配列番号１３７）のアミノ酸配列を含むＦｃ１とを含む。

【０１１４】

上記のように、いくつかの態様では、第３のポリペプチドは、例えばヒンジ領域とＦｃ２との間にリンカーを含むことができる。リンカーは、本明細書で論じられるリンカーのいずれかを含むことができる。特定の態様では、第３のポリペプチドはリンカーを含まない。

【０１１５】

本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣにおける構成要素の構造配置、すなわち、上記の第１、第２、及び第３のポリペプチドを含むものは、有利なことに、同じ構成要素の異なる構造配置を有する活性化可能なポリペプチドと比較して、（活性化された場合の）活性の増加、及び凝集耐性の改善を示す。本明細書に提供される実施例は、本開示の活性化可能なＨＢＰＣの構造が、他の形式のマスクされた二重特異性構築物と比較して有益な特性を与えることを示唆する。結果は、異なる種の構築物間で一貫しており、抗体可変ドメイン、マスキング部分、及びその他の配列変数の種類に依存しないように見えた。

【０１１６】

本明細書で提供される活性化可能なＨＢＰＣは、第１のマスキング部分及び第２のマスキング部分（それぞれ、ＭＭ１及びＭＭ２）を含む。それぞれのＭＭは、活性化可能なＨＢＰＣにカップリングまたは他の方法で結合し、その標的へのＨＢＰＣの結合を妨害するように活性化可能なＨＢＰＣ内に位置するアミノ酸配列を有する。したがって、活性化可能なＨＢＰＣの解離定数（Ｋｄ）は、通常、対応する活性化されたＨＢＰＣ（またはＨＢＰＣ単独）のＫｄよりも大きい。適切な第１のＭＭ及び第２のＭＭは、さまざまな既知の技術のいずれかを使用して同定され得る。例えば、ペプチドＭＭは、米国特許出願公開第２００９／００６２１４２号及び同第２０１２／０２４４１５４号、ならびにＰＣＴ公開第ＷＯ２０１４／０２６１３６号に記載の方法を用いて同定することができ、そのそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１１７】

いくつかの態様では、ＶＨ１とＶＬ１は一緒になって、Ｔ細胞抗原ポリペプチド（すなわち、第１の標的）に特異的に結合するドメインを形成し、ＭＭ１は、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体の、Ｔ細胞抗原ポリペプチドに特異的に結合する能力を減弱させるものである。いくつかの態様では、ＶＨ２とＶＬ２は一緒になって、がん細胞抗原（すなわち、第２の標的）に特異的に結合するドメインを形成し、ＭＭ２は、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体の、がん細胞抗原に特異的に結合する能力を減弱させるものである。いくつかの態様では、ＭＭ１及び／またはＭＭ２は、抗原結合ドメイン（複数可）に特異的に結合する。

【０１１８】

例えば、さまざまな抗体結合ドメインと関連して本開示の実施に使用するのに適したマスキング部分としては、例えばＰＣＴ公開番号第ＷＯ２０１３／１６３６３１号、第ＷＯ２０１３／１９２５５０号、第ＷＯ２０１４／０５２４６２号、第ＷＯ２０１５／０６６２７９号、第ＷＯ２０１６／０１４９７４号、第ＷＯ２０１６／１４９２０１号、第ＷＯ２０１６／１７９２８５号、第ＷＯ２０１６／１７９２５７号、第ＷＯ２０１６／１７９３３５号、第ＷＯ２０１７／０１１５８０号、第ＷＯ２０１６／０１４９７４号、第ＷＯ２０１９／０７５４０５号、及び第ＷＯ２０１９／２１３４４４号に記載されているもの

を含む、当該技術分野で知られている任意のものが挙げられ、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本開示の実施における使用に適した抗ＣＤ３マスキング部分としては、例えばＰＣＴ公開番号第ＷＯ２０１６／０１４９７４号、第ＷＯ２０１９／０７５４０５号、及び第ＷＯ２０１９／２１３４４４号に記載されているものを含む、当該技術分野で知られている任意のものが挙げられ、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１１９】

本明細書で提供される活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、ＭＭ１及び／またはＭＭ２は、５アミノ酸～約４０アミノ酸、または５アミノ酸と４０アミノ酸の両方を含むそれらの間の任意の範囲を含む。

【０１２０】

本開示の活性化可能なＨＢＰＣは、第１の基質及び第２の基質（したがって、第１のＣＭ及び第２のＣＭ）がそれぞれ第１のプロテアーゼ及び第２のプロテアーゼによって切断されるときに活性化され、それによってマスキング部分をＨＢＰＣから切り離す。この態様では、それぞれのＣＭは１つ以上のプロテアーゼで切断可能な配列部位を有する。したがって、生じる活性化されたＨＢＰＣは、第１の標的及び第２の標的に自由に結合することができる。いくつかの態様では、第１の基質と第２の基質（したがって、第１のＣＭと第２のＣＭ）は同じである。これらの態様では、第１の基質と第２の基質（及び第１のＣＭと第２のＣＭ）は同じプロテアーゼによって切断可能であり、すなわち、第１のプロテアーゼと第２のプロテアーゼは同じである。いくつかの態様では、第１の基質と第２の基質は異なる（したがって、第１のＣＭと第２のＣＭは異なる）。これらの態様の特定のものでは、第１のプロテアーゼと第２のプロテアーゼは同じである。これらの他の態様では、第１のプロテアーゼと第２のプロテアーゼは異なる。

【０１２１】

いくつかの態様では、ＣＭは、腫瘍微小環境において上方制御されるプロテアーゼに特異的である。このような活性化可能なＨＢＰＣは、治療及び／または診断の部位での標的化ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド（ＨＢＰＣ）の活性化のために、腫瘍細胞における調節不全のプロテアーゼ活性を利用する。多数の研究により、固形腫瘍における異常なプロテアーゼレベル（例えば、ｕＰＡ、レグマイン、ＭＴ－ＳＰ１、マトリックスメタロプロテアーゼ（ＭＭＰ）など）の相関関係が実証されている。（例えば、Ｍｕｒｔｈｙ Ｒ Ｖ，ｅｔ ａｌ．“Ｌｅｇｕｍａｉｎ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｒｅｌａｔｉｏｎ ｔｏ ｃｌｉｎｉｃｏｐａｔｈｏｌｏｇｉｃ ａｎｄ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｖａｒｉａｂｌｅｓ ｉｎ ｃｏｌｏｒｅｃｔａｌ ｃａｎｃｅｒ，” Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１１（２００５）：２２９３－２２９９；Ｎｉｅｌｓｅｎ Ｂ Ｓ，ｅｔ ａｌ．“Ｕｒｏｋｉｎａｓｅ ｐｌａｓｍｉｎｏｇｅｎ ａｃｔｉｖａｔｏｒ ｉｓ ｌｏｃａｌｉｚｅｄ ｉｎ ｓｔｒｏｍａｌ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｄｕｃｔａｌ ｂｒｅａｓｔ ｃａｎｃｅｒ，” Ｌａｂ Ｉｎｖｅｓｔ ８１（２００１）：１４８５－１５０１；Ｌｏｏｋ Ｏ Ｒ，ｅｔ ａｌ．“Ｉｎ ｓｉｔｕ ｌｏｃａｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｇｅｌａｔｉｎｏｌｙｔｉｃ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｉｎ ｔｈｅ ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｍａｔｒｉｘ ｏｆ ｍｅｔａｓｔａｓｅｓ ｏｆ ｃｏｌｏｎ ｃａｎｃｅｒ ｉｎ ｒａｔ ｌｉｖｅｒ ｕｓｉｎｇ ｑｕｅｎｃｈｅｄ ｆｌｕｏｒｏｇｅｎｉｃ ＤＱ－ｇｅｌａｔｉｎ，” Ｊ Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．５１（２００３）：８２１－８２９を参照されたい）。ＣＭは、複数のプロテアーゼの基質として、例えばセリンプロテアーゼと第２の異なるプロテアーゼ、例えばＭＭＰの基質として機能することができる。いくつかの態様では、ＣＭは、２つ以上のセリンプロテアーゼ、例えばマトリプターゼ及び／またはｕＰＡの基質として機能することができる。いくつかの態様では、ＣＭは、２つ以上のＭＭＰ、例えば、ＭＭＰ９及びＭＭＰ１４の基質として機能することができる。

【０１２２】

いくつかの態様では、ＣＭ１及び／またはＣＭ２は、以下の表３に示すプロテアーゼの

基質であるアミノ酸配列を含む。特定の態様では、ＣＭ１とＣＭ２はそれぞれ独立して、以下の表３に示すプロテアーゼの基質であるアミノ酸配列を含む。

表３．例示的なプロテアーゼ

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

カテプシンB	MMP15	TMPRSS4
カテプシンC	MMP16	
カテプシンK	MMP17	
カテプシンL	MMP20	
カテプシンS	MMP23	
カテプシンV/L2	MMP24	
カテプシンX/Z/P	MMP26	
	MMP27	

【０１２３】
本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいくつかの態様では、ＣＭ１及び／またはＣＭ２は、約３個のアミノ酸～約１５個のアミノ酸を含む。いくつかの態様では、ＣＭ１及び／またはＣＭ２は、２つ以上の切断部位を含んでもよい。いくつかの態様では、ＣＭ１は、１つのプロテアーゼに対して２つ以上の切断部位を含んでもよい。いくつかの態様では、ＣＭ２は、２つ以上のプロテアーゼに対して２つ以上の切断部位を含んでもよい。いくつかの態様では、第１のプロテアーゼと第２のプロテアーゼは同じプロテアーゼである。いくつかの態様では、ＣＭ１とＣＭ２は同じプロテアーゼに対する異なる基質を含む。いくつかの態様では、ＣＭ１とＣＭ２は同じアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、ＣＭ１とＣＭ２は、異なるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、ＣＭ１は配列番号７３のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、ＣＭ１は配列番号２のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、ＣＭ２は配列番号１４のアミノ酸配列を含む。特定の態様では、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣは、配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＭ１と配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＭ２を含む。いくつかの態様では、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣは、配列番号７３のアミノ酸配列を含むＣＭ１と配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＭ２を含む。
【０１２４】
本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣでの使用に適した例示的なＣＭとしては、当該技術分野で知られているＣＭが挙げられる。例示的なＣＭとしては、例えば表４に記載されているもの、ならびに国際公開番号第ＷＯ２００９／０２５８４６号、第ＷＯ２０１０／０８１１７３号、第ＷＯ２０１５／０１３６７１号、第ＷＯ２０１５／０４８３２９号、第ＷＯ２０１５／１１６９３３号、第ＷＯ２０１６／０１４９７４号、及び第ＷＯ２０１６／１１８６２９号（これらのそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。
【０１２５】
いくつかの態様では、ＣＭ１及び／またはＣＭ２は、以下の表４に示すアミノ酸配列を含む。特定の態様では、ＣＭ１とＣＭ２はそれぞれ独立して、以下の表４に示すアミノ酸配列を含む。

表４．切断可能な部分

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

108	AVGLLAPPGGLSGRSANI
109	ISSGLLSGRSDNI
110	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
111	ISSGLLSGRSGNH
156	ALAHGLF
157	APRSALAHGLF
158	ISSGLLSGRSNI
159	LSGRSNI

【０１２６】
本開示の活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド（ＨＢＰＣ）のいくつかの態様では、第１のポリペプチドは、ＭＭとＣＭとの間に１つ以上のリンカーを含む。いくつかの態様では、ＭＭ１はリンカーを介してＣＭ１に結合される。いくつかの態様では、ＭＭ２はリンカーを介してＣＭ２に結合される。いくつかの態様では、ＭＭ１はリンカーＬ１を介してＣＭ１に連結され、ＣＭ１はリンカーＬ２を介して抗ＣＤ３　ｓｃＦｖに連結される。いくつかの態様では、ＭＭ２はリンカーＬ３を介してＣＭ２に連結され、ＣＭ２はリンカーＬ４を介してｓｃＦｖに連結される。いくつかの態様では、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、及び／またはＬ４のアミノ酸配列は同じである。いくつかの態様では、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、及び／またはＬ４のアミノ酸配列は異なる。
【０１２７】
いくつかの態様では、活性化可能なＨＢＰＣは、ＣＭと標的化ドメインまたはその可変ドメインとの間にリンカーを含む。本明細書に記載の活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド（ＨＢＰＣ）における使用に適したリンカーは、一般に、標的への活性化可能なポリペプチドの結合の阻害を促進するために、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド（ＨＢＰＣ）の柔軟性を提供するものである。そのようなリンカーは一般にフレキシブルリンカーと呼ばれる。適切なリンカーは容易に選択することができ、１個のアミノ酸（例えばＧｌｙ）～２０個のアミノ酸、２個のアミノ酸～１５個のアミノ酸、３個のアミノ酸～１２個のアミノ酸、４個のアミノ酸～１０個のアミノ酸、５個のアミノ酸～９個のアミノ酸、６個のアミノ酸～８個のアミノ酸、または７個のアミノ酸～８個のアミノ酸などの適切な異なる長さのいずれであってもよく、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０アミノ酸の長さであってもよい。
【０１２８】
例示的なフレキシブルリンカーとしては、グリシンポリマー（Ｇ）ｎ、グリシン－セリンポリマー（例えば、（ＧＳ）ｎ、（ＧＳＧＧＳ）ｎ、（ＧＧＧＳ）ｎ、及び（ＧＧＧＧＳ）ｎ（それぞれ、配列番号４１及び配列番号４０）を含み、式中、ｎは、少なくとも１の整数である）、グリシン－アラニンポリマー、アラニン－セリンポリマー、及び当該技術分野で既知の他のフレキシブルリンカーが挙げられる。グリシン及びグリシン－セリンポリマーは、比較的構造化されていないため、構成要素間の中立的なつなぎとして機能し得る。グリシンは、アラニンよりもさらにφ－φ空間に有意にアクセスし、より長い側鎖を有する残基ほど制限がない（例えば、Ｓｃｈｅｒａｇａ，Ｒｅｖ．Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ　Ｃｈｅｍ．１１１７３－１４２（１９９２）を参照されたい）。当業者であれば、活性化可能なポリペプチドの設計は、すべてまたは部分的にフレキシブルリンカーを含むことができ、その結果、リンカーは、フレキシブルリンカーだけでなく、所望の構造を提供するために柔軟性の低い構造を与える１つ以上の部分を含むことができることを認識するであろう。
【０１２９】

本明細書に記載の活性化可能な二重特異性ポリペプチド複合体（すなわち、ＨＢＰＣ）は、以下の位置の１つ以上にリンカーを含むことができる：（ａ）ＭＭ１とＣＭ１の間及び／またはＣＭ１とｓｃＦｖの間（すなわち、ＣＭ１とｓｃＦｖの重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）の間、またはＣＭ１とｓｃＦｖの軽鎖可変ドメインの間）；（ｂ）ＭＭ２とＣＭ２の間；（ｂ）ｓｃＦｖの重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインの間；（ｃ）重鎖可変ドメインとＣＨ１ドメインの間；（ｄ）ＣＨ１ドメインとヒンジ領域の間；（ｅ）ヒンジ領域とＦｃドメインの間；（ｇ）ＣＭ２と軽鎖可変ドメインの間；（ｈ）軽鎖可変ドメインとＣＬの間；（ｉ）ＣＨ１ドメインと第２のＦｃドメインの間；（ｊ）ＣＨ１ドメインとヒンジ領域の間；及び／または（ｋ）ヒンジ領域と第２のＦｃドメインの間。

【０１３０】

いくつかの態様では、リンカーは以下からなる群から選択される：（ｉ）（ＧＳ）ｎ（式中、ｎは少なくとも１の整数であり、いくつかの態様では、ｎは１～１０の整数である）、（ＧＧＳ）ｎ（式中、ｎは少なくとも１の整数であり、いくつかの態様では、ｎは１～１０の整数である）、（ＧＧＧＳ）ｎ（配列番号４０）（式中、ｎは少なくとも１の整数であり、いくつかの態様では、ｎは１～１０の整数である）、（ＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号１２６）（式中、ｎは少なくとも１の整数である）、（ＧＳＧＧＳ）ｎ（配列番号４１）（式中、ｎは少なくとも１の整数であり、いくつかの態様では、ｎは１～１０の整数である）、ＧＳＳＧＧＳＧＧＳＧ（配列番号１２）、ＧＧＳＧ（配列番号４２）、ＧＧＳＧＧ（配列番号４３）、ＧＳＧＳＧ（配列番号４４）、ＧＳＧＧＧ（配列番号４５）、ＧＧＧＳＧ（配列番号４６）、及びＧＳＳＳＧ（配列番号４７）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号４８）、ＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号４９）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５０）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５１）、ＧＧＧＧＳ（配列番号５２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５３）、ＧＧＧＳ（配列番号５４）、ＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号５５）、ＧＧＧＳＧＧＧＳＧＧＧＳ（配列番号５６）、ＧＳＳＧＧＳＧＧＳＧ（配列番号５７）、ＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号５８）、ＧＧＧＳＳＧＧＳ（配列番号１２７）、及びＧＳからなる群から選択されるグリシン－セリンベースのリンカー；ならびに（ｉｉ）ＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＳＥＧＳＴ（配列番号５９）、ＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣＰＡＰＥＦＬＧ（配列番号６０）、ＧＧＳＬＤＰＫＧＧＧＧＳ（配列番号６１）、ＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ（配列番号６２）、ＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＳ（配列番号６３）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＫＧ（配列番号６４）、ＧＳＴＳＧＳＧＫＳＳＥＧＳＧＳＴＫＧ（配列番号６５）、及びＧＳＴＳＧＳＧＫＰＧＳＧＥＧＳＴＫＧ（配列番号６６）からなる群から選択される、グリシン及びセリン、ならびにリジン、トレオニン、またはプロリンのうちの少なくとも１つを含むリンカー。

【０１３１】

本開示のいくつかの態様では、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体は、上記の構成要素に加えて構成要素を含むことができる。このような構成要素はスペーサーを含んでもよい。「スペーサー」という用語は、本明細書では、第１、第２、及び／または第３のポリペプチドの遊離末端に組み込まれたアミノ酸残基またはペプチドを指す。本開示の実施における使用に適したスペーサーとしては、任意の単一アミノ酸残基または任意のペプチドが挙げられる。適切なスペーサーとしては、例えば、国際公開番号第ＷＯ２０１６／０１４９７４号、第ＷＯ２０１９／０７５４０５号、及び第ＷＯ２０１９／２１３４４４号に記載されているもののいずれかが含まれ、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１３２】

いくつかの態様では、スペーサーは、約１個のアミノ酸～約１０個のアミノ酸（例えば、約１、２、３、４、５、６、７、８もしくは９個のアミノ酸）またはその間の任意の数を含み得る。本明細書に記載の活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体のいくつかの態様では、スペーサーは、ＭＭ１及び／またはＭＭ２に対してＮ末端に位置する。いくつかの態様では、スペーサーは、ＱＧＱＳＧＳ（配列番号１１６）の配列を有

する。いくつかの態様では、スペーサーは、ＱＧＱＳＧＱＧ（配列番号１１７）の配列を有する。いくつかの態様では、スペーサーは、ＱＧＱＳＧＳ（配列番号１１８）の配列を有する。いくつかの態様では、スペーサーは、ＱＧＱＳＧＱＧ（配列番号１１９）の配列を有する。

【０１３３】

いくつかの態様では、本明細書に記載の活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体の第１のＦｃドメイン及び第２のＦｃドメイン（それぞれＦｃ１及びＦｃ２）は、ＩｇＧ１　ＦｃドメインもしくはＩｇＧ４　Ｆｃドメイン（例えば、ヒトＩｇＧ１　ＦｃドメインもしくはヒトＩｇＧ４　Ｆｃドメイン）、またはそのバリアントである。いくつかの態様では、Ｆｃ１及び／またはＦｃ２は、天然（例えば、ヒト）ＩｇＧ１　Ｆｃドメインの改変されたバリアントである。いくつかの態様では、Ｆｃ１及び／またはＦｃ２は、天然（例えば、ヒト）ＩｇＧ４　Ｆｃドメインの改変されたバリアントである。

【０１３４】

本開示のいくつかの態様では、Ｆｃ１及び／またはＦｃ２として使用されるＦｃドメインは、天然のＦｃアミノ酸配列の変異型である。変異は、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド（及びそれに応じて、活性化されたＨＢＰＣ）に所望の有益な特性を与える可能性がある。例えば、ＦｃＲｎ結合部位における特定の変異は、エフェクター機能を調節することが知られている（例えば、Ｐｅｔｋｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８：１７５９－１７６９，２００６；Ｄｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＭＡｂｓ　４：１０１－１０９，２０１２；及びＯｌａｆｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．９０７：５３７－５５６，２０１２を参照されたい）。エフェクター機能を調節できる任意の既知の変異をＦｃドメインに含めることは適切である。例えば、Ｆｃアミノ酸配列におけるＮ２９７ＡまたはＮ２９７Ｇの変異は、標的に依存しない傷害性を減少させる可能性があるＩｇＧエフェクター機能（例えば、ＡＤＣＣ及びＣＤＣ）を減少させるために使用され得る（例えば、Ｌｕｎｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２９：３５－３９，１９９２を参照されたい）。本開示との関連での使用に適したＦｃドメインとしては、非限定的に、任意の既知のヘテロ二量体Ｆｃ（例えば、ノブインホールなど）を含む、当該技術分野で既知の任意のＦｃドメインが挙げられる。

【０１３５】

いくつかの態様では、本明細書に開示される活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体は、免疫グロブリンヒンジ領域をさらに含む。適切なヒンジ領域としては、当該技術分野で知られている任意のヒンジ領域が挙げられる。例えば、免疫グロブリンの５つの主要なクラスのいずれか：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭ、またはそのサブクラス（アイソタイプ）（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）のヒンジ領域が本開示での使用に適している。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なるよく知られたサブユニット構造及び３次元構成を有する。

【０１３６】

本明細書に記載の活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体のいくつかの態様では、Ｆｃ１は、配列番号２３（任意選択でＣ末端リジンを有する（すなわち、配列番号２４））と、少なくとも９０％同一、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、または少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む。

【０１３７】

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

【０１３８】

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

【０１３９】

本明細書の他の箇所で提供されるように、本明細書に開示される活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体の形式または構造は、リンカー及びスペーサーを含む任意選択での追加の成分を任意の数だけ含むことができる。単なる例として、以下に説明する構造は、企図される態様の一つである。しかしながら、以下に示す態様は、決して本開示を限定するものではない。

【０１４０】

いくつかの態様では、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体は、構造（Ｉ）を有する第１のポリペプチドを含む。

第１のポリペプチド構造（Ｉ）：

（Ｓ１）－ＭＭ１－（Ｌ１）－ＣＭ１－Ｌ２－ＶＨ１－Ｌ３－ＶＬ１－（Ｌ４）－ＶＨ２－（Ｌ５）－（ＣＨ１１）－（Ｌ６）－（ヒンジ１）－（Ｌ７）－Ｆｃ１、

式中、

・　（Ｓ１）は任意選択でのスペーサーであり；

・　ＭＭ１は、第１の標的化ドメインのマスキング部分であり、

・　（Ｌ１）、（Ｌ４）、（Ｌ５）、（Ｌ６）、及び（Ｌ７）はそれぞれ独立して任意選択でのリンカーであり、

・　Ｌ２とＬ３はリンカーであり、

・　（ＣＨ１１）は任意選択でのＣＨ１ドメインであり、

・　（ヒンジ１）は任意選択でのヒンジ領域であり、

・　Ｆｃ１は上記の通りである。

【０１４１】

いくつかの態様では、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体は、構造（ＩＩ）を有する第２のポリペプチドを含む。

第２のポリペプチド構造（ＩＩ）：

（Ｓ２）－（Ｌ８）－ＭＭ２－（Ｌ９）－ＣＭ２－（Ｌ１０）－ＶＬ２－（ＣＬ）

式中、

・　（Ｓ２）は任意選択でのスペーサーであり；

・　（Ｌ８）、（Ｌ９）、及び（Ｌ１０）はそれぞれ独立して任意選択でのリンカーであり、

・　ＭＭ２は、第２の標的化ドメインのマスキング部分であり、

・　ＶＬ２は上記の通りであり、

・　（ＣＬ）は任意選択での軽鎖定常ドメインである。

【０１４２】

いくつかの態様では、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体は、構造（ＩＩＩ）を有する第３のポリペプチドを含む。

第３のポリペプチド構造（ＩＩＩ）：

（Ｓ３）－（ＣＨ１２）－（Ｌ１１）－（ヒンジ２）－（Ｌ１２）－Ｆｃ２

式中、

・　（Ｓ３）は任意選択でのスペーサーであり；

・　（ＣＨ１２）は任意選択でのＣＨ１ドメインであり、

・　（Ｌ１１）及び（Ｌ１２）はそれぞれ独立して任意選択でのリンカーであり、

・　Ｆｃ２は上記の通りである。

【０１４３】

構造（Ｉ）、（ＩＩ）、及び（ＩＩＩ）での使用に適したリンカー、スペーサー、ＭＭ、ＣＭ、Ｆｃドメイン、ＣＨ１（すなわち、ＣＨ１１及びＣＨ１２）ドメイン、ヒンジ領域、及びＣＬとしては、当該技術分野において既知のもの、または本明細書に記載されているものが挙げられる。

【０１４４】
本開示のいくつかの態様では、活性化可能なＨＢＰＣは、（ａ）（ｉ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、ＶＨ１とＶＬ１が一緒になってＴ細胞抗原ポリペプチドに特異的に結合するＴ細胞抗原標的化ドメインを形成する、単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第１のマスキング部分（ＭＭ１）、（ｉｉｉ）第１の切断可能部分（ＣＭ１）；（ｉｖ）第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、（ｖ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、（ｖｉ）重鎖ＣＨ１ドメイン、及び（ｖｉｉ）ＣＨ１ドメインとＦｃ１の間の第１の免疫グロブリンヒンジ領域（ＨＲ１）、を含む第１のポリペプチドと；（ｂ）（ｉ）軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）であって、ＶＨ２とＶＬ２が一緒になってがん細胞表面抗原に特異的に結合するがん細胞表面抗原標的化ドメインを形成するＶＬ２、（ｉｉ）第２のマスキング部分（ＭＭ２）、（ｉｉｉ）第２の切断可能部分（ＣＭ２）、及び（ｉｖ）軽鎖定常ドメインＣＬ１、を含む第２のポリペプチドと；（ｃ）（ｉ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）及び免疫グロブリンヒンジ領域を含み、かつ（ｉｉ）免疫グロブリン可変ドメインを含まない、第３のポリペプチドと、を含む。
【０１４５】
特定の態様では、第１のポリペプチドは、
ＭＭ１－ＣＭ１－ｓｃＦｖ１－ＶＨ２－ＣＨ１－ＨＲ１－Ｆｃ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み；
第２のポリペプチドは、
ＭＭ２－ＣＭ２－ＶＬ２－ＣＬ１のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み；
第３のポリペプチドは、ＨＲ２－Ｆｃ２のアミノ末端からカルボキシ末端までの構造配置を含み、それぞれの「－」は、独立して、直接的または間接的な（例えば、リンカーを介した）連結である。いくつかの態様では、第３のポリペプチドは、本質的にＨＲ２－Ｆｃ２からなるか、またはＨＲ２－Ｆｃ２からなり、それぞれの「－」は、独立して、直接的または間接的な（例えば、リンカーを介した）連結である。
【０１４６】
いくつかの態様では、第１のポリペプチドのＨＲ１と第２のポリペプチドのＨＲ２は、同じアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、第１のポリペプチドのＨＲ１と第２のポリペプチドのＨＲ２は、異なるアミノ酸配列を含む。
【０１４７】
本開示はまた、（ａ）（ｉ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、ＶＨ１とＶＬ１が一緒になって第１の標的に特異的に結合する第１の標的化ドメインを形成する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、及び（ｉｉｉ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、を含む第１のポリペプチドと；（ｂ）第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）を含み、ＶＨ２とＶＬ２が一緒になって第２の標的に特異的に結合する第２の標的化ドメインを形成する、第２のポリペプチドと；（ｃ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）を含む第３のポリペプチドと、を含み、第３のポリペプチドが免疫グロブリン可変ドメインを含まない、ヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（例えば、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのＨＢＰＣ構成要素）を提供する。いくつかの態様では、上記のＨＢＰＣ構築物は、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣの「活性化」によって生成され得る。本開示の活性化可能なＨＢＰＣに適しているとして本明細書に記載されるＶＨ１、ＶＬ１（及びｓｃＦｖ）、ＶＨ２、ＶＬ２、Ｆｃ１、Ｆｃ２、及び任意選択のリンカー、ＨＲ１、ＨＲ２、及びＣＨ１構成要素のいずれも、上記のＨＢＰＣ構築物に適している。ＨＢＰＣの３つのポリペプチドは、（ａ）（ｉ）第１の重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）及び第１の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）を含み、ＶＨ１とＶＬ１が一緒になって第１の標的に特異的に結合する第１の標的化ドメインを形成する単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、（ｉｉ）第２の重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）、及び（ｉｉｉ）第１の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ１）、を含む第１のポリペプチドと；（ｂ）第２の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）を含み、ＶＨ２とＶＬ２が一緒になって第

２の標的に特異的に結合する第２の標的化ドメインを形成する、第２のポリペプチドと；（ｃ）第２の単量体Ｆｃドメイン（Ｆｃ２）を含み、かつ免疫グロブリン可変ドメインを含まない第３のポリペプチドと、の構成要素を含む構造を有する。

【０１４８】

キット

本明細書では、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣまたはそのＨＢＰＣのうちの１つ以上を含むキットが提供され、キットは診断または治療用である。特定の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書で提供される１つ以上の活性化可能なＨＢＰＣまたはその抗原結合断片などの、本明細書に記載の組成物の成分の１つ以上が充填された１つ以上の容器と、任意の使用説明書と、を含むパックまたはキットである。いくつかの態様では、キットは、本明細書に記載の組成物、及び本明細書に記載のものなどの任意の診断薬、予防薬、または治療薬を含む。

【０１４９】

治療的使用及び治療方法

いくつかの態様では、本明細書に提示されるのは、疾患、例えばがんの治療方法であって、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣもしくはそのＨＢＰＣ、または本明細書に記載のその医薬組成物を、疾患の治療を必要とする対象に投与することを含む、方法である。いくつかの態様では、本明細書に提示されるのは、腫瘍増殖の阻害を必要とする対象における腫瘍増殖を阻害する方法であって、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣもしくはＨＢＰＣ、または本明細書に記載されるその医薬組成物を、腫瘍増殖の阻害を必要とする対象に投与することを含む、方法である。いくつかの態様では、本開示は、医薬として使用するための、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣもしくはそのＨＢＰＣ、または本明細書に提供される医薬組成物に関する。通常、対象はヒトであるが、トランスジェニック動物を含む非ヒト哺乳動物もまた治療できる。

【０１５０】

状態の治療に有効な活性化可能なＨＢＰＣもしくはそのＨＢＰＣまたはその組成物の量は、疾患の性質に依存するであろう。組成物に使用される正確な用量は、投与経路及び疾患の重症度にも依存するであろう。

【０１５１】

疾患の非限定的な例としては、がん、関節リウマチ、クローン病、ＳＬＥ、心臓血管損傷、虚血などが挙げられる。例えば、適応症としては、Ｔ細胞急性リンパ性白血病（Ｔ－ＡＬＬ）を含む白血病、多発性骨髄腫を含む芽球性疾患、肺、結腸直腸、前立腺、膵臓、乳房などの固形腫瘍（トリプルネガティブ乳がんを含む）が挙げられ得る。例えば、適応症としては、原発腫瘍の起源に関係なく、骨疾患または癌の転移；乳癌、非限定的な例として、ＥＲ／ＰＲ＋乳癌、Ｈｅｒ２＋乳癌、トリプルネガティブ乳癌を含む；結腸直腸癌；子宮内膜癌；胃癌；膠芽腫；頭頸部癌、例えば頭頸部扁平上皮癌；食道癌；肺癌、例えば非限定的な例として、非小細胞肺癌；多発性骨髄腫卵巣癌；膵臓癌；前立腺癌；骨肉腫などの肉腫；腎臓癌、例えば、非限定的な例として、腎細胞癌；及び／または皮膚癌、例えば非限定的な例として、扁平上皮癌、基底細胞癌、または黒色腫を挙げることができる。

【０１５２】

ポリヌクレオチド

いくつかの態様では、本開示の活性化可能なＨＢＰＣ及びＨＢＰＣ構築物の第１、第２、及び／または第３のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド（本明細書ではそれぞれ対応して「第１のポリヌクレオチド」、「第２のポリヌクレオチド」、及び「第３のポリヌクレオチド」と呼ばれる）が本明細書に提供される。適切なポリヌクレオチドとしては、本明細書に記載される第１、第２、及び／または第３のポリペプチド、またはその一部のいずれかをコードするあらゆるものが挙げられる。第１、第２、及び第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の例示的なセットを以下に提供する。

【０１５３】
本開示のポリヌクレオチドは、例えばコドン／ＲＮＡ最適化、異種シグナル配列による置換、及びｍＲＮＡ不安定要素の除去によって、発現のために選択された宿主生物からの最適な産生のために最適化された配列であり得る。コドン変化（例えば、遺伝暗号の縮重による同じアミノ酸をコードするコドン変化）を導入すること、及び／またはｍＲＮＡ中の阻害領域を除去することによって、組換え発現のための活性化可能なＨＢＰＣまたはそのＨＢＰＣをコードする最適化された核酸を生成する方法は、適宜に、例えば米国特許第５，９６５，７２６号；同第６，１７４，６６６号；同第６，２９１，６６４号；同第６，４１４，１３２号；及び同第６，７９４，４９８号に記載されている最適化方法を適応させることによって実行できる。

【０１５４】
本明細書に記載のポリペプチドもしくはその抗原結合断片、またはそのドメインをコードするポリヌクレオチドは、当該技術分野で周知の方法（例えば、ＰＣＲ及び他の分子クローニング方法）を使用して、適切な供給源（例えば、ハイブリドーマ）からの核酸から生成することができる。例えば、既知の配列の３’末端及び５’末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するＰＣＲ増幅は、目的の抗体を産生するハイブリドーマ細胞から得られたゲノムＤＮＡを使用して実施することができる。このようなＰＣＲ増幅法を使用して、抗体またはその抗原結合断片の軽鎖及び／または重鎖をコードする配列を含む核酸を得ることができる。このようなＰＣＲ増幅法を使用して、抗体またはその抗原結合断片の可変軽鎖領域及び／または可変重鎖領域をコードする配列を含む核酸を得ることができる。増幅された核酸は、宿主細胞内での発現のためにベクターにクローニングされ、さらにクローニングされて、例えば、キメラ抗体及びヒト化抗体またはその抗原結合断片を生成することができる。

【０１５５】
本明細書で提供されるポリヌクレオチドは、ＲＮＡまたはＤＮＡであり得る。ＤＮＡにはｃＤＮＡ、ゲノムＤＮＡ、合成ＤＮＡが含まれ、ＤＮＡは二本鎖でも一本鎖でもよい。一本鎖の場合、ＤＮＡはコード鎖または非コード（アンチセンス）鎖になり得る。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは、ｃＤＮＡ、または１つ以上の内因性イントロンを欠くＤＮＡである。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは天然に存在しないポリヌクレオチドである。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは組換えによって生成される。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは単離される。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは実質的に純粋である。いくつかの態様では、ポリヌクレオチドは天然成分から精製される。

【０１５６】
ベクター、宿主細胞、及び生産方法
本明細書では、本開示の第１、第２、及び／または第３のポリペプチド（それぞれ、第１のポリヌクレオチド、第２のポリヌクレオチド、及び第３のポリヌクレオチドに対応する）をコードするポリヌクレオチドを含む１つ以上のベクターが提供される。いくつかの態様では、そのようなベクターは、本明細書において以下にさらに詳細に記載されるように、宿主細胞から活性化可能なＨＢＰＣ（またはＨＢＰＣ）のポリペプチドを組換え生産するために使用され得る。いくつかの態様では、ベクターは、１つ以上のプロモーター配列に作動可能に連結された第１、第２、及び／または第３のポリヌクレオチドを含む。特定の態様では、本開示は、第１、第２、及び第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（すなわち、第１、第２、及び第３のポリヌクレオチド）を集合的に含む複数のベクターを提供し、その複数は、第１、第２、及び第３のポリヌクレオチドのうちの２つ以下、または１つを含む少なくとも１つのベクターを含む。これらの態様では、複数のベクター中の第１、第２、及び第３のポリヌクレオチド配列は、通常、１つ以上のプロモーター配列に作動可能に連結される。

【０１５７】
また、本明細書では、上記ポリヌクレオチド及び／または本開示の活性化可能なＨＢＰ

ＣまたはＨＢＰＣのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを組換え発現するためのベクターのいずれかを含む組換え宿主細胞も提供される。種々の宿主発現ベクター系を利用して、本明細書に記載のポリペプチドを発現させることができる（例えば、米国特許第５，８０７，７１５号を参照されたい）。そのような宿主発現系は、目的のコード配列を産生し、その後精製することができる媒体を表すが、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換またはトランスフェクトすると、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合断片をインサイチュで発現できる細胞も表す。上記のポリヌクレオチドの組換え発現宿主として使用するのに適した例示的な宿主細胞としては、哺乳類細胞系（例えば、ＣＯＳ（例えば、ＣＯＳ１またはＣＯＳ）、ＣＨＯ、ＢＨＫ、ＭＤＣＫ、ＨＥＫ２９３、ＮＳ０、ＰＥＲ．Ｃ６、ＶＥＲＯ、ＣＲＬ７Ｏ３Ｏ、ＨｓＳ７８Ｂｓｔ、ＨｅＬａ、及びＮＩＨ　３Ｔ３、ＨＥＫ－２９３Ｔ、ＨｅｐＧ２、ＳＰ２１０、Ｒ１．１、Ｂ－Ｗ、Ｌ－Ｍ、ＢＳＣ１、ＢＳＣ４０、ＹＢ／２０、ＢＭＴ１０細胞など）が挙げられる。組換え哺乳動物宿主細胞の構築に使用されるベクターは、哺乳動物細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルス由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス７．５Ｋプロモーター）を含み得る。いくつかの態様では、組換え宿主細胞はＣＨＯ細胞またはＮＳ０細胞である。

【０１５８】

いくつかの態様では、本明細書に記載のポリペプチド、例えば第１、第２、及び／または第３のポリペプチドの組換え発現は、第１、第２、及び／または第３のポリヌクレオチドを含む発現ベクターの構築を伴う。本開示の活性化可能なＨＢＰＣまたはＨＢＰＣをコードするポリヌクレオチドを含むベクター（複数可）は、当該技術分野で周知の技術を使用する組換えＤＮＡ技術によって容易に生成することができる。当業者に周知の方法を使用して、本明細書に記載のポリペプチド、例えば、第１、第２、及び／または第３のポリペプチドをコードする１つ以上のポリヌクレオチドと、適切な転写及び翻訳の制御シグナルとを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成技術、及びインビボ遺伝子組換えが挙げられる。プロモーターに作動可能に連結されたヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターも提供される。このようなベクターは、例えば、本明細書に記載のポリペプチド、例えば第１、第２、及び／または第３のポリペプチドの定常領域、ならびにポリペプチドの可変領域をコードするヌクレオチド配列を含むことができ（例えば、国際公開番号第ＷＯ８６／０５８０７号及び第ＷＯ８９／０１０３６号、ならびに米国特許第５，１２２，４６４号を参照されたい）、ＶＨ全体、ＶＬ全体、またはＶＨ全体とＶＬ全体の両方を発現させるために、ポリペプチドの可変ドメインをそのようなベクターにクローニングすることができる。

【０１５９】

発現ベクターは、従来の技術によって細胞（例えば、宿主細胞）に導入することができ、次いで、得られた細胞を従来の技術によって培養して、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣまたはＨＢＰＣを産生することができる。したがって、本明細書で提供されるのは、宿主細胞におけるそのような配列の発現のためのプロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載のＨＢＰＣをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞である。いくつかの態様では、宿主細胞は、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣもしくはＨＢＰＣ、またはそのドメインをコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含むベクターを含む。いくつかの態様では、宿主細胞は、３つの異なるベクター、すなわち、本明細書に記載の第１のポリペプチドをコードする第１のポリヌクレオチドを含む第１のベクター、本明細書に記載の第２のポリペプチドをコードする第２のポリヌクレオチドを含む第２のベクター、及び本明細書に記載の第３のポリペプチドをコードする第３のポリヌクレオチドを含む第３のベクターを含む。

【０１６０】

いくつかの態様では、第１、第２、及び第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを集合的に含むベクターの集合が本明細書で提供され、それぞれのベクターは、第１、第２、または第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのうちの１つのみまた

は２つのみを含む。特定の態様では、第１、第２、及び第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（すなわち、それぞれ第１、第２、及び第３のポリヌクレオチド）を含む単一のベクターが本明細書で提供される。

【０１６１】

いくつかの態様では、本開示は、本開示の活性化可能なＨＢＰＣを産生する方法であって、（ａ）本開示のポリペプチドをコードする１つ以上のポリヌクレオチド（例えば、第１のポリヌクレオチド、第２のポリヌクレオチド、及び／または第３のポリヌクレオチド、ならびに前述のポリヌクレオチドを含むベクター（複数可））を含む宿主細胞を、活性化可能なＨＢＰＣを産生するのに十分な条件下で液体培地中で培養することと；（ｂ）活性化可能なＨＢＰＣを回収することと、を含む、方法を提供する。

【０１６２】

特定の態様では、宿主細胞内でその第１、第２、及び第３のポリペプチドを発現させることを含む、本開示の活性化可能なＨＢＰＣを産生する方法が本明細書に提供される。より具体的には、本明細書に提供されるのは、活性化可能なＨＢＰＣを産生する方法であって、（ａ）本開示のポリペプチドをコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、活性化可能なＨＢＰＣを産生するのに十分な条件下で液体培地中で培養することと；（ｂ）活性化可能なＨＢＰＣを回収することと、を含む方法である。別の態様では、方法は、活性化可能なＨＢＰＣを含む水性組成物を、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、セラミックハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーなどの単位操作に供することを含む、活性化可能なＨＢＰＣまたは他の工程内組成物のバイオハーベスト（無細胞発現産物）を精製することをさらに含む。特定の態様では、単位操作はセラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーである。

【０１６３】

さらなる態様では、本開示のＨＢＰＣを産生する方法であって、該方法が、宿主細胞内でその第１、第２、及び第３のポリペプチドを発現させることを含む、方法が本明細書に提供される。より具体的には、本明細書で提供されるのは、本開示のＨＢＰＣを産生する方法であって、（ａ）本開示のポリペプチドをコードする１つ以上のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、ＨＢＰＣを産生するのに十分な条件下で液体培地中で培養することと；（ｂ）ＨＢＰＣを回収することと、を含む方法である。別の態様では、方法は、活性化可能なＨＢＰＣを含む水性組成物を、例えば、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、セラミックハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーなどの単位操作に供することを含む、ＨＢＰＣまたは他の工程内組成物のバイオハーベスト（無細胞発現産物）を精製することをさらに含む。特定の態様では、単位操作はセラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーである。

【０１６４】

組成物

いくつかの態様では、本開示の活性化可能なＨＢＰＣまたはそのＨＢＰＣは、本明細書に開示される治療用途のいずれかに有用な医薬組成物に利用することができる。特定の態様では、医薬組成物は、治療有効量の１つ以上の活性化可能なＨＢＰＣを、薬学的に許容される希釈剤または担体と共に含む。他の態様では、医薬組成物は、治療有効量の１つ以上の活性化可能なＨＢＰＣと、薬学的に許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤、及び／またはアジュバントと、を含む。許容される製剤材料は、使用される用量及び濃度ではレシピエントに対して非毒性である。医薬組成物は、液体、凍結、または凍結乾燥した組成物として製剤化することができる。

【０１６５】

特定の態様では、薬学的組成物は、例えば、組成物のｐＨ、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、臭気、無菌性、安定性、溶解速度または放出速度、吸着または浸透を改変、維持または保存するための製剤物質を含んでもよい。適切な製剤材料としては、アミノ酸；抗菌剤；酸化防止剤；緩衝剤；増量剤；キレート剤；錯化剤；充填剤；単糖類または二糖

類などの炭水化物；タンパク質；着色料、香料及び希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー；低分子量ポリペプチド；塩形成対イオン（ナトリウムなど）；防腐剤；溶剤（グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）；糖アルコール；懸濁剤；界面活性剤または湿潤剤；安定性増強剤；等張化剤；送達ビヒクル；及び／または医薬用アジュバントが挙げられるが、これらに限定されない。医薬組成物に組み込むことができる適切な薬剤の追加の詳細及び選択肢は、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，２２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，（Ｌｏｙｄ Ｖ．Ａｌｌｅｎ，ｅｄ．）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ（２０１３）；Ａｎｓｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ，７ｔｈ ｅｄ．，Ｌｉｐｐｅｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ（２００４）；及びＫｉｂｂｅ ｅｔ ａｌ．，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ，３ｒｄ ｅｄ．，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ（２０００）に提供される。

【０１６６】

医薬組成物の成分は、例えば、意図される投与経路、送達形式、及び所望の投与量に応じて選択される。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，２２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，（Ｌｏｙｄ Ｖ．Ａｌｌｅｎ，ｅｄ．）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ（２０１３）を参照されたい。組成物は、開示された抗原結合タンパク質の物理的状態、安定性、インビボ放出速度、及びインビボクリアランス速度に影響を及ぼすように選択される。医薬組成物中の主要なビヒクルまたは担体は、本質的に水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、適切なビヒクルまたは担体は、注射用水または生理食塩水であり得る。特定の態様では、抗原結合タンパク質組成物は、所望の純度を有する選択された組成物を、凍結乾燥ケークまたは水溶液の形態で、任意選択での製剤用の剤と混合することによって保存のために調製され得る。さらに、特定の態様では、抗原結合タンパク質は、適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として製剤化することができる。

【０１６７】

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

【０１６８】

いくつかの組成物には緩衝剤またはｐＨ調整剤が含まれる。代表的な緩衝液としては、有機酸塩（クエン酸、酢酸、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、またはフタル酸の塩など）；Ｔｒｉｓ；リン酸緩衝液；及び場合によっては、以下に記載するようなアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。特定の態様では、組成物を生理学的ｐＨまたはわずかに低いｐＨ、典型的には約５～約８のｐＨ範囲内に維持するために緩衝剤が使用される。一部の組成物は、約５～６、６～７、または７～８のｐＨを有する。他の態様では、ｐＨは５．５～６．５、６．５～７．５、または７．５～８．５である。

【０１６９】

一部の組成物では、遊離アミノ酸またはタンパク質が増量剤、安定剤、及び／または抗酸化剤として使用される。一例として、リジン、プロリン、セリン、及びアラニンは、製剤中のタンパク質を安定化するために使用できる。グリシンは、正しいケークの構造と特性を確保するために凍結乾燥において有用である。アルギニンは、液体製剤と凍結乾燥製剤の両方において、タンパク質の凝集を阻害するのに有用であり得る。メチオニンは抗酸化物質として有用である。グルタミンとアスパラギンはいくつかの態様で含まれている。

アミノ酸は緩衝能力があるため、一部の製剤に含まれている。このようなアミノ酸としては、例えば、アラニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リジン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテームなどが挙げられる。特定の製剤には、血清アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）及び組換えヒトアルブミン（ｒＨＡ））、ゼラチン、カゼインなどのタンパク質賦形剤も含まれる。

【０１７０】

いくつかの組成物にはポリオールが含まれる。ポリオールとしては、糖（例えば、マンニトール、スクロース、トレハロース、及びソルビトール）、ならびに多価アルコール、例えば、グリセロール及びプロピレングリコール、及びポリエチレングリコール（ＰＥＧ）及び関連物質が挙げられる。ポリオールはコスモトロピックである。これらは、タンパク質を物理的分解プロセス及び化学的分解プロセスから保護するために、液体製剤と凍結乾燥製剤の両方において有用な安定剤である。ポリオールは、製剤の張性を調整するのにも有用である。

【０１７１】

特定の組成物には、安定剤としてマンニトールが含まれている。通常、スクロースなどの凍結保護剤と一緒に使用される。ソルビトールとスクロースは、張度を調整するために、また、輸送中及び製造プロセス中のバルク製品の調製中の凍結融解ストレスから保護するための安定剤として、有用である。ＰＥＧは、タンパク質を安定化するために、また凍結保護剤として有用であり、この点に関して本開示において使用することができる。

【０１７２】

一部の製剤に、単糖類、二糖類、三糖類、四糖類、オリゴ糖；アルジトール、アルドン酸、エステル化糖などの誘導体化糖；多糖類または糖ポリマーなどの糖類が含まれていてもよい。例えば、適切な炭水化物賦形剤としては、例えば、単糖類、例えば、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、Ｄ－マンノース、ソルボース等；二糖類、例えば、ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオース等；多糖類、例えば、ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプン等；及びアルジトール、例えば、マンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトール、ソルビトール（グルシトール）、ミオイノシトールなどが挙げられる。

【０１７３】

界面活性剤は特定の配合物に含まれていてもよい。界面活性剤は典型的に、表面へのタンパク質の吸着とその後の気液、固液、液液界面での凝集を防止、最小限、または軽減し、タンパク質の立体構造安定性を制御するために使用される。適切な界面活性剤としては、例えば、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０、ソルビタンエステルの他の脂肪酸エステル、トリトン界面活性剤、レシチン、チロキサポール、及びポロキサマー１８８が挙げられる。

【０１７４】

いくつかの態様では、１つ以上の抗酸化剤が医薬組成物に含まれる。抗酸化賦形剤は、タンパク質の酸化分解を防ぐために使用できる。この点に関しては、還元剤、酸素／フリーラジカル捕捉剤、及びキレート剤が有用な抗酸化剤である。抗酸化物質は典型的に水溶性であり、製品の保存期間を通じてその活性を維持する。ＥＤＴＡも有用な抗酸化物質である。

【０１７５】

特定の製剤には、タンパク質補因子であり、タンパク質配位複合体の形成に必要な金属イオンが含まれている。金属イオンは、タンパク質を分解するいくつかのプロセスを阻害することができる。例えば、マグネシウムイオン（１０～１２０ｍＭ）を使用して、アスパラギン酸のイソアスパラギン酸への異性化を阻害できる。

【０１７６】

張度増強剤も特定の製剤に含めることができる。このような薬剤の例としては、アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトール、及

びソルビトールが挙げられる。

【０１７７】

特定の製剤には１つ以上の防腐剤を含めることができる。防腐剤は、同じ容器から複数回抽出する複数回用量の非経口製剤を開発する場合に必要である。それらの主な機能は、微生物の増殖を抑制し、医薬品の保存期間または使用期間を通じて製品の無菌性を確保することである。適切な防腐剤としては、フェノール、ｍ－クレゾール、ｐ－クレゾール、ｏ－クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、亜硝酸フェニル水銀、フェノキシエタノール、フェニルアルコール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マグネシウム（例えば六水和物）、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、チメロサール、安息香酸、サリチル酸、クロルヘキシジン、または水性希釈剤中のそれらの混合物が挙げられる。

【０１７８】

医薬組成物は、その意図された投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例は、静脈内（ＩＶ）、皮内、吸入、経皮、局所、経粘膜、及び直腸投与である。

【０１７９】

非経口投与（例えば、皮内、皮下、眼内、腹腔内、筋肉内）に適した製剤成分としては、注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒などの無菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；ＥＤＴＡなどのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩などの緩衝液、及び塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張性を調整するための薬剤が挙げられる。

【０１８０】

静脈内投与の場合、適切な担体には、生理食塩水、静菌水、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ　ＥＬ（商標）（ＢＡＳＦ，Ｐａｒｓｉｐｐａｎｙ，Ｎ．Ｊ．）またはリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）が含まれる。担体は製造条件下で安定である必要があり、微生物に対して保存される必要がある。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール）、ならびにそれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒であり得る。

【０１８１】

送達の形態に応じた適切な製剤に関するさらなるガイダンスは、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，２２nd　Ｅｄｉｔｉｏｎ，（Ｌｏｙｄ　Ｖ．Ａｌｌｅｎ，ｅｄ．）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｐｒｅｓｓ（２０１３）に提供される。

【０１８２】

医薬製剤は無菌にすることができる。滅菌状態は、任意の適切な方法、例えば、滅菌濾過膜を通じた濾過によって、達成できる。組成物が凍結乾燥される場合、濾過滅菌は、凍結乾燥及び再構成の前または後に行うことができる。

【０１８３】

実施例７及び８で実証されるように、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣは、比較的高濃度であっても比較的凝集耐性があるようである。したがって、別の態様では、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣのいずれかと水とを含む組成物が本明細書に提供され、活性化可能なＨＢＰＣは少なくとも１ｍｇ／ｍＬの濃度で存在し、組成物は少なくとも９５％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９６％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９７％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９８％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９９％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣを含む。本明細書で使用される場合、「単量体の活性化可能なＨＢＰＣ」という用語は、非凝集形態の活性化可能なＨＢＰＣを指す。これらの態様の特定のものでは、組成物は、少なくとも約２ｍｇ／ｍｌ及び少なくとも９５％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９６％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少

なくとも約９７％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９８％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９９％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣを含む。いくつかの態様では、組成物は、少なくとも約３ｍｇ／ｍｌ及び少なくとも９５％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９６％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９７％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９８％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９９％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣを含む。いくつかの態様では、組成物は、少なくとも約４ｍｇ／ｍｌ及び少なくとも９５％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９６％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９７％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９８％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣ、または少なくとも約９９％の単量体の活性化可能なＨＢＰＣを含む。単量体の活性化可能なＨＢＰＣのパーセンテージは、実施例７に示すように、例えばサイズ排除（ＳＥ）－ＨＰＬＣによって容易に決定することができ、単量体の活性化可能なＨＢＰＣのパーセントは、総ピーク面積に基づいて、単量体の活性化可能なＨＢＰＣに対応するピーク面積のパーセンテージとして決定される。

【実施例】

【０１８４】

この実施例セクションの実施例は、例示として示されており、限定するために示されているものではない。

【０１８５】

実施例１：活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチドの構築及び発現

図１に示す構造を有する、２つの例示的な活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体（ＨＢＰＣ）、複合体－５７及び複合体－６７を調製した。これらの活性化可能なＨＢＰＣ構築物のそれぞれは、図１に示す３つのポリペプチドを有していた。それぞれの場合のｓｃＦｖは抗ＣＤ３εであり、それぞれの場合の第２の標的化ドメイン（すなわち、ＶＨ２及びＶＬ２）はＥＧＦＲを標的とする。それぞれの構築物のＥＧＦＲ標的化ドメインは同じであったが、ＣＤ３ε標的化ドメインは異なっていた。

複合体－６７の構成要素は表５Ａ～５Ｃに列挙され、構築物複合体－５７の構成要素は表６Ａ～６Ｃに列挙される。

表５Ａ．複合体－６７の第１のポリペプチド

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

*対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号１１２（遺伝子に存在していても存在していなくても、精製タンパク質には末端リジンが存在しない）または配列番号１３９である。

$^{++}$Ｎ末端スペーサー、配列番号３３を含む。

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

表５Ｂ．複合体－６７の第２のポリペプチド

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

*対応するポリヌクレオチド配列は配列番号１１３または配列番号１１５である。

$^{++}$Ｎ末端スペーサー、配列番号１１７を含む。

表５Ｃ．複合体－６７の第３のポリペプチド構成要素

名称	第3のポリペプチド
	Fc2
第3のポリペプチド 配列番号32$^{*、++}$	配列番号28

*対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号１１４（遺伝子に存在していても存在していなくても、精製タンパク質には末端リジンが存在しない）または配列番号１４１である。$^{++}$Ｆｃ２のＮ末端に位置するヒンジ（配列番号３５）を含む。

【０１８６】

複合体－６７をコードするアミノ酸配列及びポリヌクレオチド配列を以下に提供する。ポリペプチド配列の構成要素は以下のように示される：スペーサー配列は括弧内にあり、マスク配列は下線が引かれ、リンカーは太字で示され、基質（すなわち、切断可能部分）は斜体で示され、ＣＤ３バインダーは斜体で下線が引かれている。

第１のポリペプチド

[QGQSGS]VSTTCWWDPPCTPNT**GSSGGSGGSGG***LSGRSDDH***GGGS***EVQLVESGGGLVQ*
PGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD
*SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS**GGGGSGGGGSGG***
***GGS**QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPG*
*TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL***GGGGS**QVQLKQ
SGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTS
RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST
YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

（配列番号３０）、任意選択でＣ末端リジンを有する（すなわち、配列番号１３７）。

【０１８７】

いくつかの態様では、第１のポリペプチドは、配列番号１２０のアミノ酸配列（スペーサーは含まないが、Ｃ末端リジンを有する）、またはＣ末端リジンを含まない配列番号１２０のアミノ酸配列を有する。

【０１８８】

以下に示す第２のポリペプチドでは、スペーサー配列は括弧内にあり、マスク配列には下線が引かれ、リンカーは太字であり、基質（すなわち、切断可能部分）は斜体で示されている。

第２のポリペプチド

[QGQSGQG]LSCEGWAMNREQCRA**GGGSSGGS***ISSGLLSGRSDQH***GGGS**QILLTQSPVIL
SVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLS
INSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

（配列番号３１）。

【０１８９】

以下に示す第３のポリペプチドでは、ヒンジ領域が太字で下線が引かれており、配列の残りの部分はＦｃ２である。

第３のポリペプチド

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPP
VLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

（配列番号３２）、任意選択でＣ末端リジンを有する（配列番号３６）。

核酸

第１のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（配列番号１１２）

CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGGG
ACCCTCCATGCACACCTAATACCGGCAGCTCTGGTGGCTC
TGGCGGAAGCGGAGGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCAC
GGCGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCG
GACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCTGTGC
CGCCAGCGGCTTCACCTTCAACAAATACGCCATGAACTGG
GTCCGACAGGCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGCCA
GAATCAGAAGCAAGTACAACAACTATGCCACCTACTACGC
CGACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGAC
AGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAACCTGAAAA
CCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGCGGCACGGCAA
CTTCGGCAACAGCTACATCAGCTACTGGGCCTATTGGGGC
CAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTAGTGGCGGAGGCGGAT
CTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGCGGAGGTTCTCAAACAGT
GGTCACCCAAGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGA
ACCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACAGGCGCCGTGA
CCAGCGGCAACTACCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGG
CCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGCACAAAGTTTCTG
GCTCCCGGAACACCAGCCAGATTCAGCGGTTCTCTGCTCG
GAGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGCGTGCAGCCTGA
GGATGAGGCCGAGTACTATTGCGTGCTGTGGTACAGCAAC
AGATGGGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTTG
GAGGTGGCGGTAGCCAGGTCCAGCTGAAACAATCTGGACC
CGGACTCGTGCAGCCAAGCCAGAGCCTGTCTATCACCTGT
ACCGTGTCCGGCTTCAGCCTGACCAATTACGGCGTGCACT
GGGTTCGACAATCTCCCGGCAAGGGACTCGAATGGCTGGG
AGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGACTACAACACCCCA
TTCACCAGCAGACTGAGCATCAACAAGGACAACAGCAAGT
CCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCCAGGA
TACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGACCTACTATT
GACTACGAGTTTGCCTACTGGGGACAGGGAACCCTCGTGA
CAGTGTCTGCTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTCCC
ACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCGGTGGAACAGCC
GCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCGAGCCAG
TGACCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCTGGCGT
GCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCTGTAC
TCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGG
GCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAG
CAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGC
GATAAGACACACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGC
TGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAGCC
TAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACC
TGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGA
AGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGGAAGTGCACAATGC
CAAGACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACGGCAGCACCTAC
AGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGC
TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC

CCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAG
GGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAA
GCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTG
CCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAA
TGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACAA
CCCCTCCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTA
CAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGC
AACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA
ACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCAA
A

【０１９０】

この例示的なポリヌクレオチドのバリエーションでは、Ｃ末端リシンをコードするコドンが存在しない場合がある（すなわち、配列番号１３９）。

第２のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（配列番号１１３）

CAAGGCCAGTCTGGCCAAGGTCTTAGTTGTGAAGGTTGGG
CGATGAATAGAGAACAATGTCGAGCCGGAGGTGGCTCGAG
CGGCGGCTCTATCTCTTCCGGACTGCTGTCCGGCAGATCC
GACCAGCACGGCGGAGGATCCCAAATCCTGCTGACACAGT
CTCCTGTCATACTGAGTGTCTCCCCCGGCGAGAGAGTCTC
TTTCTCATGTCGGGCCAGTCAGTCTATTGGGACTAACATA
CACTGGTACCAGCAACGCACCAACGGAAGCCCGCGCCTGC
TGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAG
CCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTG
AGCATTAACAGCGTGGAAAGCGAAGATATTGCGGATTATT
ATTGCCAGCAGAACAACAACTGGCCGACCACCTTTGGCGC
GGGCACCAAACTGGAACTGAAACGTACGGTGGCTGCACCA
TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA
TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC
CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGG
ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGAC
GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC
TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA
AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

【０１９１】

複合体－６７の第２のポリペプチドもまた、配列番号１１５の配列を有するポリヌクレオチドによってコードされる。

第３のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（配列番号１１４）

GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAAC
TGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCC
TAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACC
TGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGA
AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC
CAAGACAAAGCCCTGCGAGGAACAGTACGGCAGCACCTAC
AGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGC
TGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC
CCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAG
GGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCCAA
GCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTG
CCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAA

ＴＧＧＧＡＧＡＧＣＡＡＴＧＧＡＣＡＧＣＣＣＧＡＧＡＡＣＡＡＣＴＡＣＧＡＣＡＣＣＡ
ＣＡＣＣＴＣＣＡＧＴＧＣＴＧＧＡＣＡＧＣＧＡＣＧＧＣＴＣＡＴＴＣＴＴＣＣＴＧＴＡ
ＣＡＧＣＧＡＣＣＴＧＡＣＣＧＴＧＧＡＣＡＡＧＡＧＣＡＧＡＴＧＧＣＡＧＣＡＧＧＧＣ
ＡＡＣＧＴＧＴＴＣＡＧＣＴＧＣＡＧＣＧＴＧＡＴＧＣＡＣＧＡＧＧＣＣＣＴＧＣＡＣＡ
ＡＣＣＡＣＴＡＣＡＣＣＣＡＧＡＡＧＴＣＣＣＴＧＡＧＣＣＴＧＴＣＴＣＣＴＧＧＣＡＡ
Ａ

【０１９２】

この例示的なポリヌクレオチドのバリエーションでは、Ｃ末端リシンをコードするコドンが存在しない場合がある（すなわち、配列番号１４１）。

【０１９３】

本開示のさらなる例示的な活性化可能なＨＢＰＣは、本明細書に記載され、配列番号３８のアミノ酸配列を有する第１のポリペプチド（配列番号１４２（遺伝子に存在していても存在していなくても、精製タンパク質には末端リジンが存在しない）または配列番号１４３のポリヌクレオチド配列によってコードされる）；配列番号３１のアミノ酸配列を有する第２のポリペプチド（配列番号１１３または配列番号１１５のポリヌクレオチド配列によってコードされる）；配列番号３２のアミノ酸配列を有する第３のポリペプチド（配列番号１１４（遺伝子に存在していても存在していなくても、精製タンパク質には末端リジンが存在しない）または配列番号１４１のポリヌクレオチド配列によってコードされる）を含む。

表６Ａ．複合体－５７の第１のポリペプチド

名称	第１のポリペプチド				
	MM1	CM1	scFv	VH2	Fc1$^{\Delta}$
第１のポリペプチド 配列番号38$^{*、++}$	H20GG 配列番号72	0011 配列番号73	v16 配列番号122	C225v5 配列番号21	配列番号23

*対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号１６０（遺伝子に存在していても存在していなくても、精製タンパク質には末端リジンが存在しない）または配列番号１４２である。

$^{++}$Ｎ末端スペーサー（配列番号１１７）を含む。

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

表６Ｂ．複合体－５７の第２のポリペプチド

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

*対応するポリヌクレオチド配列は配列番号１１３または配列番号１１５である。

$^{++}$Ｎ末端スペーサー、配列番号１１７を含む。

表６Ｃ．複合体－５７の第３のポリペプチド

名称	第３のポリペプチド
	Fc2
第３のポリペプチド 配列番号32$^{*、++}$	配列番号28

*対応するポリヌクレオチド配列は、配列番号１１４（遺伝子に存在するかにかかわらず、精製タンパク質には末端リジンが存在しない）または配列番号１４１である。

$^{++}$Ｆｃ２のＮ末端に位置するヒンジ（配列番号３５）を含む。

【０１９４】

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

本明細書では「ＣＩ１０６」と称する、対照の活性化可能な二重特異性抗体構築物を、国際特許出願公開第ＷＯ２０１９／０７５４０５号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように調製した。ＣＩ１０６は、２つの同一の重鎖（２つの第１のポリペプチド）及び同一の軽鎖（２つの第２のポリペプチド）に対応する４つのポリペプチドで構成される活性化可能なデュアルアーム二価二重特異性抗体構築物であり、それぞれの重鎖と軽鎖は二重特異性抗体構築物のアームを形成する。二重特異性抗体は、それぞれのタイプの結合ドメインを２つ（すなわち、２つのＥＧＦＲ結合ドメイン及び２つのＣＤ３結合ドメイン）有するという点で「二価」である。軽鎖のアミノ酸配列は、複合体－６７及び複合体－５７の第２のポリペプチドのアミノ酸配列と同一である。ＣＩ１０６の重鎖と複合体－６７の第１のポリペプチドは、同一のスペーサー、切断可能部分、抗ＥＧＦＲ　ＶＨ、及び切断可能部分の構成要素を有する。ＣＩ１０６の重鎖と複合体－５７の第１のポリペプチドは、同一のスペーサー、抗ＣＤ３　ＭＭ／ＭＭ１、切断可能部分、抗ＣＤ３ＶＬ／ＶＨ（及び同一の抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ）、ならびに抗ＥＧＦＲ　ＶＨの構成要

素を有する。ＣＩ１０６では、４つの標的化ドメインすべて（２つの抗ＣＤ３結合ドメインと２つの抗ＥＧＦＲ結合ドメイン）がマスクされていた。ＣＩ１０６の構成要素を表７Ａ～７Ｂに示す。

表７Ａ．ＣＩ１０６重鎖構成要素

名称	重鎖				
	抗 CD3 マスキング部分	切断可能な部分	抗 CD3 scFv	抗 EGFR 可変重鎖ドメイン	Fc^{Δ}
CI106 配列番号 123[*、++]	H20GG 配列番号 72	0011 配列番号 73	v16 配列番号 122	C225v5 配列番号 21	配列番号 124

*対応するポリヌクレオチド配列は配列番号１２５である（タンパク質は発現／精製中に末端リジンを失っているようである）。

++Ｎ末端スペーサー（配列番号１１６）を含む。

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

表７Ｂ．ＣＩ１０６軽鎖構成要素

名称			軽鎖	
	抗 EGFR マスキング部分	CM	抗 EGFR VL2	定常軽鎖
CI106 LC 配列番号 31[*、++]	CF41 配列番号 13	2008 配列番号 14	C225v5 配列番号 22	CL 配列番号 25

*対応するポリヌクレオチド配列は配列番号１１３または配列番号１１５である。

＋＋Ｎ末端スペーサー、配列番号１１７を含む。

【０１９５】

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

記載された抗ＥＧＦＲ及び抗ＣＤ３マスキングペプチドが、活性化可能なヘテロ多量体二重特異性ポリペプチド複合体のＥＧＦＲ及びＣＤ３への結合を阻害できることを確認するために、フローサイトメトリーに基づく結合アッセイを実施した。

【０１９６】

ＨＴ－２９－ｌｕｃ２（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ（正式にはＣａｌｉｐｅｒ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．）及びＪｕｒｋａｔ（クローンＥ６－１、ＡＴＣＣ、ＴＩＢ－１５２）細胞を、１０％熱不活化ウシ胎仔血清（ＨＩ－ＦＢＳ、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ１０４３８－０２６）を補充したＲＰＭＩ－１６４０＋ｇｌｕｔａｍａｘ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ７２４００－０４７）で培養した。「活性化」分子は、タンパク質分解的に切断されて活性化型を生成する活性化可能なＨＢＰＣとして生成された。実験前にその後タンパク質分解的切断を受けなかった活性化可能なＨＢＰＣも生成された。以下のポリペプチド複合体を試験した：活性化ＣＩ１０６（二価のダブルアーム二重特異性構築物）、活性化複合体－５７（ＨＢＰＣ）、及び活性化－複合体－６７（ＨＢＰＣ）、及び活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣ複合体－５７、（マスクされた）ＨＢＰＣ複合体－６７、及び二重マスクされた二価のダブルアーム二重特異性構築物ＣＩ１０６。実施例１に記載したように、ＣＤ３バインダー（抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ　ｖ１６）とマスク（ＭＭ　Ｈ２

０ＧＧ）の１つの組み合わせをＣＩ１０６及び複合体－５７で利用し、ＣＤ３バインダー（抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ　Ｉ２Ｃ）とマスク（ＭＬ１５）の異なる組み合わせを複合体－６７で利用した。

【０１９７】

ＨＴ２９－ｌｕｃ２　細胞をＶｅｒｓｅｎｅ（商標）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ１５０４０－０６６）で剥がし、洗浄し、９６ウェルプレートに約１５０，０００細胞／ウェルで播種し、５０μＬの活性化または活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣに再懸濁した。Ｊｕｒｋａｔ細胞をカウントし、ＨＴ２９－ｌｕｃ２細胞について記載したように播種した。活性化された（マスクされていない）ＨＢＰＣまたは活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣの滴定は、図２Ａ及び２Ｂに示される濃度で開始し、ＦＡＣＳ染色緩衝液＋２％ＦＢＳ（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、カタログ５５４６５６）中で３倍段階希釈した。細胞を振盪しながら４℃で約１時間インキュベートし、回収し、ＦＡＣＳ染色緩衝液で２×２００μＬで洗浄した。細胞を５０μＬのＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８コンジュゲート抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ（１０μｇ／ｍｌ、Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）に再懸濁し、振盪しながら４℃で約１時間インキュベートした。細胞を回収し、洗浄し、２．５μｇ／ｍＬの７－ＡＡＤ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、カタログ５５９９２５）を含むＦＡＣＳ染色緩衝液の最終容量２００μＬに再懸濁した。二次抗体のみで染色した細胞を陰性対照として使用した。データはＡｔｔｕｎｅ　ＮｘＴフローサイトメーターで取得し、生細胞の蛍光強度中央値（ＭＦＩ）はＦｌｏｗＪｏ（登録商標）Ｖ１０（Ｔｒｅｅｓｔａｒ）を使用して計算した。バックグラウンドを差し引いたＭＦＩデータを、カーブフィット分析を使用してＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍでグラフ化した。

【０１９８】

図２Ａ～２Ｂに示すように、活性化可能なＨＢＰＣ、複合体－５７及び複合体－６７、ならびにＣＩ１０６（マスクされた）は、活性化された（マスクされていない）複合体－５７、活性化された（マスクされていない）複合体－６７、及び活性化された（マスクされていない）ＣＩ１０６と比較して、ＥＧＦＲ及びＣＤ３標的の両方に対する結合の減少を示した。結合の減少は、結合曲線の右方向へのシフトによって表される。この細胞結合実験におけるＥＧＦＲマスキング効率は、複合体－５７では１０５、複合体－６７では３３８、ＣＩ１０６では５９４であった。

【０１９９】

実施例３．活性化可能なＨＢＰＣ及び活性化ＨＢＰＣの生物活性

細胞傷害性アッセイを使用して、活性化可能な（マスクされた）及び活性化された（マスクされていない）ＨＢＰＣの生物学的活性をアッセイした。ヒトＰＢＭＣはＳｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｖａｎｃｏｕｖｅｒ，Ｃａｎａｄａ）から購入し、５％の熱不活化ヒト血清（Ｓｉｇｍａ、カタログＨ３６６７）を補充したＲＰＭＩ－１６４０＋ｇｌｕｔａｍａｘ中で、５：１のＥ（ＣＤ３＋）：Ｔ比で、ＥＧＦＲ発現がん細胞株ＨＴ２９－ｌｕｃ２（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ（正式にはＣａｌｉｐｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ））と共培養された。活性化（マスクされていない）ＣＩ１０６（対照）、活性化（マスクされていない）複合体－５７（ＨＢＰＣ）、活性化（マスクされていない）複合体－６７（ＨＢＰＣ）、及びＣＩ１０６（対照）、複合体－５７（活性化可能なＨＢＰＣ）及び複合体－６７（活性化可能なＨＢＰＣ）の滴定を試験した。４８時間後、ＯＮＥ－Ｇｌｏ（商標）ルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩカタログＥ６１３０）を使用して細胞傷害性を評価した。発光は、Ｉｎｆｉｎｉｔｅ（登録商標）Ｍ２００　Ｐｒｏ（Ｔｅｃａｎ　Ｔｒａｄｉｎｇ　ＡＧ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）で測定した。細胞傷害性のパーセントを計算し、カーブフィット分析を使用してＧｒａｐｈＰａｄ　ＰＲＩＳＭでプロットした。活性化された分子の効力は、ＥＣ５０比を計算することによって比較された。マスキング効率は、それぞれの分子のインタクトと活性化されたものとのＥＣ５０の比として計算された。

【０２００】
図３Ａ及び３Ｂに示すように、活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣは、活性化された（マスクされていない）ＨＢＰＣと比較してシフトした用量反応曲線を有する。
【０２０１】
このアッセイでは、図３Ａのデータは、ＣＩ１０６については２９，６５０のマスキング効率、複合体－５７については１，０３４のマスキング効率を示している。図３Ｂのデータは、ＣＩ１０６については２６，５３７のマスキング効率、複合体－６７については７，１４１のマスキング効率を示している。このアッセイを用いた複数の実験に基づくと、複合体－５７は一般に、複合体－６７と比較して１０～４２倍低下した効力を示した。
【０２０２】
実施例４．ＨＢＰＣは、マウスにおける確立されたＨＴ２９腫瘍の退縮を誘導した
この実施例では、活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣ複合体－６７及び対照ＣＩ１０６を、ヒトＰＢＭＣ移植ＮＳＧマウスにおいて確立されたＨＴ２９異種移植片腫瘍の退行を誘導するまたは増殖を減少させる能力について分析した。
【０２０３】
ヒト結腸癌細胞株ＨＴ２９－ｌｕｃ２（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を確立された手順に従って培養した。精製され、凍結されたヒトＰＢＭＣは、Ｈｅｍａｃａｒｅ，Ｉｎｃ．（Ｖａｎ　Ｎｕｙｓ，ＣＡ）から入手した。ＮＳＧ（ＮＯＤ．Ｃｇ－Ｐｒｋｄｃｓｃｉｄ　Ｉｌ２ｒｇ^{ｔｍ１Ｗｊｌ}／ＳｚＪ）マウスは、ＴｈｅＪａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｂａｒ　Ｈａｒｂｏｒ，ＭＥ）から入手した。
【０２０４】
０日目に、１００μＬのＲＰＭＩ＋Ｇｌｕｔａｍａｘ無血清培地中の２×１０^{6}個のＨＴ２９－ｌｕｃ２細胞をそれぞれのマウスの右脇腹に皮下接種した。単一のドナーからの事前に凍結したＰＢＭＣを、１：１のＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞対腫瘍細胞の比で３日目に（腹腔内）投与した。腫瘍体積が１５０～２００ｍｍ^{3}に達したとき（約１２日目）、マウスを無作為に処置群に割り当て、表８に従って静脈内投与した。腫瘍体積と体重を週に２回測定した。複合体－６７の用量レベルは、ＣＩ１０６と複合体－６７の間の分子量の違いを考慮して調整された。

表８．ＨＴ２９－ｌｕｃ２異種移植研究の群と用量

群	数	処置	用量(mg/kg)
1	8	ビヒクル	N/A
2	8	CI106 二重マスクされた二価ダブルアーム二重特異性構築物	1.0
3	8	複合体-67 活性化可能な(マスクされた)HBPC	0.2
4	8	複合体-67 活性化可能な(マスクされた)HBPC	0.6
5	8	複合体-67 活性化可能な(マスクされた)HBPC	1.8

【０２０５】
腫瘍体積対初回処置投与（０日目）の後の日数のプロットを示す図４に示すように、ＨＴ２９－ｌｕｃ２異種移植片腫瘍の増殖に対する複合体－６７の用量依存的な効果がある

。複合体－６７は、同等の用量（１ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０６及び０．６ｍｇ／ｋｇの複合体－６７）で対照であるＣＩ１０６よりも強力な抗腫瘍活性を示した（ｐ＝０．００９９、Ｄｕｎｎｅｔｔを使用したＲＭＡＮＯＶＡ）。

【０２０６】

実施例５．活性化可能なＨＢＰＣによる処置後のマウスにおける確立されたＨＣＴ１１６腫瘍の腫瘍退縮

活性化された（マスクされていない）ＨＢＰＣ　ａｃｔ－複合体－６７及び活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣ複合体－６７を、ヒトＴ細胞移植ＮＳＧマウスにおいて確立されたＨＣＴ１１６異種移植片腫瘍の退行を誘導するまたは増殖を減少させる能力について分析した。ヒト結腸癌細胞株ＨＣＴ１１６（ＡＴＣＣ）を、確立された手順に従ってＲＰＭＩ＋Ｇｌｕｔａｍａｘ＋１０％ＦＢＳ中で培養した。腫瘍モデルは実施例４に記載されているように実施した。マウスには表９に従って投与した。

表９．ＨＣＴ１１６異種移植片研究の群と用量

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

【０２０７】

腫瘍体積対初回処置投与（研究０日目）後の日数のプロットを示す図５に示すように、試験したすべての用量で両方の分子について腫瘍退縮が実証された。

【０２０８】

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

二重マスクされたＣＩ１０６対照と活性化可能な（マスクされた）ＨＢＰＣ複合体－６７をセラミックヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーカラムを使用して精製し、精製中の高濃度での二量体化の量を比較した。これは、精製プロセスのそれぞれのステップでの単量体のパーセンテージを分析することによって評価された。

【０２０９】

試料を、２０ｇ／Ｌ樹脂をロードしたＣＨＴ　Ｔｙｐｅ　Ｉ、４０μｍビーズカラム（Ｂｉｏｒａｄカタログ：１５７－００４０及び＃１５７－００４１）にロードした。カラムを平衡緩衝液として１０ｍＭのＮａＰＯ４、１００ｍＭのヒスチジン緩衝液ｐＨ６．５で洗浄し、次いでＣＩ１０６の場合は１０ｍＭのＮａＰＯ４、１００ｍＭのヒスチジン、２００ｍＭのリジン－ＨＣｌ緩衝液ｐＨ６．５で、複合体－６７の場合は、１０ｍＭのＮａＰＯ４、１００ｍＭのヒスチジン、１００ｍＭのリジン－ＨＣｌ緩衝液ｐＨ６．５で、２ｍＬの画分に溶出した。ＣＩ１０６を２ｍＬの画分に集め、次いで５つの画分をプールして溶出液を形成した。ＣＩ１０６では、ピーク収集は約２５ｍＡＵで開始され、約３００ｍＡＵで停止した。複合体－６７を１つのチューブに収集し、ピーク収集は１００ｍＡＵで開始し、５００ｍＡＵで終了した。この後に、ｐＨ７．０で５００ｍＭのＮａＰＯ４のストリップ緩衝液ステップが続いた。それぞれの画分のタンパク質濃度は、波長２８０ｎｍでのＵＶ吸収によって定量された。それぞれの画分中の単量体パーセントは、全ピー

ク面積に基づいてＳＥ－ＨＰＬＣ（分析スケールサイズ排除クロマトグラフィー）によって決定された。

【０２１０】

クロマトグラフィーの結合段階では、タンパク質は最初にカラムの上部に結合し、上部がいっぱいになってからカラムを下に移動する。これにより、分子がカラム上で高濃度になる。ＣＩ１０６及び複合体－６７の多量体は単量体よりも強い親和性でカラムに結合するため、カラムから完全に除去するには強力な緩衝液が必要である。したがって、カラムを弱い緩衝液で溶出し、次いで、より強い緩衝液でストリッピングすると、溶出液のダイマーのパーセンテージはストリップよりも低くなる（単量体のパーセンテージが高くなる）。表１０に示すように、複合体－６７（活性化可能なＨＢＰＣ）の実行により、溶出液中のモノマーのパーセントが７．６％増加し、ストリップステップまでカラム上に高分子量物質が残り、これは溶出液中で７７％の回収率をもたらした。これと比較して、ＣＩ１０６の実行は、ストリップまでより多くの二量体物質（３０．６％のみが単量体）がカラム上に留まったにもかかわらず、溶出液中の単量体のパーセントが５．４％減少して６５．０％となり、結果として溶出液中の回収率は８１％となった。

表１０．ＣＨＴクロマトグラフィーの結果

分子	ロード中のモノマー%	溶出液中のモノマー%	溶出液中の回収%	ストリップ中のモノマー%	ストリップ中の回収%
複合体-67	90.9	98.5	77	データなし	データなし
CI106	70.4	65.0	81	30.6	9

【０２１１】

これらの結果は、複合体－６７がカラム上で高濃度にあるときにさらなる二量体化を受けず、その結果、溶出液中でほぼすべての高分子種が除去されるのに対し（９８．５％の単量体）、ＣＩ１０６の場合はわずか６５％であることを示唆している。ＣＩ１０６の場合、溶出液プールには元のロードよりも多くの高分子種が存在する。しかしながら、ＣＩ１０６は、ＣＩ１０６がカラム上で高濃度にさらされると二量体化が起こるため、このクロマトグラフィー法、または任意の評価された結合／溶出クロマトグラフィー法では精製できなかった。

【０２１２】

複合体－６７の改善された挙動により、ＣＨＴタイプ１クロマトグラフィーによる高モノマー複合体－６７の精製が可能になる。

【０２１３】

実施例７：遠心濃縮機での濃縮による濃度依存性二量体化の評価

複合体－６７（活性化可能なＨＢＰＣ）、複合体－５７（活性化可能なＨＢＰＣ）、及びＣＩ１０６対照の、プロテインＡ精製調製物とＳＥＣ精製調製物を、遠心濃縮及び最も高い濃度で一晩インキュベートした後の単量体パーセントについて比較した。

【０２１４】

複合体－６７、複合体－５７、及びＣＩ１０６をプロテインＡ及びＳＥＣで精製し、次いで低ｐＨ緩衝液（１０ｍＭの酢酸塩、１００ｍＭのリジン、ｐＨ６）中で調製した。試料をＰＢＳ（７５３－４５－０１）で１：１５に希釈し、Ｐｉｅｒｃｅ（商標）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｏｒｓ ＰＥＳ １０Ｋ ＭＷＣＯ ０．５ｍｌ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒカタログ番号８８５１３）を使用して、それぞれの濃度で１４，０００ＲＰＭで２分間遠心分離することにより濃縮した。最も高い濃度の試料を一晩保管し、単量体パーセントを評価した。得られた濃度と単量体量のパーセントを表１１と図６に示す。

表１１．単量体の活性化可能なＨＢＰＣのパーセント対総タンパク質濃度

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

【０２１５】

図６及び表１１は、濃度が上昇しても、複合体－６７が高い単量体％（９８％～９９％）で維持され、溶液中での凝集が非常に低いことを示している。これは、濃度が増加するにつれて顕著な濃度依存性の二量体化を示すＣＩ１０６と対照的である。複合体－５７は濃度依存性の二量体化をほとんど示さず、濃度が増加しても安定した単量体パーセンテージを維持した。複合体－６７はまた、最も高い濃度での一晩のインキュベーション中に単量体パーセンテージを維持し、より高濃度での単量体パーセンテージの安定性を実証した。

【０２１６】

実施例８：代替類似構造の比較

１つのセットではＣＤ３と腫瘍関連抗原である抗原Ａを標的とし、別のセットではＣＤ３と腫瘍関連抗原である抗原Ｂを標的とする活性化可能な二重特異性構築物のセットを調製した。抗原Ａも抗原ＢもＥＧＦＲではなかった。それぞれのセットは、本開示の活性化可能なＨＢＰＣと、互いに異なるだけでなく、本開示の活性化可能なＨＢＰＣの構造とも異なる代替（フォーマット）１及び代替（フォーマット）２と呼ばれる構造配置にある、活性化可能なＨＢＰＣと同じ構成要素（すなわち、同じ抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ、同じ抗腫瘍関連抗原ＶＨ及びＶＬ配列、同じ抗ＣＤ３マスキング部分、ならびに同じ抗腫瘍関連抗原マスキング部分）を有する他の活性化可能な二重マスクされた一価二重特異性構築物とを含んでいた。それぞれのセットのそれぞれの構築物の特性は、実施例９及び１０に記載されているように特徴付けられた。

【０２１７】

実施例９：二重マスクされた一価、二重特異性フォーマットの比較

実施例８に記載の抗ＣＤ３、抗抗原Ａ二重特異性構築物（すなわち、本開示の活性化可能なＨＢＰＣのフォーマット、代替（フォーマット）１、及び代替（フォーマット）２）の生物学的活性及びマスキング効率は、細胞傷害性アッセイを使用して決定された。Ｏｖｃａｒ－８細胞をヒトＴ細胞と１：１０の比率で共培養し、表１２、１３、及び１４の分子の希釈系列で処理した。４８時間後、製造業者の使用説明書に従ってＣｅｌｌ　Ｔｉｔｅｒ　Ｇｌｏ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して細胞傷害性を評価した。マスキング効率は、それぞれの分子のインタクトと活性化されたものとのＥＣ$_{50}$の比として計算された。抗ＣＤ３　ｓｃＦｖ、抗ＣＤ３マスキング部分、抗腫瘍関連抗原ＶＨ及びＶＬ、抗腫瘍関連抗原マスキング部分、及び２つの切断可能部分のアミノ酸配列は、３つの異なるフォーマット（すなわち、本開示の活性化可能なＨＢＰＣ、代替（フォーマット）１、及び代替（フォーマット）２）間で同じであった。活性化可能なＨＢＰＣ、代替１、及び代替２分子、ならびに対応するマスクされていない対照分子のマスキング効率を表１２（抗抗原Ａマスキング部分ＭＬ２１及び抗ＣＤ３マスキング部分ＭＬ１５）、表１３（抗抗原Ａマスキング部分ＭＬ２４及び抗ＣＤ３マスキング部分ＭＬ１５）、ならびに表１４（抗抗原Ａマスキング部分ＭＬ３４及び抗ＣＤ３マスキング部分ＭＬ１５）に示す。以下に示すように、活性化可能なＨＢＰＣは、それぞれの場合で最も高いマスキング効率を示した。構成要

素はそれぞれのフォーマットタイプで同じであるため、結果は、活性化可能なＨＢＰＣのマスキング効率の向上は、代替（フォーマット）１及び代替（フォーマット）２と比較した活性化可能なＨＢＰＣフォーマットにおける構成要素の特定の配置によるものであることを示唆している。

表１２．フォーマット別のマスキング効率－マスクＭＬ２１及びＭＬ１５－抗原Ａ

フォーマット	分子	抗抗原 A マスク	抗 CD3 マスク	マスキング効率
代替 1 及び 2 の対照	複合体-165	マスクされていない	マスクされていない	1
代替 2	複合体-211	ML21	ML15	69
代替 2	複合体-271	ML21	ML15	68
代替 2	複合体-272	ML21	ML15	97
代替 2	複合体-273	ML21	ML15	119
代替 1	複合体-349	ML21	ML15	339
代替 1	複合体-350	ML21	ML15	237
代替 1	複合体-351	ML21	ML15	492
代替 1	複合体-352	ML21	ML15	391
代替 1	複合体-338	ML21	ML15	110
活性化可能な HBPC 対照	複合体-355	マスクされていない	マスクされていない	1
活性化可能な HBPC	複合体-353	ML21	ML15	1316

表１３．フォーマット別のマスキング効率－マスクＭＬ２４及びＭＬ１５－抗原Ａ

フォーマット	分子	抗抗原 A マスク	抗 CD3 マスク	マスキング効率
代替 1 及び 2 の対照	複合体-165	マスクされていない	マスクされていない	1
代替 2	複合体-275	ML24	ML15	112
活性化可能な HBPC 対照	複合体-355	マスクされていない	マスクされていない	1
活性化可能な HBPC	複合体-429	ML24	ML15	8274
活性化可能な HBPC	複合体-430	ML24	ML15	6460
活性化可能な HBPC	複合体-432	ML24	ML15	7754

表１４．フォーマット別のマスキング効率－マスクＭＬ３４及びＭＬ１５－抗原Ａ

フォーマット	分子	抗抗原 A マスク	抗 CD3 マスク	マスキング効率
代替 2	複合体-419	ML34	ML15	n/a
代替 1	複合体-426	ML34	ML15	248
活性化可能な HBPC 対照	複合体-355	マスクされていない	マスクされていない	1
活性化可能な HBPC	複合体-354	ML34	ML15	2491

【０２１８】

表１３では、活性化可能なＨＢＰＣは、代替２と比較してマスキング効率が１５倍増加し、代替１と比較してマスキング効率が２～４倍増加したことを示した。表１３では、ＨＢＰＣは６４６０～８２７４のマスキング効率を示したが、代替２のＭＥは１１２であった。表１３では、活性化可能なＨＢＰＣは、代替２と比較してマスキング効率が６８倍増加し、代替１と比較してマスキング効率が１０倍増加したことを示した。表１４では、ＨＢＰＣのマスキング効率は２４９１であったが、代替１と代替のＭＥは２４８であった。表１５において、複合体－４６３を代替１及び代替２で調製し、代替１における複合体－４６３の２つのアッセイを実施した。ＨＢＰＣは１５００～２１００ＭＥの範囲のマスキング効率を示し、ＨＢＰＣでは代替１と比べてＭＥが約６～１０倍、代替２と比べて約４７倍増加した。

【０２１９】

これらの結果は、マスキング効率の改善が、本開示の活性化可能なＨＢＰＣの特定の構造配置によるものであると思われることを示唆している。

【０２２０】

実施例１０：ＣＨＯ細胞株における活性化可能なＨＢＰＣ及び代替二重特異性分子の細胞傷害性

マスキング効率と細胞傷害性を、それぞれＣＤ３と抗原Ｂを標的とする活性化可能なＨＢＰＣ、代替１、及び代替２分子について決定した。抗原Ｂを発現するＣＨＯ細胞を、１：１０の比でヒトＰＢＭＣと共培養し、表１５の分子の希釈系列で処理した。４８時間のインキュベーション後、製造業者の使用説明書に従ってＣｙｔｏｔｏｘ　Ｇｌｏ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して細胞傷害性を決定した。マスキング効率は、それぞれの分子のインタクトと活性化されたものとのＥＣ$_{50}$の比として計算された。結果を表１５に示す。

表１５．マスキング効率と細胞傷害性－抗原Ｂ

フォーマット	分子	抗抗原Ｂマスク	抗CD3マスク	EC_{50}	マスキング効率
代替1及び2の対照*	複合体-164	N/A	N/A	1.48～4.0	n.a.
代替1**	複合体-463	PC7	ML15	6167～7366	1542～2188
代替2	複合体-231	PC7	ML15	473	319
活性化可能なHBPC対照	複合体-342	N/A	N/A	3.1	n.a.
活性化可能なHBPC	対照-39	PC7	ML15	$>10e^5$	>15,000倍

*、**、+複数の実験

【０２２１】

活性化可能なＨＢＰＣが最良の結果をもたらした。図７は、マスクされた活性化可能なＨＢＰＣ（複合体－３９）、マスクされていない活性化可能なＨＢＰＣ対照（複合体－３４２）、代替（フォーマット）２の活性化可能なポリペプチド（複合体－２３１）、及びマスクされていない代替（フォーマット）２対照（複合体－１６４）の細胞溶解のパーセンテージとして細傷害性を示す。

【０２２２】

この結果は、本明細書に記載の活性化可能なＨＢＰＣの特定の構造における構成要素の配置が、代替フォーマットで配置された同じ構成要素を有する活性化可能な一価の二重特異性構築物のマスキング効率と比較して、より高いマスキング効率と相関しているようであることを示唆している。

【０２２３】

活性化可能な抗ＣＤ３、抗抗原ＡのＨＢＰＣ及び活性化可能な抗ＣＤ３、抗抗原ＢのＨＢＰＣで観察されたマスキング効率の程度は、複合体－６７及び複合体－５７で観察されたものと一致している。これらの有益な結果は、使用した特定の標的ドメイン／アミノ酸配列とは無関係であると思われる。

【０２２４】

実施例１１：活性化可能な抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３　ＴＣＢ構築物ＣＩ１０７の安全性と有効性

この研究では、ＣＩ１０６対照（上記）と同じ構造フォーマットを有する抗ＥＧＦＲ、抗ＣＤ３のＴＣＢ構築物であるＣＩ１０７の安全性と有効性を前臨床モデルで評価し、ＥＧＦＲ発現腫瘍の治療の治療可能性を評価した。ＣＩ１０７を、国際特許出願公開第ＷＯ２０１９／０７５４０５号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように調製した。ＣＩ１０７　ＴＣＢ構築物は、この実施例では「Ｔ細胞結合二重特異性抗体」または「ＴＣＢ」とも呼ばれる。

【０２２５】

方法

動物研究

すべての動物研究は、それぞれの研究を実施した施設を管理する施設内動物管理使用委員会の規制に従って実施された。マウス異種移植片の研究はＣｙｔｏｍＸ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ（ＣｙｔｏｍＸ）によって行われ、カニクイザルの研究はＡｌｔａｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｅｖｅｒｅｔｔ，ＷＡ）によって行われた。すべての動物実験は、ＵＳＤＡ動物福祉法及び実験動物の管理と使用に関するガイドに定められた規制に従って行われた。

【０２２６】
材料
ＣＩ１０７、ＣＩ１２８、ＣＩ０２０、ＣＩ０１１、ＣＩ０４０、ＣＩ０４８、及びＣＩ１０４を含む、この研究に記載されているすべてのＴＣＢ及びその他のコンストラクトは、ＣｙｔｏｍＸ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｉｎｃ．によって生成された（ＷＯ２０１６／０１４９７４及びＷＯ２０１９／０７５４０５を参照されたい）。ＣＩ１０７、ＣＩ１２８、ＣＩ０２０、ＣＩ０１１、ＣＩ０４０、及びＣＩ１０４は、ＣＩ１０６と同じ構造形式を有する。ＣＩ０４８は活性化されたＣＩ０１１に対応する。活性化されたＴＣＢは、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（ｕＰＡ）によるインビトロ処理とそれに続くＳＥＣ精製によって生成された（Ｄｅｓｎｏｙｅｒｓ ２０１３）。ＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞は、Ｃａｌｉｐｅｒ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｈｏｐｋｉｎｔｏｎ，ＭＡ）から入手し、ＨＣＴ１１６及びＪｕｒｋａｔ細胞は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から入手した。ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）は、ＨｅｍａＣａｒｅ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｎｏｒｔｈｒｉｄｇｅ，ＣＡ）、ＡｌｌＣｅｌｌｓ（Ａｌａｍｅｄａ，ＣＡ）、またはＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）から個々のドナーからの細胞の凍結保存バイアルとして入手した。ＮＯＤ．Ｃｇ－Ｐｒｋｃｄｓｃｉｄ Ｉｌ２ｒｇ ｔｍ１Ｗｊｌ／ＳｚＪ（ＮＳＧ）マウスは、Ｊａｃｋｓｏｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｓａｃｒａｍｅｎｔｏ，ＣＡ）から入手した。

【０２２７】
細胞結合アッセイ
ＨＴ２９細胞とＪｕｒｋａｔ細胞は完全培地で維持された。ＨＴ２９細胞は、Ｖｅｒｓｅｎｅ（商標）細胞解離緩衝液を使用して収集された。細胞を２５０×ｇで５～１０分間遠心分離し、２％ＦＢＳを含むＦＡＣＳ緩衝液（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｏｇｅｎ）に再懸濁した。細胞をＶ底９６ウェルプレートに１５０，０００／ウェルで播種し、ＦＡＣＳ緩衝液での３倍段階希釈によって得られたさまざまな濃度（ＨＴ２９とＪｕｒｋａｔ細胞の両方に対して１．５μＭのＣＩ１０７で開始、ＨＴ２９細胞に対して０．０５μＭの活性化ＣＩ１０４で開始、Ｊｕｒｋａｔ細胞に対して０．５μＭの活性化ＣＩ１０４で開始）の複合体－０７またはインビトロプロテアーゼ活性化ＣＩ１０４で処理した。細胞を４℃で１時間インキュベートし、ＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、１０μｇ／ｍｌのＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７抗ヒトＦｃ二次抗体に再懸濁した。次いで細胞を遮光して４℃で３０～６０分間インキュベートし、ＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、７－ＡＡＤを含むＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＭＡＣＳＱｕａｎｔフローサイトメーター（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ）で分析した。平均蛍光強度データを二次抗体バックグラウンドシグナルに対して補正し、Ｇｒａｐｈｐａｄ Ｐｒｉｓｍでグラフ化し、ＥＣ５０値を計算した。

【０２２８】
細胞傷害性アッセイ
ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２またはＨＴ２９－Ｌｕｃ２を、９６ウェル白色平底組織培養処理プレート（Ｃｏｓｔａｒ ＃３９１７）に、ＲＰＭＩ＋５％ヒト血清中１０，０００細胞／ウェルで播種した。ヒトＰＢＭＣを新たに解凍し、ＲＰＭＩ＋５％ヒト血清で２回洗浄し、１００，０００個のＰＢＭＣをＲＰＭＩ＋５％ヒト血清中でＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２またはＨＴ２９－Ｌｕｃ２を含むウェルに加えた。次いで、プロテアーゼ活性化ＴＣＢまたはＣＩ１０７を、３倍段階希釈によって得られたさまざまな濃度でウェルに添加した。対照ウェルには、未処理の標的細胞＋エフェクター細胞、標的細胞のみ、エフェクター細胞のみ、または培地のみが含まれていた。次いでプレートを３７℃、５％ＣＯ２で約４８時間インキュベートした。細胞生存率は、ＯＮＥ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ、＃Ｅ６１２０）及びＴｅｃａｎプレートリーダーを使用して測定した。細胞傷害性パーセントは次のように計算された：（１－（実験ＲＬＵ／未処理の平均ＲＬＵ））×１００。

【０２２９】

インビトロＴ細胞活性化とサイトカイン分析

Ｔ細胞の活性化は、ＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞またはＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞と共培養したＰＢＭＣにおけるＣＤ６９発現の誘導によって測定された。ＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞またはＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞を、Ｕ底非接着プレートに１０，０００細胞／ウェルで播種した。ヒトＰＢＭＣを新たに解凍し、血清を含むＲＰＭＩで２回洗浄し、１００，０００個のＰＢＭＣ／ウェルを腫瘍細胞を含むプレートに加えた。フローサイトメトリー補正対照用に、ＰＢＭＣのみを含む二重プレートを播種した。ＣＩ１０７、活性化ＣＩ１０７、またはＣＩ１２８の３倍段階希釈物を培地で調製し、播種した細胞に添加した。細胞を３７℃、５％CO_2で１６時間インキュベートした。フローサイトメトリー分析の準備として、プレートを２５０×ｇで１０～１５分間遠心分離した。サイトカイン分析のために上清を除去し、Ｆｃブロック（Ｈｕｍａｎ ＴｒｕＳｔａｉｎ ＦｃＸ、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）をそれぞれのウェルに添加し、プレートを１０分間インキュベートした。抗ＣＤ４５－ＦＩＴＣ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、抗ＣＤ３－パシフィックブルー（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、抗ＣＤ８ａ－ＡＰＣ（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、及び抗ＣＤ６９－ＰＥ－Ｃｙ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）を含む抗体カクテル、または適切な補正対照をウェルに追加し、プレートを、遮光して４℃で３０～６０分間振盪しながらインキュベートした。次いで、プレートをＦＡＣＳ緩衝液で洗浄し、７－ＡＡＤを含むＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁した。Ａｔｔｕｎｅフローサイトメーターを使用して蛍光を測定し、ＰＢＭＣを表す１５，０００の事象を収集した。

【０２３０】

サイトカイン分析には、Ｍｅｓｏ Ｓｃａｌｅ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｕ－ＰＬＥＸプレートアッセイ（Ｍｅｓｏ Ｓｃａｌｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＡ）を使用した。ＭＣＰ－１、ＴＮＦ－α、ＩＬ－６、ＩＬ－２、及びＩＦＮ－γのレベルを評価するために、製造者のプロトコールに従ってＵ－ＰＬＥＸプレートを調製した。ＰＢＭＣと共培養され、マスクされた（活性化可能な）ＣＩ１０７、活性化された（本明細書では「ａｃｔ－」とも呼ばれる）ＣＩ１０７、またはＣＩ１２８で処理されたＨＴ２９－Ｌｕｃ２またはＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２から収集された上清試料を希釈し、プレートに添加し、そして製造者の使用説明書に従って処理した。

【０２３１】

インビボ有効性試験

インビボ実験では、ＨＴ２９－Ｌｕｃ２またはＨＣＴ１１６腫瘍を担持し、ヒトＰＢＭＣの腹腔内（ＩＰ）注射によって得られたヒトＴ細胞を移植したマウスで、腫瘍増殖に対するＴＣＢの効果を測定した。０日目に、２００万個のＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞またはＨＣＴ１１６細胞を１００μｌの無血清ＲＰＭＩでメスＮＳＧマウスの側腹部に皮下注射した。単一ドナーからの凍結ＰＢＭＣを新たに解凍し、３日目に１００～２００μＬのＲＰＭＩ＋Ｇｌｕｔａｍａｘ、無血清培地中での腹腔内注射により投与した。ＰＢＭＣはＣＤ３＋Ｔ細胞のパーセンテージについて事前に特性評価されており、インビボ投与に使用されるＰＢＭＣの数は、１：１のＣＤ３＋Ｔ細胞対腫瘍細胞の比に基づいていた。約１２日目の腫瘍測定値を使用して、ＴＣＢ、対照試料、またはビヒクルを静脈内（ＩＶ）投与する前にマウスを無作為化した。動物に試験試料を３週間毎週投与し、腫瘍体積と体重を週に２回記録した。活性化されたＴＣＢ ＣＩ１０４は、インビボ研究に使用された。ＣＩ１０４構築物は、ＣＤ３マスクをｓｃＦｖに繋ぐために使用される切断可能なリンカーにおいてのみＣＩ１０７と異なる。マスクを完全に除去するためのインビトロプロテアーゼ活性化では、活性化ＣＩ１０４は活性化ＣＩ１０７と同一であり、活性化ＣＩ１０７の活性の評価に使用できる。その後のインビトロ細胞傷害性研究により、活性化ＣＩ１０４の活性が活性化ＣＩ１０７の活性と同じであることが検証された。

【０２３２】

非ヒト霊長類安全性試験

オスのカニクイザルは、試験試料に応じて、試験試料のゆっくりとしたＩＶボーラス注射を、１日目、または１日目と１５日目に１回、投与された。試験試料の投与後、臨床観

察を１日２回実施した。サイトカイン放出、血清化学、血液学、及び毒物動態の分析のために、投与後のさまざまな時点で血液試料を収集した。サイトカイン分析は、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｍｏｎｋｅｙ Ｍａｇｎｅｔｉｃ ２９－Ｐｌｅｘパネルキット（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を使用して血清試料に対して実施された。毒物動態分析の場合、試料は血漿に処理され、ＡＩＴ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ（Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ ＩＮ）またはＣｙｔｏｍＸによる分析のために送る前に－６０～－８６℃で保存された。試験試料の血漿濃度は、抗イディオタイプ捕捉抗体及び抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）捕捉抗体を使用するＥＬＩＳＡによって測定された。毒性動態分析は、Ｐｈｏｅｎｉｘ ＷｉｎＮｏｎｌｉｎ ｖ６．４（Ｃｅｒｔａｒａ，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，ＮＪ）を利用したノンコンパートメント分析を使用して、Ｎｏｒｔｈｗｅｓｔ ＰＫ Ｓｏｌｕｔｉｏｎｓによって実施された。

【０２３３】

結果

ＣＩ１０７は、抗ＥＧＦＲドメインと抗ＣＤ３ドメインを含む二重マスクされた（活性化可能な）デュアルアーム二価二重特異性分子として設計された。ＣＩ１０７は、重鎖のＮ末端に融合したＳＰ３４由来の抗ＣＤ３ε ｓｃＦｖを含むセツキシマブ由来の抗体を使用して生成された。ＣＩ１０７は、Ｆｃ機能を抑制する変異を伴うヒトＩｇＧ１ Ｆｃドメインを有する。ＣＩ１０７を生成するには、以前に記載されているように（Ｄｅｓｎｏｙｅｒｓ ２０１３）、フレキシブルなＧｌｙ－Ｓｅｒリッチペプチドリンカーが隣接するプロテアーゼ切断可能な基質リンカーを使用して、抗ＥＧＦＲ抗体構成要素に特異的なマスキングペプチドを軽鎖のＮ末端に融合した。抗ＣＤ３構成要素に特異的なマスキングペプチドも同様に、プロテアーゼで切断可能な基質リンカーを使用してｓｃＦｖに付加された。ＣＩ１０７はＦｃエフェクター機能を損ない、ＦｃγＲを発現する細胞への架橋を最小限に抑えた。この設計は、正常組織での結合と活性を最小限に抑えながら、プロテアーゼが豊富な腫瘍微小環境での標的の結合と活性を最大化することを目的としている。この実施例全体で使用される比較用ＴＣＢはすべて、さまざまな程度の切断性を持つＥＧＦＲ及びＣＤ３結合ドメイン、マスク、及びリンカーペプチドを含んでいる。ＣＩ０１１及びＣＩ０４０は、ＣＩ１０４及びＣＩ１０７の第１世代バージョンである。ＣＩ１０４及びＣＩ１０７分子には、最適化されたＣＤ３ ｓｃＦｖ、次世代の切断可能なリンカー、及び追加のＦｃサイレンシング変異が含まれている。ＣＩ１０４とＣＩ１０７は同じマスク、ならびにＥＧＦＲ及びＣＤ３結合ドメインを有しているが、ＣＤ３プロテアーゼリンカーが異なる。しかしながら、プロテアーゼ活性化後は、活性化されたＴＣＢは同一になる。ＣＩ１２８は、ＥＧＦＲバインダーが無関係な抗体（抗ＲＳＶ）に置き換えられた非標的対照として使用された。

【０２３４】

マスキングにより、細胞表面上のＥＧＦＲへの結合が損なわれる。

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

【０２３５】

標的細胞を、漸増濃度のＣＩ１０７または比較用の活性化構築物と共にインキュベートし、結合をフローサイトメトリーによって評価した。図８Ａ及び８Ｂに示すように、ＣＩ１０７におけるＥＧＦＲマスクの存在は、活性化されたＴＣＢ ＣＩ１０７と比較して、細胞表面上に発現するＥＧＦＲへの結合を実質的に弱めた。活性化されたＴＣＢ構築物は０．１７ｎＭの計算上のＫｄでＨＴ２９細胞に結合したが、ＣＩ１０７の結合のＫｄは９１．２８ｎＭであり、活性化ＴＣＢと比較して結合が５００倍を超えて減少していた。ＨＣＴ１１６細胞を使用しても同様の結果が得られた。ＣＩ１０７と同じ抗ＣＤ３モジュールを含むがＥＧＦＲ標的化を欠く非標的化対照ＴＣＢであるＣＩ１２８の結合も評価した。この対照は、ＨＴ２９細胞またはＨＣＴ１１６細胞に結合しなかった（図８Ａ及び８Ｂを参照されたい）。

【０２３６】
マスキングにより、リンパ球表面のＣＤ３への結合が損なわれる。
抗ＣＤ３結合ドメインのマスキングがリンパ球表面のＣＤ３へのＣＩ１０７の結合を損なうかどうかを判定するために、Ｊｕｒｋａｔ細胞へのＣＩ１０７及び活性化ＣＩ１０７（すなわち、活性化ＴＣＢ）の結合を測定した。図８Ｃに示すように、活性化ＴＣＢは０．６２ｎＭのＫｄでＪｕｒｋａｔ細胞に結合した。しかしながら、ＣＩ１０７の結合は検出されず、Ｋｄは計算できなかった。活性化された対照ＣＩ１２８は、活性化されたＴＣＢと同様の親和性でＪｕｒｋａｔ細胞に結合した。
【０２３７】
まとめると、これらのデータは、ＣＩ１０７における抗ＥＧＦＲ結合ドメインと抗ＣＤ３結合ドメインの二重マスキングが、ＥＧＦＲまたはＣＤ３を発現する細胞への結合を弱めることを示している。
【０２３８】
マスキングは、ＰＢＭＣ共培養における細胞傷害性とＴ細胞活性化を弱める。
ＣＩ１０７によるＥＧＦＲの標的化が抗腫瘍細胞効果をもたらすかどうかを検討するために、インビトロ細胞傷害性アッセイを実施した。ルシフェラーゼ発現ＨＴ２９細胞またはＨＣＴ１１６細胞をヒトＰＢＭＣと共培養し、漸増濃度のＣＩ１０７、活性化ＴＣＢ、または非標的化対照ＣＩ１２８とインキュベートした。４８時間の培養後、ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２またはＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞の生存率をルシフェラーゼアッセイによって測定した。図９Ａに示すように、対照ＣＩ１２８での処理は、ＰＢＭＣと共培養したＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞に対する細胞傷害性を最小限に抑え、細胞傷害性活性にはＥＧＦＲとＣＤ３の両方の関与が必要であることを実証した。対照的に、マスクされたＣＩ１０７と活性化されたＣＩ１０７（つまり、ａｃｔ－ＴＣＢ）の両方は、ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞に対して細胞傷害効果を示した。しかしながら、活性化されたＴＣＢは、マスクされた形態と比較してはるかに低い濃度で細胞傷害性をもたらし、ＥＣ５０値はそれぞれ０．４４ｐＭ及び７２９７ｐＭであった。同様の結果がＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞でも観察され、ＥＣ５０値は活性化ＴＣＢでは０．２５ｐＭであったのに対し、ＣＩ１０７では３６７８ｐＭであった（図９Ｂ）。したがって、ＣＩ１０７の抗ＥＧＦＲドメインと抗ＣＤ３ドメインの二重マスキングにより、プロテアーゼ活性化の非存在下でＰＢＭＣによって媒介される細胞傷害活性が約１５，０００分の１に減少した。
【０２３９】
ＣＩ１０７で処理すると、Ｔ細胞活性化のマーカーであるＣＤ６９発現が誘導される。
ＣＩ１０７がＴ細胞の活性化をもたらすかどうかを判定するために、マスクされたＣＩ１０７、活性化されたＣＩ１０７（すなわち、ａｃｔ－ＴＣＢ）、及び対照ＣＩ１２８での処理後に、ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２またはＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞と共培養されたＰＢＭＣにおけるＣＤ６９レベルを測定した。ＣＤ６９はＴ細胞活性化のマーカーとして機能する。ＴＣＲ／ＣＤ３結合後、ＣＤ６９発現はＴリンパ球の表面で急速に誘導され、Ｔ細胞の活性化と増殖の共刺激分子として作用する。ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞またはＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞と共培養したヒトＰＢＭＣを、漸増濃度のＣＩ１０７、活性化ＴＣＢ（すなわち、活性化ＣＩ１０７）、または対照ＣＩ１２８で１６時間処理し、ＣＤ６９発現レベルをフローサイトメトリーで測定した。図９Ｃに示すように、ＣＩ１０７は、ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２細胞と共培養したＣＤ８＋Ｔ細胞上でＣＤ６９発現を誘導し、ＥＣ５０は１４１７８ｐＭであった。対照的に、活性化されたＣＩ１０７による処理は、７．６５ｐＭのＥＣ５０でＣＤ６９を誘導し、ＣＩ１０７と比較してＴ細胞活性化曲線の約１８，０００倍のシフトを反映した。Ｔ細胞の活性化は、非ＥＧＦＲ標的化対照ＣＩ１２８では観察されず、ＣＤ３のみの関与ではＴ細胞の活性化に十分ではないことを示している。同様に、ＨＴ２９－Ｌｕｃ２細胞と共培養した同じドナーからのＰＢＭＣを処理すると、マスクされたＣＩ１０７のＥＣ５０値が６５９７１ｐＭであるのに対し、活性化ＴＣＢの場合は８．７５ｐＭでＣＤ６９が誘導され、ＣＤ６９誘導能の約７５００倍の差を反映している（図９Ｄ）。

【０２４０】
ＣＩ１０７による処理によりサイトカインが放出される。
ＴＣＢでの処理時のＥＧＦＲ発現がん細胞と共培養したＰＢＭＣにおけるＴ細胞活性化をさらに評価するために、ＣＩ１０７、活性化ＴＣＢ（すなわち、活性化ＣＩ１０７）、または対照ＣＩ１２８での治療後にサイトカイン放出を評価した。ＩＦＮ－γ、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＭＣＰ－１、及びＴＮＦ－αのレベルを、漸増濃度のＴＣＢで処理した１６時間後に測定した。図１０Ａ～１０Ｅに示すように、１０４ｐＭ範囲の濃度のＣＩ１０７で処理すると、測定されたそれぞれのサイトカインが放出された。対照的に、活性化されたＴＣＢは、１～１００ｐＭの範囲の濃度で処理するとサイトカインの放出を引き起こした。これらの結果は、異なるＰＢＭＣドナー細胞とがん細胞株の間で概ね一致していた（ＨＣＴ１１６－Ｌｕｃ２対ＨＴ２９－Ｌｕｃ２）。

【０２４１】
まとめると、これらのデータは、ＣＩ１０７のＥＧＦＲ結合ドメインとＣＤ３結合ドメインの二重マスキングが、プロテアーゼ活性化の非存在下でＴ細胞活性化を弱めることを示している。

【０２４２】
プロテアーゼ切断に対するＴＣＢの感受性は、インビボの抗腫瘍効果及び腫瘍内Ｔ細胞と相関する。
ＴＣＢの抗腫瘍効果をインビボで評価した。ＨＴ２９－Ｌｕｃ２腫瘍を担持し、ヒトＰＢＭＣが移植された免疫無防備状態のマウスを、ビヒクル（ＰＢＳ）、または異なるプロテアーゼ感受性を有するリンカー（ＣＩ０１１、ＣＩ０４０）、切断不可能なリンカー（ＣＩ０２０）、またはマスクされていない二重特異性治療用ＣＩ０４８を含む０．３ｍｇ／ｋｇのＴＣＢで週に１回、３週間処置した。ＣＩ０２０は切断不可能なリンカーにより最小限の抗腫瘍活性を有すると予想されるのに対し、マスクされていないＣＩ０４８は最大の有効性を有すると予想される。ＣＩ０１１とＣＩ０４０はどちらもＥＧＦＲマスクとＣＤ３マスクを含み、リンカーペプチドが異なるためプロテアーゼ感受性が異なる。ＣＩ０４０のプロテアーゼ感受性はＣＩ０１１よりも大きい。

【０２４３】
図１１Ａに示すように、マスクされていないＴＣＢ　ＣＩ０４８による処置は、処置開始後１週間以内に腫瘍退縮をもたらした。同様に、マスクされたＣＩ０１１及びＣＩ０４０による処置でも腫瘍の退縮または増殖停止が生じた。ＣＩ０４０で見られる退縮は、ＣＩ０１１と比較してこの分子のリンカーの切断可能性が高いことと相関している。対照的に、切断不可能なリンカーを含むＣＩ０２０による処置は腫瘍増殖に影響を及ぼさず、インビボでのＴＣＢの抗腫瘍活性にはプロテアーゼ切断性が必要であることが示された。

【０２４４】
試験したＴＣＢによって媒介される抗腫瘍効果が腫瘍内のＴ細胞の存在と相関するかどうかを判定するために、動物に１ｍｇ／ｋｇの用量のマスクされたＴＣＢまたは活性化されたＴＣＢを投与した１週間後に腫瘍を採取し、ＣＤ３の免疫組織化学検査を実施した。図１１Ｂに示すように、ビヒクルまたは切断不可能なＣＩ０２０での処置後の腫瘍組織では、最小限の数のＴ細胞が観察された。対照的に、ＴＣＢ　ＣＩ０４０またはインビトロプロテアーゼ活性化ＴＣＢ　ＣＩ０４８での処置では、Ｔ細胞数の増加が観察された。ここでも、プロテアーゼ感受性がより高いＴＣＢ（ＣＩ０４０）により、腫瘍内のＴ細胞の数が増加した。

【０２４５】
まとめると、これらのデータは、ＴＣＢが、ＥＧＦＲ及びＣＤ３結合ドメインマスクのプロテアーゼ切断に対する感受性と相関する腫瘍内Ｔ細胞とインビボでの抗腫瘍効果とをもたらす可能性があることを示唆している。

【０２４６】
ＣＩ１０７による処置は、確立された異種移植片腫瘍の用量依存的な退縮を誘導する。
インビボ腫瘍増殖に対するＣＩ１０７の効果を評価した。ＮＳＧマウスの皮下にＨＴ２

９細胞を移植し、続いてＰＢＭＣをＩＰ注射し、ＰＢＭＣを約１１日間生着させた。次に、動物をビヒクル、０．５ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７、または１．５ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７で、週に１回、３週間処置した。図１２Ａに示すように、０．５ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７による処置は腫瘍の増殖停止をもたらし、１．５ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７は処置開始の約１週間後から腫瘍の退縮をもたらした。

【０２４７】

ＣＩ１０７のインビボ有効性は、ＨＣＴ１１６腫瘍でも評価された。腫瘍及びＰＢＭＣの生着後、動物をビヒクル、０．３ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７、１ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７、または０．３ｍｇ／ｋｇの活性化ＴＣＢで処置した。図１２Ｂに示すように、０．３ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７はＨＣＴ１１６腫瘍の増殖を遅延させたが、１ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７及び０．３ｍｇの活性化ＴＣＢは、処置期間中同様のレベルの腫瘍の退縮及び増殖停止をもたらした。

【０２４８】

これらのデータは、ＣＩ１０７がＨＴ２９及びＨＣＴ１１６の異種移植腫瘍における用量依存的な腫瘍増殖の阻害及び退縮を誘導すること、及び３倍高用量のＣＩ１０７の抗腫瘍活性が活性化ＴＣＢの抗腫瘍活性と同等であることを実証している。

【０２４９】

マスクされたＣＩ１０７は、カニクイザルにおいて、活性化されたＣＩ１０７と比較して安全性が向上する。

ＣＩ１０７の前臨床忍容性をカニクイザルの研究で評価した。動物に、０．０６ｍｇ／ｋｇまたは０．１８ｍｇ／ｋｇの活性化ＣＩ１０７（すなわち、ａｃｔ－ＴＣＢ）及び０．６ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ、４．０ｍｇ／ｋｇ、または６．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７を単回投与し、動物は臨床観察のために追跡された。０．１８ｍｇ／ｋｇの活性化ＴＣＢで処置された動物は、嘔吐、食欲不振、青白い外観、前かがみの姿勢、やせた外観などの重篤な臨床作用を経験し、有害作用は投与後２時間という早い時期から最長１０日まで認められた。０．０６ｍｇ／ｋｇの活性化ＴＣＢで処置された動物は、投与後１日目に嘔吐や前かがみの姿勢を含む中程度及び一時的な臨床作用を経験した。これらの作用は迅速に解消されたことから、０．０６ｍｇ／ｋｇが活性化ＴＣＢの最大耐用量（ＭＴＤ）として定義された。対照的に、２．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７で処置した動物は、一時的かつ軽度の臨床作用（２日目の嘔吐）のみを経験し、０．６ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７で処置した動物は、いかなる有害作用も経験しなかった。４．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７で処置した動物は、中等度の臨床作用を経験した（投与後４、８、及び２４時間での嘔吐及び２日目の食欲不振を含む）。６．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７で処置した動物は、２日目に死亡しているのが発見された。死亡前に認められた臨床症状には、投与後の前かがみの姿勢、青白い外観、嘔吐、及び液状便が含まれていた。したがって、４．０ｍｇ／ｋｇがＣＩ１０７のＭＴＤと考えられた。全体として、マスクされたＣＩ１０７は、活性化ＴＣＢと比較して忍容性において６０倍を超える改善を達成した。

【０２５０】

活性化されたＣＩ１０７またはマスクされたＣＩ１０７での処置後にサイトカインレベルも検査された。図１３に示すように、ＩＬ－６（１３Ａ）及びＩＦＮ－γ（１３Ｂ）のレベルは、活性化ＴＣＢで処置した動物において投与後８時間で上昇した。対照的に、０．６ｍｇ／ｋｇまたは２．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７での処置後には、ＩＬ－６またはＩＦＮ－γの最小限の変化が観察された。これらのサイトカインのレベルの上昇は、４．０ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７での処置後にのみ見られた。臨床観察と一致して、ＣＩ１０７はサイトカイン放出の用量反応を６０倍超シフトさせる。

【０２５１】

血清化学の分析でも、活性化ＴＣＢとＣＩ１０７の違いが実証された。図１３Ｃに示すように、活性化ＴＣＢによる処置は、投与後４８時間で、肝細胞傷害のマーカーであるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）の用量依存的な増加をもたらした。対照的に、いずれの耐用量レベルでもＣＩ１０７による処置後にＡＳＴの変化は観察されず

、このマスクされたＴＣＢによる耐容性の向上が実証された。

【０２５２】

ＥＧＦＲ及びＣＤ３結合ドメインのマスキングが薬物動態に影響を及ぼすかどうかを検討するために、投与後の活性化ＴＣＢ（すなわち、活性化ＣＩ１０７）及びマスクされたＣＩ１０７の血漿濃度を測定した。図１３Ｄに示すように、活性化されたＴＣＢは、投与後２４時間以内に循環から急速に排除された。対照的に、ＣＩ１０７は投与後最大７日間血漿中に維持され、マスキングにより活性化ＴＣＢと比較して曝露が増加する可能性があることが示唆された。０．０６ｍｇ／ｋｇの活性化ＴＣＢの単回投与後のＡＵＣ（０－７）は０．０４日＊ｎＭ（ｎ＝１）であったが、２ｍｇ／ｋｇのＣＩ１０７の投与後のＡＵＣ（０－７）は３３１．７日＊ｎＭであった（ｎ＝３の平均）。これは８，０００倍を超える許容暴露量の増加を示している。

【０２５３】

これは、マスクされたＣＩ１０７で観察された忍容性と薬物動態の改善が、正常組織環境におけるＥＧＦＲとＣＤ３への結合の予想される減衰と一致していることを示している。

表１６．配列表

配列番号	説明	配列
1	MM1-複合体-67	VSTTCWWDPPCTPNT
2	CM1	GLSGRSDDH
3	VH CDR1 複合体-67	KYAMN
4	VH CDR2 複合体-67	RIRSKYNNYATYYADSVKD
5	VH CDR3 複合体-67	HGNFGNSYISYWAY
6	VL CDR1 複合体-67	GSSTGAVTSGNYPN
7	VL CDR2 複合体-67	GTKFLAP
8	VL CDR3 複合体-67	VLWYSNRWV
9	VH1 複合体 67	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS
10	VL1 複合体-67	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
11	scFv 複合体-67	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGN YPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
12	リンカー	GSSGGSGGSG
13	MM2 複合体-67 複合体-57	LSCEGWAMNREQCRA
14	CM2	ISSGLLSGRSDQH
15	VH2 CDR1 複合体-67 複合体-57	NYGVH
16	VH2 CDR2 複合体-67	VIWSGGNTDYNTPFTS

配列番号	説明	配列
	複合体-57	
17	VH2 CDR3 複合体-67 複合体-57	ALTYYDYEFAY
18	VL2 CDR1 複合体-67 複合体-57	RASQSIGTNIH
19	VL2 CDR2 複合体-67 複合体-57	YASESIS
20	VL2 CDR3 複合体-67 複合体-57	QQNNNWPTT
21	VH2 ドメイン 複合体-67 複合体-57 CI106(対照)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKG LEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQ DTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
22	VL2 ドメイン 複合体-67 複合体-57 CI106(対照)	QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLL IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNW PTTFGAGTKLELK
23	Fc1 複合体-67 複合体-57	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
24	末端リジンを有する Fc1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	CL ドメイン 複合体-67 複合体-57 CI106(対照)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
26	CH1-ヒト IgG1-	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA

配列番号	説明	配列
	複合体-67 複合体-57	LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKV
27	CH1-ヒトIgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
28	C末端リジンを有しないFc2 複合体-67 複合体-57	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	C末端リジンを有するFc2	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLY SDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	第1のポリペプチド 複合体-67	[QGQSGS]VSTTCWWDPPCTPNT**GSSGGSGGSGG***LSGRSDDH***GG GS***EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS*****GGGGSGGGGSGGG GS***QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQA PRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVL**GGGGS**QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCT VSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRL SINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQ GTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	第2のポリペプチド 複合体-67	[QGQSGQG]LSCEGWAMNREQCRA**GGGSSGGS***ISSGLLSGRSDQH*** **GGGS**QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNG SPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ

配列番号	説明	配列
	複合体-57 CI106(対照)	NNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
32	第3のポリペプチド 複合体-67 複合体-57	**DKTHTCPPC**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPP VLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
33	スペーサー	QGQSGS
34	ヒンジ-1 複合体-67 複合体-57 CI106(対照)	EPKSCDKTHTCPPC
35	ヒンジ-2 複合体-67 複合体-57	DKTHTCPPC
36	末端リジンを有する第3のポリペプチド 複合体-67 複合体-57	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVL DSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
37	複合体-67/複合体-57-スペーサーを有しない第2のポリペプチド	LSCEGWAMNREQCRAGGGSSGGSISSGLLSGRSDQHGGGSQILLT QSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYA SESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTF GAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
38	複合体-57 末端リジンを有しない第1のポリペプチド	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGGG SQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPG QAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDY YCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTA VYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSQVQLKQ SGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYC ARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSG

配列番号	説明	配列
		GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKP<u>C</u>EEQY<u>G</u>STYR<u>C</u>VSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR<u>K</u>EMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL<u>K</u>SDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
39	リンカー	GGGS
40	リンカー	$(GGGS)_n$
41	リンカー	(GSGGS)n
42	リンカー	GGSG
43	リンカー	GGSGG
44	リンカー	GSGSG
45	リンカー	GSGGG
46	リンカー	GGGSG
47	リンカー	GSSSG
48	リンカー	GGGGSGGGGSGGGGSGS
49	リンカー	GGGGSGS
50	リンカー	GGGGSGGGGSGGGGS
51	リンカー	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
52	リンカー	GGGGS
53	リンカー	GGGGSGGGGS
54	リンカー	GGGS
55	リンカー	GGGSGGGS
56	リンカー	GGGSGGGSGGGS
57	リンカー	GSSGGSGGSGG
58	リンカー	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
59	リンカー	GSTSGSGKPGSSEGST
60	リンカー	SKYGPPCPPCPAPEFLG
61	リンカー	GGSLDPKGGGGS
62	リンカー	PKSCDKTHTCPPCPAPELLG
63	リンカー	GKSSGSGSESKS
64	リンカー	GSTSGSGKSSEGKG
65	リンカー	GSTSGSGKSSEGSGSTKG
66	リンカー	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
67	MM1	MMYCGGNEVLCGPRV
68	MM1	GYRWGCEWNCGGITT
69	MM1	MMYCGGNEIFCEPRG
70	MM1	GYGWGCEWNCGGSSP

配列番号	説明	配列
71	MM1	MMYCGGNEIFCGPRG
72	MM1	GYLWGCEWNCGGITT
73	CM1 複合体-67 複合体-57 CI106	LSGRSDDH
74	CM	ISSGLLSGRSDQH
75	CM	LSGRSDNH
76	CM	TSTSGRSANPRG
77	CM	VHMPLGFLGP
78	CM	AVGLLAPP
79	CM	QNQALRMA
80	CM	ISSGLLSS
81	CM	ISSGLLSGRSDNH
82	CM	LSGRSGNH
83	CM	LSGRSDIH
84	CM	LSGRSDQH
85	CM	LSGRSDTH
86	CM	LSGRSDYH
87	CM	LSGRSDNP
88	CM	LSGRSANP
89	CM	LSGRSANI
90	CM	LSGRSDNI
91	CM	ISSGLLSGRSANPRG
92	CM	AVGLLAPPTSGRSANPRG
93	CM	AVGLLAPPSGRSANPRG
94	CM	ISSGLLSGRSDDH
95	CM	ISSGLLSGRSDIH
96	CM	ISSGLLSGRSDTH
97	CM	ISSGLLSGRSDYH
98	CM	ISSGLLSGRSDNP
99	CM	ISSGLLSGRSANP
100	CM	ISSGLLSGRSANI
101	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
102	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
103	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
104	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
105	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
106	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNP

配列番号	説明	配列
107	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANP
108	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANI
109	CM	ISSGLLSGRSDNI
110	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
111	CM	ISSGLLSGRSGNH
112	複合体-67 第1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド	CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGGGACC CTCCATGCACACCTAATACCGGCAGCTCTGGTGGCTCTGGCGG AAGCGGAGGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCACGGCGGAGG ATCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGACTGGTTCAG CCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCA CCTTCAACAAATACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCCTGG CAAAGGCCTTGAATGGGTCGCCAGAATCAGAAGCAAGTACAA CAACTATGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATT CACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCA GATGAACAACCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTG TGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTACTGG GCCTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTAGTGGCG GAGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGCGGAGGTTCTC AAACAGTGGTCACCCAAGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGG CGGAACCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACAGGCGCCGTG ACCAGCGGCAACTACCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGC CAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGCACAAAGTTTCTGGCTC CCGGAACACCAGCCAGATTCAGCGGTTCTCTGCTCGGAGGAA AGGCCGCTCTGACACTTTCTGGCGTGCAGCCTGAGGATGAGGC CGAGTACTATTGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTC GGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGTGGCGGTAGC CAGGTCCAGCTGAAACAATCTGGACCCGGACTCGTGCAGCCA AGCCAGAGCCTGTCTATCACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAGCC TGACCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCTCCCGGCAA GGGACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAACAC CGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGAGCATCAACAA GGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTG CAGAGCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGA CCTACTATGACTACGAGTTTGCCTACTGGGGACAGGGAACCCT CGTGACAGTGTCTGCTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTC CCACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCGGTGGAACAGCC GCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCGAGCCAGTGA CCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCTGGCGTGCACAC ATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCTGTACTCTCTGTCC AGCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCT

配列番号	説明	配列
		ACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACACACCT GTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGT GTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGC AGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACG AGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGG AAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACG GCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAA CAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC AAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTG CCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGG GAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACAACCCCT CCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGC TGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCAAA
113	第2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド	CAAGGCCAGTCTGGCCAAGGTCTTAGTTGTGAAGGTTGGGCG ATGAATAGAGAACAATGTCGAGCCGGAGGTGGCTCGAGCGGC GGCTCTATCTCTTCCGGACTGCTGTCCGGCAGATCCGACCAGC ACGGCGGAGGATCCCAAATCCTGCTGACACAGTCTCCTGTCAT ACTGAGTGTCTCCCCCGGCGAGAGAGTCTCTTTCTCATGTCGG GCCAGTCAGTCTATTGGGACTAACATACACTGGTACCAGCAAC GCACCAACGGAAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCG AAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCA GCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAAGCG AAGATATTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACTGGCC GACCACCTTTGGCGCGGGCACCAAACTGGAACTGAAACGTAC GGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATA ACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGC AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGT
114	第3のポリペプチドをコードす	GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGC TCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGA

配列番号	説明	配列
	るポリヌクレオチド	CACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG GTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACAAAGCCCT GCGAGGAACAGTACGGCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGC TGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAA AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGT GTACACACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGAT ATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAAC TACGACACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCT TCCTGTACAGCGACCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGC AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAA A
115	軽鎖	CAAGGACAATCTGGACAGGGCCTGAGCTGTGAAGGCTGGGCC ATGAATAGAGAGCAGTGCAGAGCTGGCGGCGGATCTTCTGGC GGCTCTATCTCTTCTGGACTGCTGAGCGGCAGAAGCGATCAAC ACGGCGGAGGCTCTCAGATCCTGCTGACACAGAGCCCCGTGA TCCTGTCTGTGTCTCCTGGCGAGAGAGTGTCCTTCAGCTGTAG AGCCAGCCAGTCCATCGGCACCAACATCCACTGGTATCAGCA GCGGACCAACGGCAGCCCCAGACTGCTGATTAAGTACGCCAG CGAGAGCATCAGCGGCATCCCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGG CTCTGGCACCGACTTCACCCTGAGCATCAACAGCGTGGAAAGC GAGGATATCGCCGACTACTACTGCCAGCAGAACAACAACTGG CCCACCACCTTTGGAGCCGGCACCAAGCTGGAACTGAAGAGA ACAGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCGACG AGCAGCTGAAAAGCGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGA ACAACTTCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGG ACAACGCCCTGCAGAGCGGCAATAGCCAAGAGTCTGTGACCG AGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACG CCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAA GAGCTTCAACCGGGGCGAGTGT
116	スペーサー	QGQSGS
117	スペーサー	QGQSGQG
118	スペーサー	QGQSGS
119	スペーサー	QGQSGQG
120	スペーサーを有	VSTTCWWDPPCTPNT**GSSGGSGGSGG***LSGRSDDH***GGGS***EVQLVE*

配列番号	説明	配列
	しない第1のポリペプチド	*SGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS***GGGGSGGGGSGGGGS***QTVV TQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIG GTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVL***GGGGS***QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSL TNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKD NSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLV TVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP CEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
121	ブランク	
122	抗CD3 scFv V16 複合体-57 CI106	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQ APRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGRI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTA VYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
123	CI106-重鎖 CRF41-2008-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v16sc-H-N	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGGG SQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPG QAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDY YCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTA VYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSQVQLKQ SGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYC ARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF

配列番号	説明	配列
		FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
124	Fc Mut 4	PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
125	CI106 重鎖-CRF41-2008-C225v5Fcmt4-h20GG-0011-v16sc-H-N	CAAGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTTGCGAGTGGA ATTGCGGAGGGATCACTACAGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTG GCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCGATGATCATGGCGGCGG TTCTCAAACTGTAGTAACTCAAGAACCAAGCTTCTCCGTCTCC CCTGGGGGAACAGTCACACTTACCTGCCGAAGTAGTACAGGT GCTGTTACGACCAGTAACTATGCCAATTGGGTACAACAAACGC CTGGTCAGGCTCCGCGCGGATTGATAGGAGGCACGAATAAAC GGGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTCAGCGGAAGCATACTCG GTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACTGGGGCCCAAGCTGATGA TGAAAGTGATTATTATTGTGCGCTCTGGTACAGCAACCTCTGG GTGTTTGGGGGTGGCACGAAACTTACTGTCTTGGGCGGCGGCG GATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAGGAGGAGGCTCAGAAGTCC AACTGGTCGAATCCGGGGGAGGGCTCGTACAGCCGGGTGGGT CCCTCAAACTCTCTTGTGCGGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTAC ATACGCGATGAATTGGGTCCGGCAGGCCAGTGGGAAAGGGCT CGAATGGGTAGGACGAATCCGATCAAAATACAACAACTACGC TACTTATTACGCTGATTCCGTGAAGGACAGATTCACAATATCC CGCGACGATAGCAAGAATACGGCATATCTTCAGATGAATTCTC TTAAAACTGAGGATACCGCTGTGTATTACTGCACAAGACATGG TAATTTTGGAAACTCATATGTCTCTTGGTTCGCTTATTGGGGAC AGGGCACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGGATCCCA GGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCAGCCGAG CCAGAGCCTGAGCATTACCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTG ACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGAGCCCGGGCAAA GGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACC GATTATAACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGCATTAACAAAG ATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAAATGAACAGCCTGC AAAGCCAGGATACCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCTGAC CTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCCTG GTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG

配列番号	説明	配列
		CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTAC ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGC CCACCGTGCCCAGCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCT TCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCA GAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCTCAATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCT CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAG AAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
126	リンカー	(GGGGS)n
127	リンカー	GGGSSGGS
128	VH1 CDR1 複合体-57 CI106(対照)	TYAMN
129	VH1 CDR2 複合体-57 CI106(対照)	RIRSKYNNYATYYADSVKD
130	VH1 CDR3 複合体-57 CI106(対照)	HGNFGNSYVSWFAY
131	VL1 CDR1 複合体-57 CI106(対照)	RSSTGAVTTSNYAN
132	VL1 CDR2 複合体-57 CI106(対照)	GTNKRAP
133	VL1 CDR3 複合体-57	ALWYSNLWV

配列番号	説明	配列
	CI106(対照)	
134	VH1 ドメイン複合体-57 CI106(対照)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGK GLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMN SLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
135	VL1 ドメイン複合体-57 CI106(対照)	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQ APRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYY CALWYSNLWVFGGGTKLTVL
136	複合体-57 末端リジンを有する第 1 のポリペプチド	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGGG SQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPG QAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDY YCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEWVGR IRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTA VYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGGGGSQVQLKQ SGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYC ARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
137	末端リジンを有する第 1 のポリペプチド複合体-67	[GQSGSVSTTCWWDPPCTPNT**GSSGGSGGSGG***LSGRSDDH***GGGS***EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS **GGGGSGGGGSGGGGS***QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL**GGG GS**QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP GKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNS LQSQDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号	説明	配列
138	ブランク	
139	複合体-67 末端リジンを有しない第1のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド	CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGGGACC CTCCATGCACACCTAATACCGGCAGCTCTGGTGGCTCTGGCGG AAGCGGAGGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCACGGCGGAGG ATCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGACTGGTTCAG CCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCA CCTTCAACAAATACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCCTGG CAAAGGCCTTGAATGGGTCGCCAGAATCAGAAGCAAGTACAA CAACTATGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATT CACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCA GATGAACAACCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTG TGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTACTGG GCCTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTAGTGGCG GAGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGCGGAGGTTCTC AAACAGTGGTCACCCAAGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGG CGGAACCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACAGGCGCCGTG ACCAGCGGCAACTACCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGC CAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGCACAAAGTTTCTGGCTC CCGGAACACCAGCCAGATTCAGCGGTTCTCTGCTCGGAGGAA AGGCCGCTCTGACACTTTCTGGCGTGCAGCCTGAGGATGAGGC CGAGTACTATTGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTC GGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGTGGCGGTAGC CAGGTCCAGCTGAAACAATCTGGACCCGGACTCGTGCAGCCA AGCCAGAGCCTGTCTATCACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAGCC TGACCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCTCCCGGCAA GGGACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAACAC CGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGAGCATCAACAA GGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTG CAGAGCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGA CCTACTATGACTACGAGTTTGCCTACTGGGGACAGGGAACCCT CGTGACAGTGTCTGCTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTC CCACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCGGTGGAACAGCC GCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCGAGCCAGTGA CCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCTGGCGTGCACAC ATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCTGTACTCTCTGTCC AGCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACACACCT GTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGT

配列番号	説明	配列
		GTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGC AGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACG AGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGG AAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACG GCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAA CAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC AAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTG CCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGG GAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACAACCCCT CCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGC TGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGC
140	C 末端リジンを有する第 3 のポリペプチド 複合体-67 複合体-57	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVL DSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
141	C 末端リジンをコードするコドンを有しない第 3 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド 複合体-67 複合体-57	GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGC TCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGA CACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG GTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGT ACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACAAAGCCCT GCGAGGAACAGTACGGCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGC TGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAA AACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGT GTACACACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGAT ATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAAC TACGACACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCT TCCTGTACAGCGACCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGC AGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGC
142	複合体-57 第 1 のポリペプ	CAAGGACAATCTGGATCCGGCTATCTGTGGGGCTGCGAGTGG AATTGTGGCGGCATCACAACAGGCTCTAGCGGCGGAAGCGGA

配列番号	説明	配列
	チドをコードするポリヌクレオチド(C 末端リジンに対するコドンを有しない)	GGATCTGGTGGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCATGGCGGCG GATCCCAGACCGTGGTCACACAAGAGCCTAGCTTCTCCGTGTC TCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACATGCAGATCTTCTACAGGC GCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAATTGGGTGCAGCAGACC CCTGGACAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAAA AGAGCCCCTGGCGTCCCAGATAGATTCAGCGGCTCTATCCTGG GCAACAAGGCCGCACTGACAATCACAGGCGCCCAGGCCGATG ACGAGAGCGATTACTATTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTG GGTTTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGCGGAGG CGGAAGTGGTGGTGGCGGATCTGGTGGCGGTGGATCTGAAGT GCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGACTTGTTCAGCCAGGCGG CTCTCTGAAGCTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTCACCTTTAGCA CCTACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTGGCAAAGGCCT GGAATGGGTCGGACGGATCAGAAGCAAGTACAACAATTACGC CACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAG CCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAG CCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGACA CGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGG GGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGTTCTGGCGGCGGAGGT TCTCAGGTGCAGCTGAAACAGTCTGGCCCTGGACTGGTGCAGC CTAGCCAGTCTCTGAGCATCACCTGTACCGTGTCCGGCTTCTC CCTGACCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCCCCAGGC AAGGGACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAAC ACCGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGTCCATCAACA AGGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCT GCAGAGCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTG ACCTACTATGACTACGAGTTCGCCTATTGGGGACAGGGAACCC TCGTGACAGTGTCTGCCGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTT CCCACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCGGTGGAACAGCC GCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCGAGCCAGTGA CCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCTGGCGTGCACAC ATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCTGTACTCTCTGTCC AGCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACACACCT GTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGT GTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGC AGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACG AGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGG AAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACG

配列番号	説明	配列
		GCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAA CAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC AAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTG CCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGG GAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACAACCCCT CCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGC TGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGC
143	VH1 CDR3 複合体-57 CI106(対照)	HGFGNSYVSWFAY
144	VL1 CDR1 複合体-57 CI106(対照)	GSSTGAVTSGYYPN
145	VL1 CDR1 複合体-57 CI106(対照)	RSSGAVTTSNYAN
146	VL1 CDR3 複合体-57 CI106(対照)	ALWYSNRWV
147	抗 CD3 マスキング部分	VYYCGGNESLCGERR
148	抗 CD3 マスキング部分	WYSGGCEAFCGILSS
149	抗 CD3 マスキング部分	FMCQQRMWGNEFCHQ
150	抗 CD3 マスキング部分	YSLWGCEWGCDRGLY
151	抗 CD3 マスキング部分	YSACEMFGEVECCFC
152	抗 CD3 マスキング部分	GYSGGCEFRCYQLYS
153	抗 CD3 マスキ	KFCHCGYYCRVCTLK

配列番号	説明	配列
	ング部分	
154	抗 CD3 マスキング部分	LGCNNLWGNEFCHPV
155	抗 CD3 マスキング部分	GHPCWGNESYCHTHS
156	CM	ALAHGLF
157	CM	APRSALAHGLF
158	CM	ISSGLLSGRSNI
159	CM	LSGRSNI
160	複合体-57 第 1 のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(C 末端リジンに対するコドンを有する)	CAAGGACAATCTGGATCCGGCTATCTGTGGGGCTGCGAGTGG AATTGTGGCGGCATCACAACAGGCTCTAGCGGCGGAAGCGGA GGATCTGGTGGACTGTCTGGCAGATCCGATGATCATGGCGGCG GATCCCAGACCGTGGTCACACAAGAGCCTAGCTTCTCCGTGTC TCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACATGCAGATCTTCTACAGGC GCCGTGACCACCAGCAACTACGCCAATTGGGTGCAGCAGACC CCTGGACAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAAA AGAGCCCCTGGCGTCCCAGATAGATTCAGCGGCTCTATCCTGG GCAACAAGGCCGCACTGACAATCACAGGCGCCCAGGCCGATG ACGAGAGCGATTACTATTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTG GGTTTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGCGGAGG CGGAAGTGGTGGTGGCGGATCTGGTGGCGGTGGATCTGAAGT GCAGCTGGTGGAATCTGGCGGAGGACTTGTTCAGCCAGGCGG CTCTCTGAAGCTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTCACCTTTAGCA CCTACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTGGCAAAGGCCT GGAATGGGTCGGACGGATCAGAAGCAAGTACAACAATTACGC CACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAG CCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAG CCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGACA CGGCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGG GGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGTTCTGGCGGCGGAGGT TCTCAGGTGCAGCTGAAACAGTCTGGCCCTGGACTGGTGCAGC CTAGCCAGTCTCTGAGCATCACCTGTACCGTGTCCGGCTTCTC CCTGACCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGACAATCCCCAGGC AAGGGACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAAC ACCGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGTCCATCAACA AGGACAACAGCAAGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCT GCAGAGCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTG ACCTACTATGACTACGAGTTCGCCTATTGGGGACAGGGAACCC TCGTGACAGTGTCTGCCGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTT CCCACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCGGTGGAACAGCC

配列番号	説明	配列
		GCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCGAGCCAGTGA CCGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCTGGCGTGCACAC ATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCTGTACTCTCTGTCC AGCGTTGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACACACCT GTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGT GTTTCTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGC AGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACG AGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGG AAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACG GCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAA CAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC AAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTG CCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGG GAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACTACAAGACAACCCCT CCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGC TGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCAAA

【０２５４】

本開示は、本明細書に記載の態様によって範囲を限定されるものではない。実際、説明されたものに加えて、本開示のさまざまな改変が、上述の説明及び添付の図面から当業者に明らかになるであろう。そのような改変は、添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることが意図される。

【０２５５】

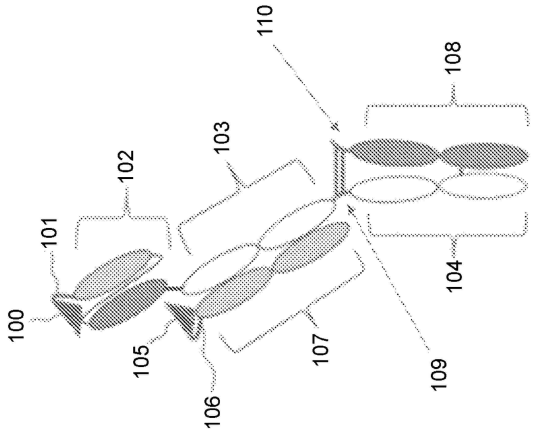
本明細書に引用されたすべての参考文献（例えば、出版物または特許または特許出願）は、あたかも個々の参考文献（例えば、出版物または特許または特許出願）が具体的かつ個別にあらゆる目的のためにその全体が参照により組み込まれていることが示されているのと同程度に、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０２５６】

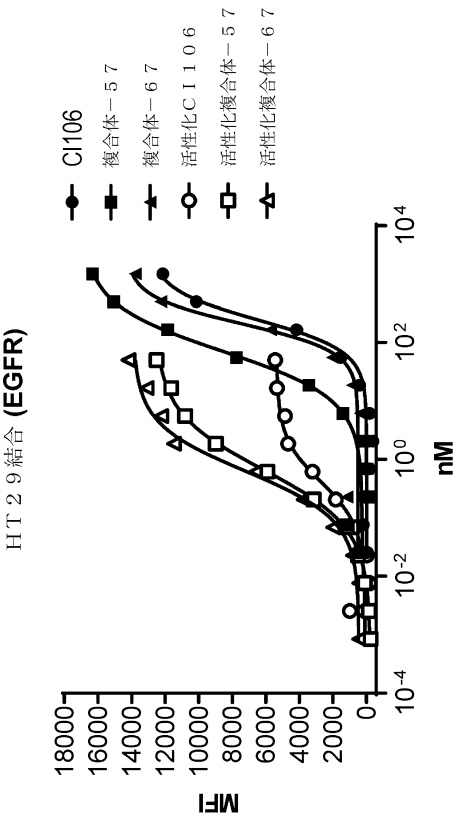
いくつかの態様は、以下の特許請求の範囲内にある。

【図面】

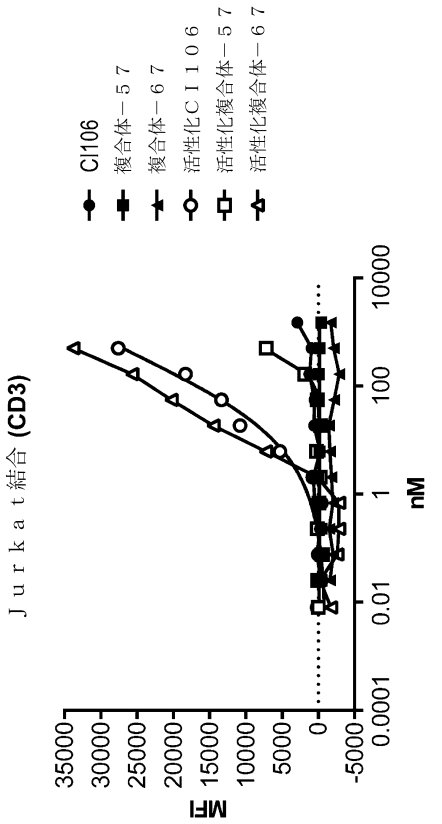
【図１】


100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110

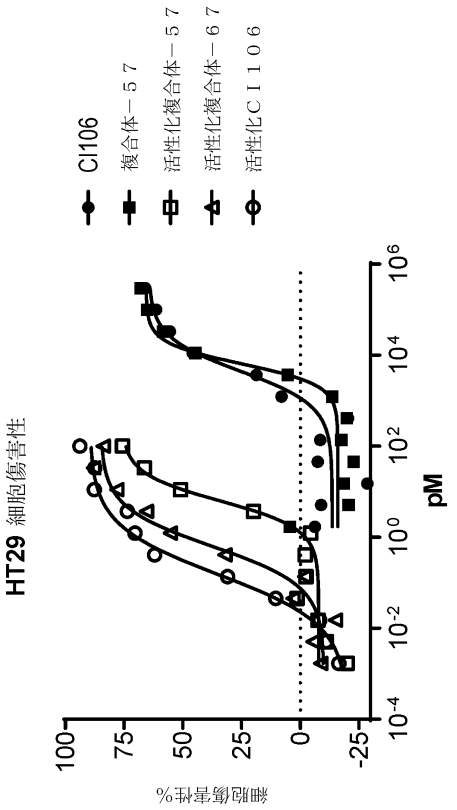
【図２Ａ】


Cl106
複合体－５７
複合体－６７
活性化ＣＩ１０６
活性化複合体－５７
活性化複合体－６７
ＨＴ２９結合 (EGFR)
MFI
nM
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
10-4
10-2
100
102
104

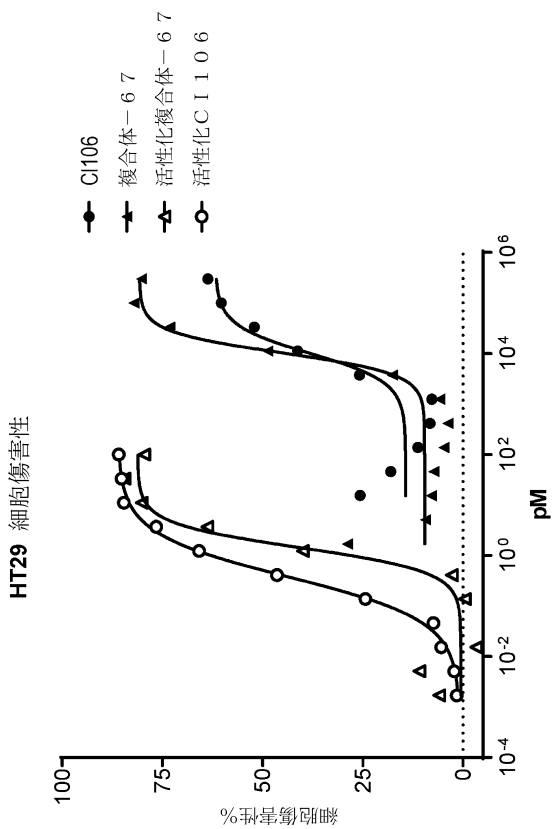
【図２Ｂ】



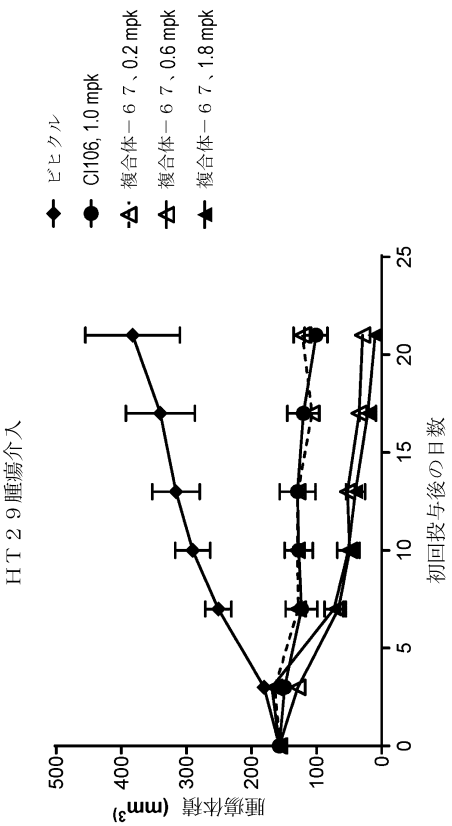
【図３Ａ】



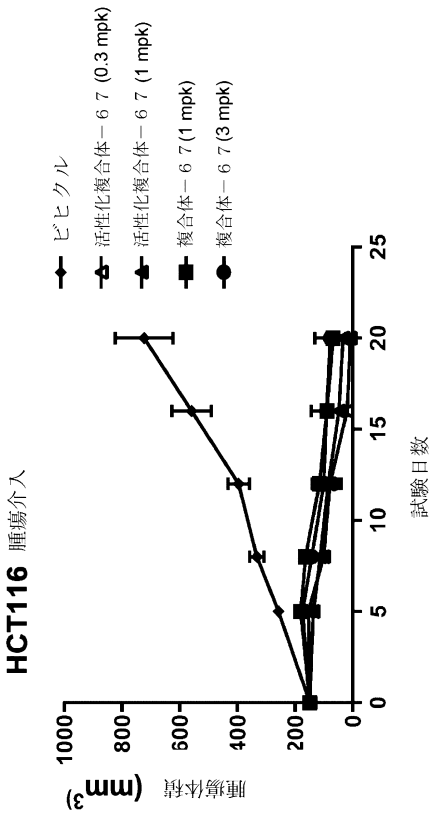
【図３Ｂ】



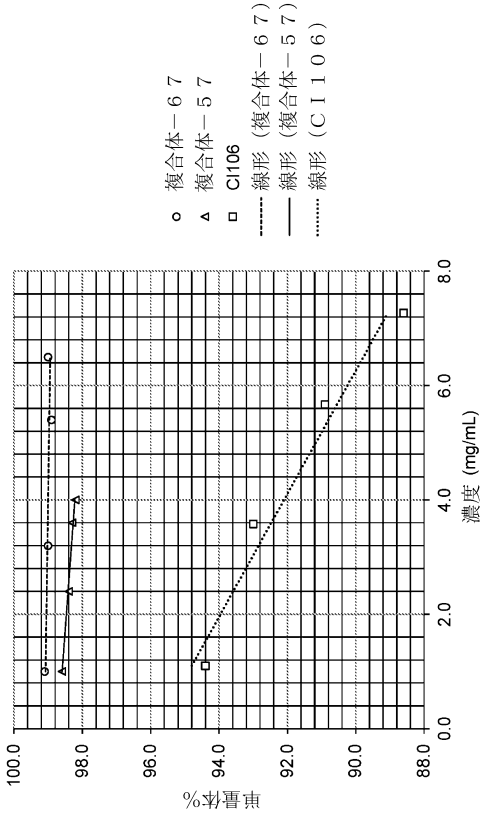
【図４】



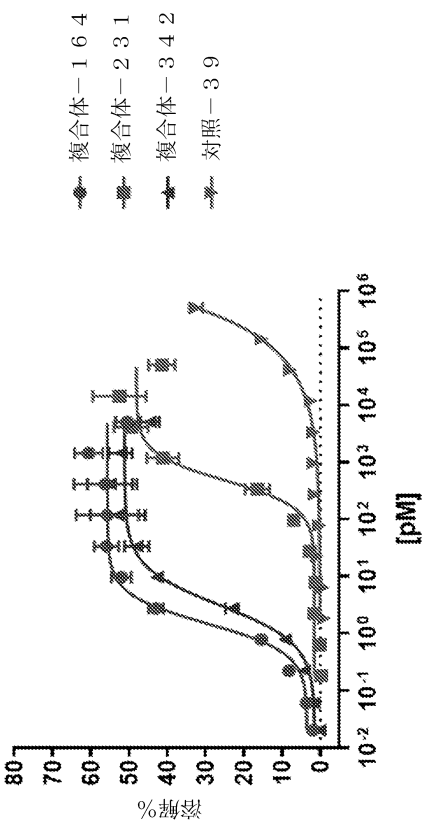
【図５】


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

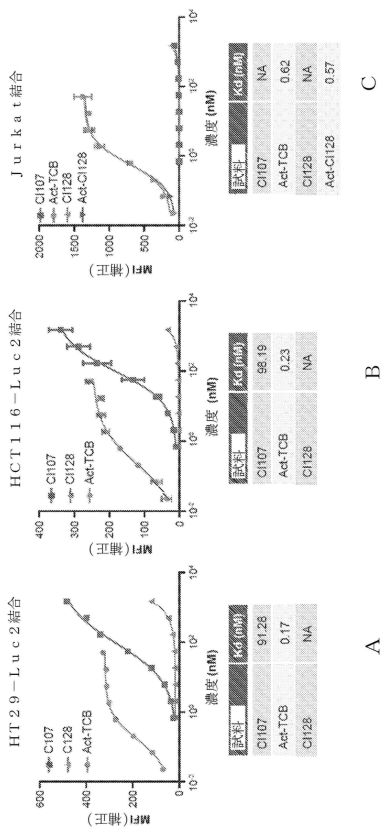
【図６】


複合体－６７
複合体－５７
Cl106
線形（複合体－６７）
線形（複合体－５７）
線形（Ｃｌ１０６）
単量体%
濃度 (mg/mL)

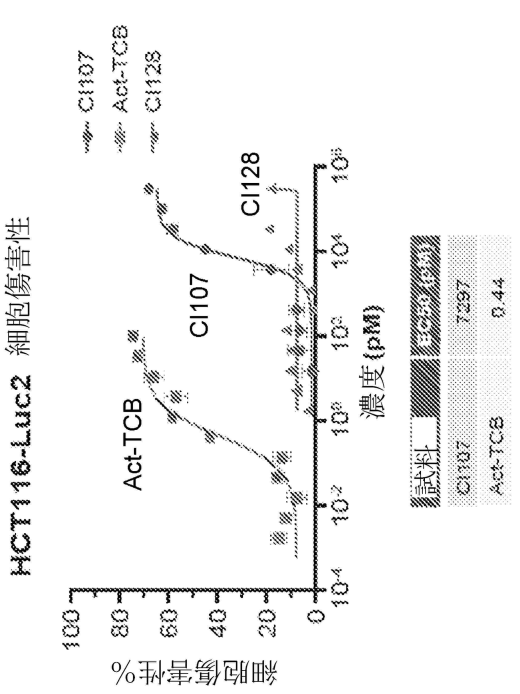
【図７】


複合体－１６４
複合体－２３１
複合体－３４２
対照－３９
溶解%
[pM]

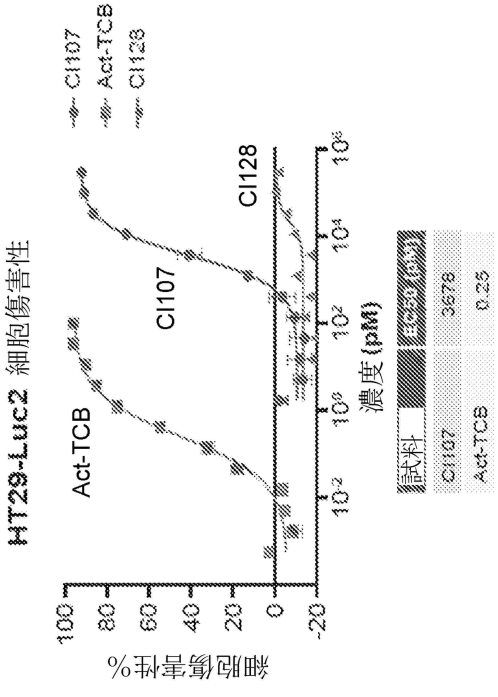
【図８】


A
HT29－Luc2結合
B
HCT116－Luc2結合
C
Jurkat結合
MFI（補正）
濃度 (nM)
試料
Kd (nM)
Cl107
Act-TCB
Cl128
Act-Cl128
91.28
0.17
98.19
0.23
NA
0.62
0.57

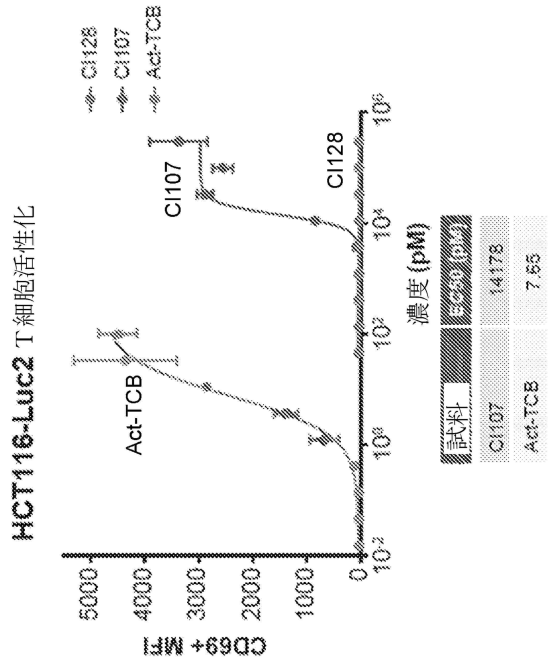
【図９Ａ】



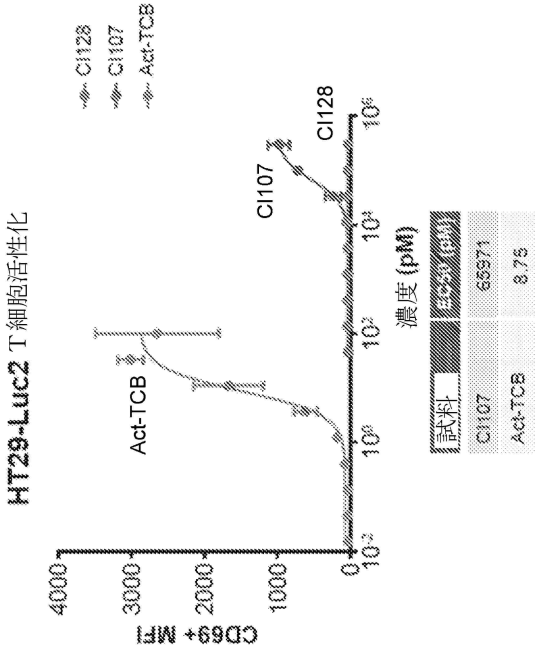
【図９Ｂ】



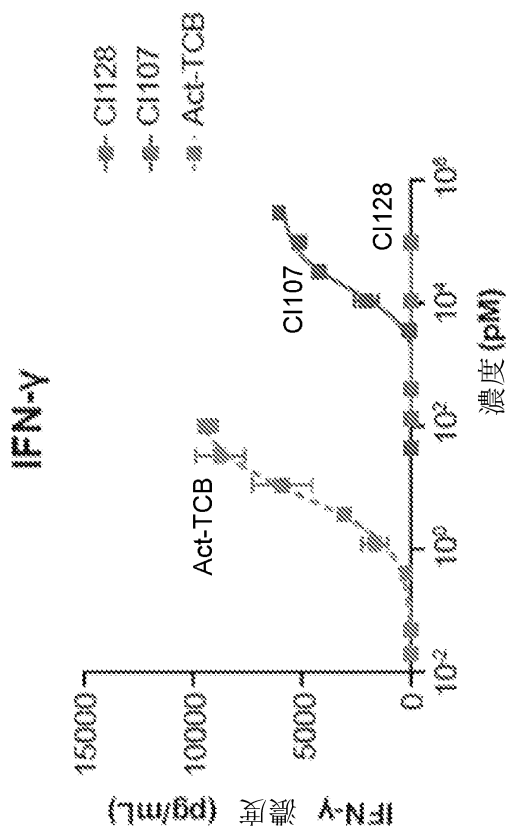
【図９Ｃ】



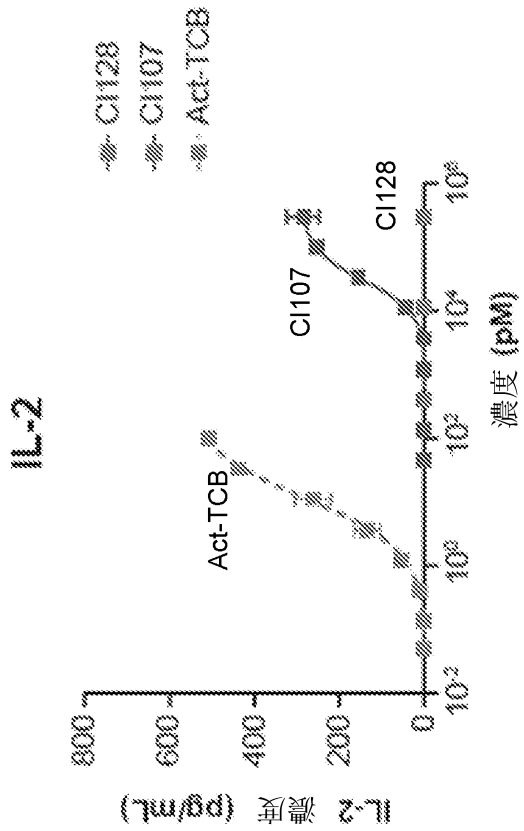
【図９Ｄ】



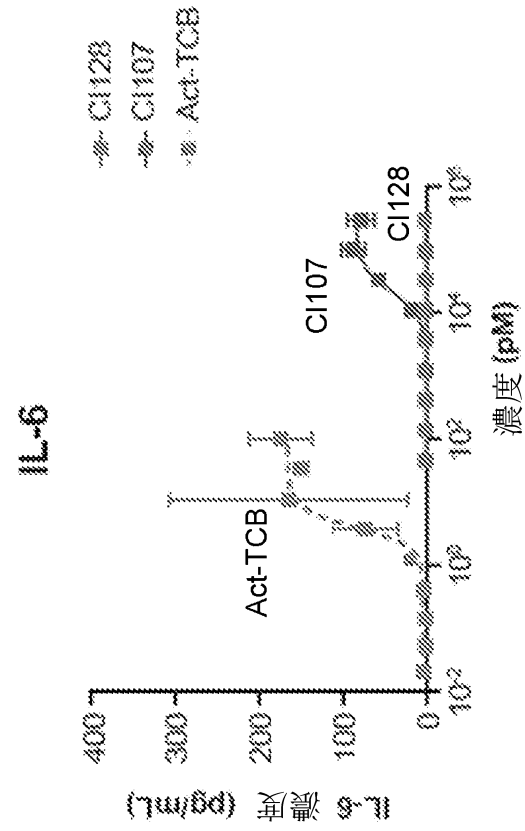
【図１０Ａ】



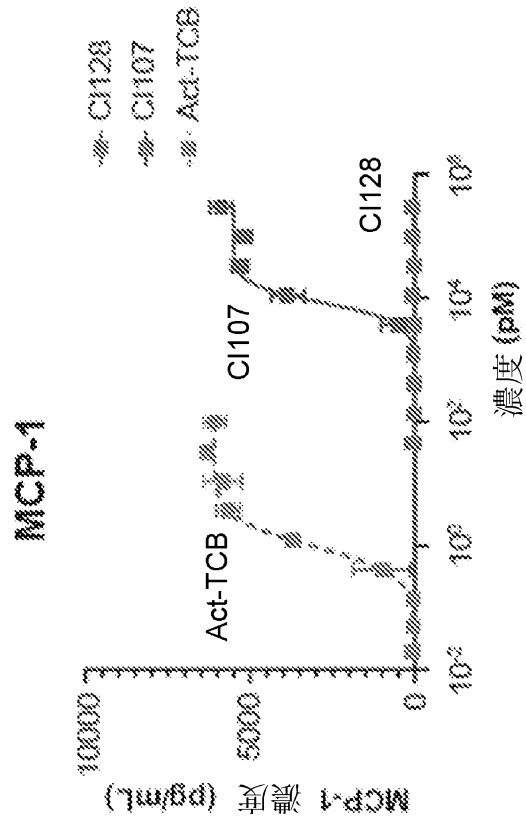
【図１０Ｂ】



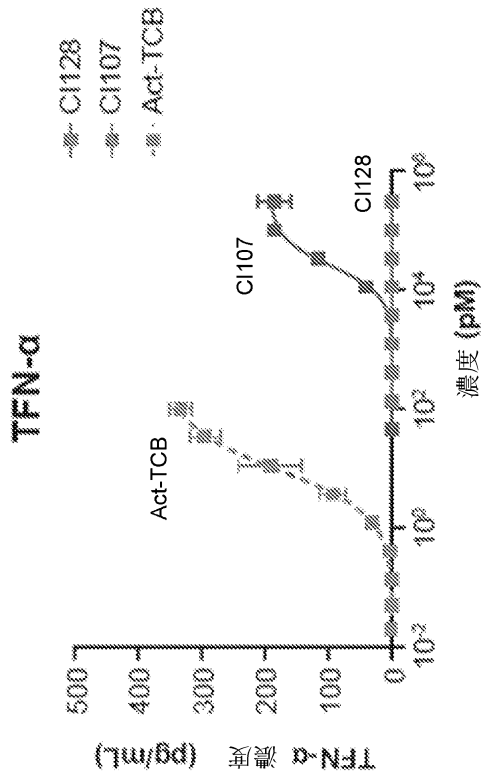
【図１０Ｃ】



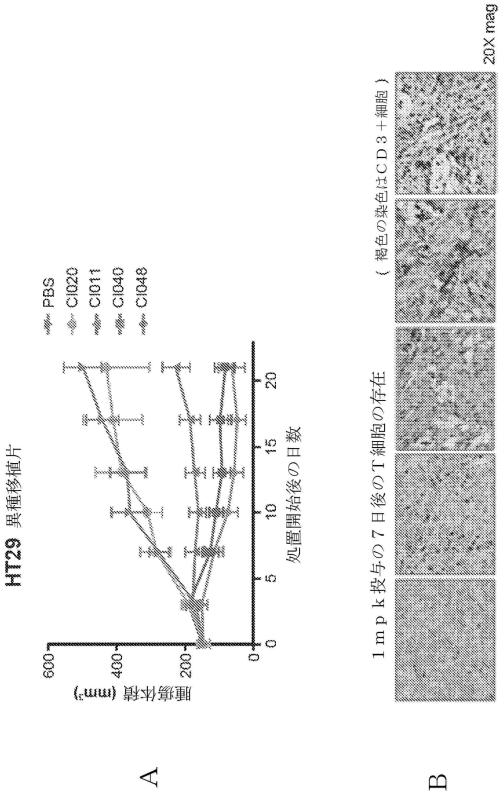
【図１０Ｄ】



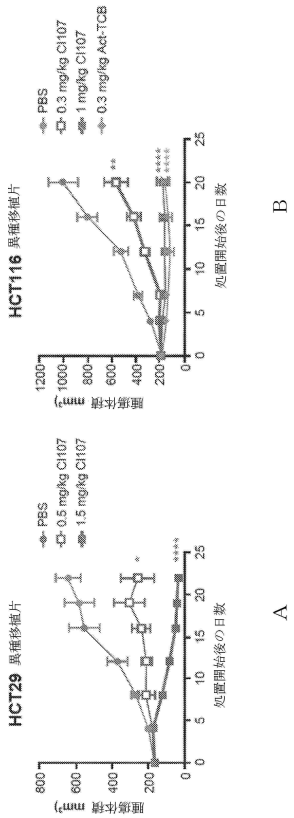
【図１０Ｅ】



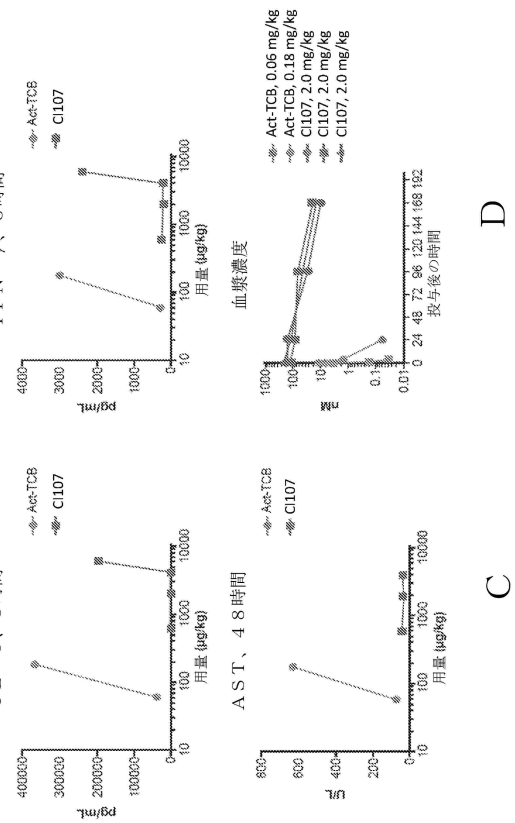
【図１１】



【図１２】



【図１３】



【配列表】
20245381410000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/078160

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

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/045110 A1 (XENCOR INC [US]) 8 March 2018 (2018-03-08)	54
Y	the whole document in particular, figure 2D and page 99	1-53
X	WO 2017/162587 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 28 September 2017 (2017-09-28)	54
Y	the whole document in particular, figure 1A	1-53
Y	WO 2019/075405 A1 (CYTOMX THERAPEUTICS INC [US]) 18 April 2019 (2019-04-18) cited in the application the whole document in particular, pages 2-3, 11, 44, 56-62 and 71-72	1-53

-/--

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

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/078160

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/035084 A1 (EPIMAB BIOTHERAPEUTICS INC [CN]) 22 February 2018 (2018-02-22) the whole document in particular, pages 3 and 27, figure 1A	1-53
Y	WO 2020/198661 A1 (ORIONIS BIOSCIENCES INC [US]; ORIONIS BIOSCIENCES BV [BE]) 1 October 2020 (2020-10-01) the whole document in particular, page 37 and SEQ ID NO:44	33
Y	WO 2019/077092 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 25 April 2019 (2019-04-25) the whole document in particular, page 46 and SEQ ID NO:65	34
A	PHILIP D. BARDWELL ET AL: "Potent and conditional redirected T cell killing of tumor cells using Half DVD-Ig", PROTEIN & CELL, vol. 9, no. 1, 5 June 2017 (2017-06-05), pages 121-129, XP055575472, Beijing, CN ISSN: 1674-800X, DOI: 10.1007/s13238-017-0429-z the whole document in particular, pages 122-125 and figure 2A	1-53
A	JOSHUA M. DONALDSON ET AL: "Design and development of masked therapeutic antibodies to limit off-target effects: Application to anti-EGFR antibodies", CANCER BIOLOGY & THERAPY, vol. 8, no. 22, 15 November 2009 (2009-11-15), XP055274198, US ISSN: 1538-4047, DOI: 10.4161/cbt.8.22.9765 the whole document in particular, pages 2145-2146 and figure 1	1-53
A	BUSHRA HUSAIN ET AL: "Expanding the Boundaries of Biotherapeutics with Bispecific Antibodies", BIODRUGS, vol. 32, no. 5, 21 August 2018 (2018-08-21), pages 441-464, XP055678494, NZ ISSN: 1173-8804, DOI: 10.1007/s40259-018-0299-9 the whole document	1-53

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/078160

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

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/078160

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018045110 A1	08-03-2018	NONE	
WO 2017162587 A1	28-09-2017	AR 107946 A1	28-06-2018
		AR 120543 A2	23-02-2022
		AU 2017237376 A1	02-08-2018
		BR 112018016281 A2	02-01-2019
		CA 3012422 A1	28-09-2017
		CN 108884170 A	23-11-2018
		CO 2018007556 A2	31-07-2018
		CR 20180453 A	05-12-2018
		EP 3433280 A1	30-01-2019
		KR 20180128407 A	03-12-2018
		PE 20181891 A1	11-12-2018
		SG 11201808085W A	30-10-2018
		WO 2017162587 A1	28-09-2017
WO 2019075405 A1	18-04-2019	AU 2018347607 A1	26-03-2020
		BR 112020007309 A2	29-09-2020
		CA 3078911 A1	18-04-2019
		CN 111247171 A	05-06-2020
		EP 3694885 A1	19-08-2020
		IL 273937 A	31-05-2020
		JP 2020536549 A	17-12-2020
		KR 20200064096 A	05-06-2020
		SG 11202002384V A	29-04-2020
		TW 201927816 A	16-07-2019
		US 2019135943 A1	09-05-2019
		WO 2019075405 A1	18-04-2019
WO 2018035084 A1	22-02-2018	AU 2017312974 A1	21-02-2019
		BR 112019002579 A2	21-05-2019
		CA 3032430 A1	22-02-2018
		CN 109803682 A	24-05-2019
		JP 7033328 B2	10-03-2022
		JP 2019533985 A	28-11-2019
		RU 2019103230 A	18-09-2020
		TW 201808999 A	16-03-2018
		US 2019177439 A1	13-06-2019
		WO 2018035084 A1	22-02-2018
WO 2020198661 A1	01-10-2020	CA 3133647 A1	01-10-2020
		CN 113645987 A	12-11-2021
		EP 3946408 A1	09-02-2022
		JP 2022529892 A	27-06-2022
		US 2022177550 A1	09-06-2022
		WO 2020198661 A1	01-10-2020
WO 2019077092 A1	25-04-2019	AU 2018353420 A1	16-04-2020
		BR 112020007154 A2	29-09-2020
		CA 3078157 A1	25-04-2019
		CN 111246885 A	05-06-2020
		EP 3697441 A1	26-08-2020
		IL 273849 A	31-05-2020
		JP 2021500348 A	07-01-2021
		KR 20200067197 A	11-06-2020
		TW 201932142 A	16-08-2019
		US 2020392253 A1	17-12-2020
		WO 2019077092 A1	25-04-2019

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2022/078160

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date

フロントページの続き

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

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

弁理士　小田 直

(74)代理人　100202751
弁理士　岩堀 明代

(74)代理人　100208580
弁理士　三好 玲奈

(74)代理人　100191086
弁理士　高橋 香元

(72)発明者　ブースタニー，レイラ エム．
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サン フランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード，シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド内

(72)発明者　ペイドフンガット，マダン エム．
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サン フランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード，シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド内

(72)発明者　フォックス，エレイン アン マリアーノ
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サン フランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード，シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド内

(72)発明者　ミトラ，サヤンタン
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サン フランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード，シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド内

(72)発明者　カバナー，ダブリュー．マイケル
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サン フランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード，シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド内

(72)発明者　ブリアンテ，ラファエラ
アメリカ合衆国，カリフォルニア州 ９４０８０，サウス サン フランシスコ，スイート ４００，１５１ オイスター ポイント ブールバード，シートムエックス セラピューティクス，インコーポレイテッド内

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

Fターム（参考） 4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C085 AA16 BB01 BB11
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 FA72 FA74