

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-512953

(P2025-512953A)

(43)公表日 令和7年4月22日(2025.4.22)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	Z N A 4 C 0 7 6
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全70頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-559145(P2024-559145)	(71)出願人	391008951 アストラゼネカ・アクチエボラゲ ASTRAZENECA AKTIEB OLAG スウェーデン国エスエー - 1 5 1 8 5 セーデルテイエ
(86)(22)出願日	令和5年4月6日(2023.4.6)	(74)代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(85)翻訳文提出日	令和6年10月4日(2024.10.4)	(74)代理人	100138911 弁理士 櫻井 陽子
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/059278	(72)発明者	コボルド, マーク アメリカ合衆国 1 9 8 5 0 - 5 4 3 7 デ ラウェア州ウィルミントン、コンコード ・パイク 1 8 0 0、ピー・オー・ボック ス 1 5 4 3 7、アストラゼネカ・ファー
(87)国際公開番号	WO2023/198635		
(87)国際公開日	令和5年10月19日(2023.10.19)		
(31)優先権主張番号	63/329,583		
(32)優先日	令和4年4月11日(2022.4.11)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP( AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES, FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T細胞結合タンパク質

(57)【要約】

本開示は、一般に、抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を含む結合タンパク質に関する。また、本開示は、そのような結合タンパク質を含む組成物及びそのような結合タンパク質をコードする核酸分子を提供する。本開示はさらに、そのような結合タンパク質を用いて障害又は症状を処置する方法に関する。

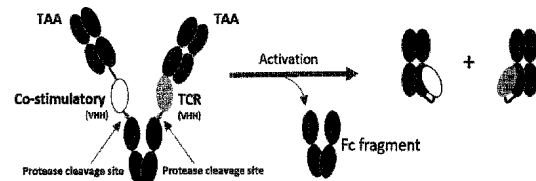


Fig. 1

## 【特許請求の範囲】

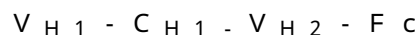
## 【請求項 1】

2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、第1及び第2のポリペプチド鎖が、式：



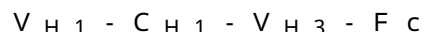
によって表される構造を有し；

第3のポリペプチド鎖が、式：



によって表される構造を有し；

第4のポリペプチド鎖が、式：



によって表される構造を有し；

$V_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり；

$V_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり；

$C_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり；

$C_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン $C_{H1}$ 重鎖定常ドメインであり；

$V_{H2}$ は、T細胞受容体に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；

$V_{H3}$ は、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；

$F_c$ は、 $C_{H2}$ 及び $C_{H3}$ 免疫グロブリン重鎖定常ドメインである、結合タンパク質。

10

20

## 【請求項 2】

前記第3のポリペプチド鎖上の $C_{H1}$ と $V_{H2}$ との間に位置するリンカー、 $L_1$ 及び前記第3のポリペプチド鎖上の $V_{H2}$ と前記 $F_c$ との間に位置するリンカー、 $L_2$ をさらに含み、 $L_1$ 及び $L_2$ は各々独立してリンカーであるか、又は不在である、請求項1に記載の結合タンパク質。

## 【請求項 3】

前記第4のポリペプチド鎖上の $C_{H1}$ と $V_{H3}$ との間に位置するリンカー、 $L_3$ 及び前記第4のポリペプチド鎖上の $V_{H3}$ と $F_c$ との間に位置するリンカー、 $L_4$ をさらに含み、 $L_3$ 及び $L_4$ は各々独立してリンカーであるか、又は不在である、請求項1又は2に記載の結合タンパク質。

30

## 【請求項 4】

前記第3のポリペプチド鎖上の $C_{H1}$ と $V_{H2}$ との間に位置する免疫グロブリンヒンジ領域、 $H_1$ 及び前記第3のポリペプチド鎖上の $V_{H2}$ と前記 $F_c$ との間に位置する免疫グロブリンヒンジ領域、 $H_2$ をさらに含み、 $H_1$ 及び $H_2$ は各々独立して免疫グロブリンヒンジ領域であるか、又は不在である、請求項1～3のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

## 【請求項 5】

前記第4のポリペプチド鎖上の $C_{H1}$ と $V_{H3}$ との間に位置する免疫グロブリンヒンジ領域、 $H_3$ 及び前記第4のポリペプチド鎖上の $V_{H3}$ と前記 $F_c$ との間に位置する免疫グロブリンヒンジ領域、 $H_4$ をさらに含み、 $H_3$ 及び $H_4$ は各々独立して免疫グロブリンヒンジ領域であるか、又は不在である、請求項1～4のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

40

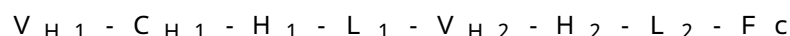
## 【請求項 6】

前記第1及び第2のポリペプチド鎖は、式：



によって表される構造を有し、

第3のポリペプチド鎖は、式：



50

によって表される構造を有し、

第4のポリペプチド鎖は、式：

$V_{H1} - C_{H1} - H_3 - L_3 - V_{H3} - H_4 - L_4 - F_c$  によって表される構造を有する、  
請求項1～5のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項7】

前記  $F_c$  は、IgG抗体由来である、請求項1～6のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項8】

前記結合タンパク質は、前記抗原結合部位の一方又は双方にて腫瘍関連抗原に結合した場合にのみ、T細胞を活性化する、請求項1～7のいずれか一項に記載の結合タンパク質

10

【請求項9】

前記腫瘍関連抗原はCD20である、請求項1～8のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項10】

前記T細胞共刺激分子は、CD8又はCD137である、請求項1～9のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項11】

2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、2つのポリペプチド鎖が、式：

20

$V_L - C_L$

によって表される構造を有し、

2つのポリペプチド鎖が、式：

$I I_1 - V_{H1} - C_{H1} - V_{H2} - F_c - I I_2$

によって表される構造を有し：

$V_L$  は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり；

$V_{H1}$  は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり；

$C_L$  は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり；

$C_{H1}$  は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン  $C_{H1}$  重鎖定常ドメインで

30

あり；

$V_{H2}$  は、T細胞受容体に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；

$F_c$  は、 $C_{H2}$  及び  $C_{H3}$  免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；

$I I_1$  及び  $I I_2$  は各々、独立して、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインであるか、又は不在であり；

$I I_1$  及び  $I I_2$  の少なくとも1つが、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインである、  
結合タンパク質。

【請求項12】

2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、2つのポリペプチド鎖が、式：

40

$I I_1 - V_L - C_L - I I_2$

によって表される構造を有し；

2つのポリペプチド鎖が、式：

$V_{H1} - C_{H1} - V_{H2} - F_c$

によって表される構造を有し：

$V_L$  は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり；

$V_{H1}$  は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり；

$C_L$  は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり；

50

C<sub>H1</sub>は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリンC<sub>H1</sub>重鎖定常ドメインであり；

V<sub>H2</sub>は、T細胞受容体に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；

F<sub>C</sub>は、C<sub>H2</sub>及びC<sub>H3</sub>免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；

I<sub>I1</sub>及びI<sub>I2</sub>は各々、独立して、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインであるか、又は不在であり；

I<sub>I1</sub>及びI<sub>I2</sub>の少なくとも1つが、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインである、結合タンパク質。

【請求項13】

2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する3つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、第1のポリペプチド鎖が、式：

V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>

によって表される構造を有し、

第2のポリペプチド鎖が、式：

V<sub>H1</sub>-C<sub>H1</sub>-V<sub>H2</sub>-F<sub>C</sub>

によって表される構造を有し、

第3のポリペプチド鎖が、式：

V<sub>H1</sub>-V<sub>H3</sub>-F<sub>C</sub>

によって表される構造を有し；

V<sub>L</sub>は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり；

V<sub>H1</sub>は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり；

C<sub>L</sub>は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり；

C<sub>H1</sub>は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリンC<sub>H1</sub>重鎖定常ドメインであり；

V<sub>H2</sub>は、T細胞受容体に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；

V<sub>H3</sub>は、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；

F<sub>C</sub>は、C<sub>H2</sub>及びC<sub>H3</sub>免疫グロブリン重鎖定常ドメインである、

結合タンパク質。

【請求項14】

前記結合タンパク質は、前記抗原結合部位の一方又は双方にて腫瘍関連抗原に結合した場合にのみ、T細胞を活性化する、請求項11～13のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項15】

前記腫瘍関連抗原はCD20である、請求項11～14のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項16】

前記T細胞共刺激分子は、CD8又はCD137である、請求項11～15のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項17】

2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であり、前記ポリペプチド鎖は

(a) 配列番号1、配列番号2、及び配列番号3の配列のアミノ酸；

(b) 配列番号1、配列番号2、及び配列番号4の配列のアミノ酸；

(c) 配列番号1、配列番号9、及び配列番号10の配列のアミノ酸；

(d) 配列番号1、配列番号11、及び配列番号12の配列のアミノ酸；

(e) 配列番号1、配列番号13、及び配列番号14の配列のアミノ酸；

(f) 配列番号1及び配列番号19の配列のアミノ酸；

(g) 配列番号1、配列番号22、及び配列番号23の配列のアミノ酸；

10

20

30

40

50

- (h) 配列番号 29 及び配列番号 30 の配列のアミノ酸；
- (i) 配列番号 31 及び配列番号 32 の配列のアミノ酸；
- (j) 配列番号 33 及び配列番号 34 の配列のアミノ酸；
- (k) 配列番号 35 及び配列番号 36 の配列のアミノ酸；
- (l) 配列番号 37 及び配列番号 38 の配列のアミノ酸；
- (m) 配列番号 39 及び配列番号 40 の配列のアミノ酸；
- (n) 配列番号 41 及び配列番号 42 の配列のアミノ酸；又は
- (o) 配列番号 45 及び配列番号 54 の配列のアミノ酸

を含む、結合タンパク質。

【請求項 18】

2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する3つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、前記ポリペプチド鎖は、配列番号43、配列番号44、及び配列番号45の配列のアミノ酸、又は(q)配列番号1、配列番号11、及び配列番号12の配列のアミノ酸を含む、結合タンパク質。

10

【請求項 19】

請求項1～18のいずれか一項に記載の結合タンパク質、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 20】

請求項17又は18に記載の結合タンパク質をコードする単離核酸配列。

【請求項 21】

請求項20に記載の単離核酸配列を含むベクター。

20

【請求項 22】

癌の処置を必要とする対象に、請求項1～18のいずれか一項に記載の結合タンパク質の有効な量を投与することを含む、癌を処置する方法。

【請求項 23】

前記結合タンパク質は、前記対象においてT細胞のサブセットを優先的に活性化する、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

T細胞の前記サブセットはCD8<sup>+</sup>T細胞である、請求項22又は23に記載の方法。

【請求項 25】

前記CD8<sup>+</sup>T細胞は、CD4<sup>+</sup>T細胞と比較して、優先的に活性化される、請求項22～24のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 26】

T細胞の前記活性化は、表面CD25<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージを測定することによって判定される、請求項23に記載の方法。

【請求項 27】

CD8<sup>+</sup>T細胞である表面CD25<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージは、CD4<sup>+</sup>T細胞である表面CD25<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージよりも高い、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

炎症性疾患の処置を必要とする対象に、請求項1～18のいずれか一項に記載の結合タンパク質の有効な量を投与することを含む、炎症性疾患を処置する方法。

40

【請求項 29】

薬剤として用いられる、請求項1～18のいずれか一項に記載の結合タンパク質、又は請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項 30】

癌の処置に用いられる、請求項1～18のいずれか一項に記載の結合タンパク質、又は請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

炎症性疾患の処置に用いられる、請求項1～18のいずれか一項に記載の結合タンパク質、又は請求項19に記載の医薬組成物。

50

## 【請求項 3 2】

癌の処置に用いられる医薬の製造における、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質、又は請求項 1 9 に記載の医薬組成物の使用。

## 【請求項 3 3】

炎症性疾患の処置に用いられる医薬の製造における、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質、又は請求項 1 9 に記載の医薬組成物の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年4月11日出願の米国仮特許出願第63/329,583号明細書の優先権を主張するものであり、この仮特許出願の内容は参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

本開示は、一般に、抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を含む結合タンパク質に関する。また、本開示は、そのような結合タンパク質を含む組成物及びそのような結合タンパク質をコードする核酸分子を提供する。本開示はさらに、そのような結合タンパク質を用いて障害又は症状を処置する方法に関する。

## 【0003】

配列表の記載

配列表のコンピュータ可読形態が、電子提出によって本出願と共に提出されており、その全体が参照により本出願に組み込まれる。配列表は、2023年3月14日作成のファイル名「21-0750-WO.xml」のファイルに含まれており、サイズは71,648バイトである。

## 【背景技術】

## 【0004】

腫瘍細胞を破壊するためのT細胞細胞毒性活性の補充は、癌についての価値があるが複雑な処置戦略である。癌治療薬としてのCD3ベースの二重特異性T細胞エンゲージャ(TCE)の開発が、過去30年間、進行中である。TCEは、T細胞上の腫瘍関連抗原(TAA)及び分化抗原群3(CD3)に同時に結合して、T細胞受容体(TCR)非依存性人工免疫シナプスを形成し、これは、ヒト白血球抗原(HLA)制限を回避し、且つT細胞活性化及び腫瘍細胞の細胞溶解を誘導する。

## 【0005】

TCEの第一世代は、単純な二重特異性T細胞エンゲージャ(BiTE)であり、これは、強いCD3結合アーム及びTAA結合ドメインを含む2つのタンデム単鎖可変フラグメント(scFv)で構成される。現在まで、食品医薬品局が認可した1つのBiTEであるプリナツモマブしかなく、これは、CD3(Orthoclone OKT3抗体を用いる)及び分化抗原群19(CD19)を標的とする。BiTEの開発中に観察された強いインビトロ細胞溶解活性は、癌を処置するための潜在的な使用に基づいて、興奮をもたらした。しかしながら、クリニックにおいて観察される予期しない高サイトカイン放出症候群(CRS)が、その興奮を幾分抑えた(非特許文献1)。BiTEフォーマットの別の観察される不利点は、非常に短い半減期を示し、且つ製造容易性が不十分であるということである(非特許文献2)。

## 【0006】

TCEの第二世代は、フラグメント結晶化可能(Fc)ドメインを含み、これは、半減期延長、及びFc受容体(FcR)結合を除去するための変異を付与するように修飾され得、製造容易性の向上を示す(非特許文献3)。それでもやはり、それらの分子は依然として、クリニックにおける神経毒性及びCRSの誘導に繋がる高親和性CD3結合ドメインを含む。より最近の努力は、強力なT細胞活性化を維持しながら関連サイトカイン放出をかなり引き下げることが期待して、親和性が引き下げられたCD3結合ドメインを開発

10

20

30

40

50

することに集中している（非特許文献4）。

【0007】

重要なことに、CD3ベースのBiTE及び新規の免疫グロブリンG(IgG)フォーマットCEは双方とも、分化抗原群4(CD4)及び分化抗原群8(CD8)T細胞の双方に結合してこれらを活性化して、好適でないT細胞、例えば制御性T細胞(Treg)に潜在的に係合し、CD8 T細胞の細胞溶解活性を潜在的に低下させることが示されている（非特許文献5）。

【0008】

T細胞エンゲージャ分子が見込みを示す一方、治療アプローチは現在まで課題に直面してきた。活性が増大し、且つオフターゲット効果が引き下げられたT細胞結合タンパク質の向上が、当該技術分野において必要とされている。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Teachey et al., "Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy," Blood 121:5154-57(2013)

【非特許文献2】Ellerman, "Bispecific T cell engagers: Towards understanding variables influencing the in vitro potency and tumor selectivity and their modulation to enhance their efficacy and safety," Methods 154:102-17(2019)

20

【非特許文献3】Vafa et al., "Perspective: Designing T cell Engagers With Better Therapeutic Windows," Front Oncol. 10:446(2020)

【非特許文献4】Trinklein et al., "Efficient tumor killing and minimal cytokine release with novel T cell agonist bispecific antibodies," MAbs 11:639-52(2019)

30

【非特許文献5】Duell et al., "Frequency of regulatory T cells determines the outcome of the T cell-engaging antibody blinatumomab in patients with B-precursor ALL," Leukemia 31:2181-90(2017)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本開示は、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を提供し、第1及び第2のポリペプチド鎖は、式： $V_L - C_L$ によって表される構造を有し；第3のポリペプチド鎖は、式： $V_{H1} - C_{H1} - V_{H2} - Fc$ によって表される構造を有し；第4のポリペプチド鎖は、式： $V_{H1} - C_{H1} - V_{H3} - Fc$ によって表される構造を有し； $V_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり； $V_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり； $C_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり； $C_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン $C_{H1}$ 重鎖定常ドメインであり； $V_{H2}$ は、T細胞受容体に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり； $V_{H3}$ は、T細胞共刺激分子に特

40

50

異的に結合する重鎖可変ドメインであり；Fcは、 $C_{H2}$ 及び $C_{H3}$ 免疫グロブリン重鎖定常ドメインである。

【0011】

また、本明細書中で提供されるのは、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であり、2つのポリペプチド鎖は、式： $V_L - C_L$ によって表される構造を有し、2つのポリペプチド鎖は、式： $I I_1 - V_{H1} - C_{H1} - V_{H2} - Fc - I I_2$ によって表される構造を有し； $V_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり； $V_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり； $C_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり； $C_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン $C_{H1}$ 重鎖定常ドメインであり； $V_{H2}$ は、T細胞受容体に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；Fcは、 $C_{H2}$ 及び $C_{H3}$ 免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり； $I I_1$ 及び $I I_2$ は各々、独立して、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインであるか、又は不在であり； $I I_1$ 及び $I I_2$ の少なくとも1つが、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインである。

10

【0012】

また、本明細書中で提供されるのは、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であり、2つのポリペプチド鎖は、式： $I I_1 - V_L - C_L - I I_2$ によって表される構造を有し；2つのポリペプチド鎖は、式： $V_{H1} - C_{H1} - V_{H2} - Fc$ によって表される構造を有し； $V_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり； $V_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり； $C_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり； $C_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン $C_{H1}$ 重鎖定常ドメインであり； $V_{H2}$ は、T細胞受容体に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；Fcは、 $C_{H2}$ 及び $C_{H3}$ 免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり； $I I_1$ 及び $I I_2$ は各々、独立して、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインであるか、又は不在であり； $I I_1$ 及び $I I_2$ の少なくとも1つが、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインである。

20

30

【0013】

また、本明細書中で提供されるのは、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する3つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であり、第1のポリペプチド鎖は、式： $V_L - C_L$ によって表される構造を有し；第2のポリペプチド鎖は、式： $V_{H1} - C_{H1} - V_{H2} - Fc$ によって表される構造を有し；第3のポリペプチド鎖は、式： $V_{H1} - V_{H3} - Fc$ によって表される構造を有し； $V_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり； $V_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり； $C_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり； $C_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン $C_{H1}$ 重鎖定常ドメインであり； $V_{H2}$ は、T細胞受容体に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり； $V_{H3}$ は、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；Fcは、 $C_{H2}$ 及び $C_{H3}$ 免疫グロブリン重鎖定常ドメインである。

40

【0014】

また、本明細書中で提供されるのは、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であり、ポリペプチド鎖は、(a)配列番号1、配列番号2、及び配列番号3の配列のアミノ酸；(b)配列番号1、配列番号2、及び配列番号4の配列のアミノ酸；(c)配列番号1、配列番号9、及び配列番号10の配列のアミノ酸；(d)配列番号1、配列番号11、及び配列番号12の配列のアミノ酸；(e)配列番号1、配列番号13、及び

50

配列番号 14 の配列のアミノ酸；(f) 配列番号 1 及び配列番号 19 の配列のアミノ酸；(g) 配列番号 1、配列番号 22、及び配列番号 23 の配列のアミノ酸；(h) 配列番号 29 及び配列番号 30 の配列のアミノ酸；(i) 配列番号 31 及び配列番号 32 の配列のアミノ酸；(j) 配列番号 33 及び配列番号 34 の配列のアミノ酸；(k) 配列番号 35 及び配列番号 36 の配列のアミノ酸；(l) 配列番号 37 及び配列番号 38 の配列のアミノ酸；(m) 配列番号 39 及び配列番号 40 の配列のアミノ酸；(n) 配列番号 41 及び配列番号 42 の配列のアミノ酸；又は (o) 配列番号 45 及び配列番号 54 の配列のアミノ酸を含む。

【0015】

また、本明細書中で提供されるのは、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する3つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であり、ポリペプチド鎖は、(p) 配列番号 43、配列番号 44、及び配列番号 45 の配列のアミノ酸、又は (q) 配列番号 1、配列番号 11、及び配列番号 12 の配列のアミノ酸を含む。

【0016】

添付の図面は、本開示の方法及び組成物の更なる理解を実現するために含まれており、本開示に組み込まれ、本開示の一部を構成する。図面は、本開示の1つ以上の態様を説明し、明細書と一緒に本開示の原理及び動作を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、腫瘍関連抗原(TAA)への2つの結合部位、T細胞上のT細胞受容体(TCR)への1つの結合部位、及びT細胞共刺激分子への1つの結合部位を含む本開示の代表的な結合タンパク質フォーマットを説明する。示す部位での腫瘍特異的プロテアーゼによる切断直後に、Fcドメインが放出されて、TCR結合及び共刺激受容体の活性化によりT細胞が活性化される。

【図2A - 2B】図2A ~ 2Bは、異なるインビトロアッセイで評価した結合タンパク質の構造を示す。図2Aは、プロテアーゼ切断部位を含むMCAZ 6.9結合タンパク質を説明する。図2Bは、プロテアーゼ切断部位を含むMCAZ 6.10結合タンパク質を説明する。

【図3A - 3B】図3A ~ 3Cは、CD20 + B細胞株に対するMCAZ 6.9及びMCAZ 6.10結合タンパク質インビトロ細胞溶解の評価を示す線グラフを示す。MCAZ 6.9及びMCAZ 6.10の双方のEC50を、細胞株毎に示す。図3Aは、Dauidi細胞及び精製pan T細胞を用いた細胞溶解評価を説明する。図3Bは、Ramoss細胞及び精製pan T細胞を用いた細胞溶解評価を説明する。図3Cは、Rajic細胞及びPBMCを用いた細胞溶解評価を説明する。

【図3C】同上。

【図4A - 4B】図4A ~ 4Bは、CD4及びCD8 T細胞活性化プロファイルを分析する手段としてDauidi細胞を用いた表面CD25 + 細胞のパーセンテージを示す線グラフを示す。図4Aは、MCAZ 6.9結合タンパク質による結果を示す。図4Bは、MCAZ 6.10結合タンパク質による結果を示す。

【図5A - 5B】図5A ~ 5Bは、Ramoss細胞を用いた表面CD25 + 細胞のパーセンテージを示す線グラフを示す。CD25 + 評価を、CD4及びCD8 T細胞活性化プロファイルを分析する手段として用いる。図5Aは、MCAZ 6.9結合タンパク質による結果を示す。図5Bは、MCAZ 6.10結合タンパク質による結果を示す。

【図6】図6は、CD4及びCD8 T細胞活性化プロファイルを分析する手段としてRajic細胞を用いた、表面CD25 + 細胞のパーセンテージを示す線グラフを示す。

【図7A - 7C】図7A ~ 7Cは、CD20 T細胞MCAZ 88結合タンパク質によって誘導されたインビトロ細胞溶解及びT細胞活性化プロファイルを示す。図7Aは、MCAZ 88結合タンパク質の代表的な構造を示す。図7Bは、Rajic細胞株(CD20 +、細胞あたり85371抗原)に対して評価したMCAZ 88誘導細胞溶解を示す

10

20

30

40

50

。図7Cは、表面CD25+細胞の%を測定することによって評価したCD4及びCD8 T細胞活性化プロファイルを示す。

【図8A】図8Aは、MCAZ 7.5及びMCAZ 89の概略図である。

【図8B-8C】図8B~8Cは、CD25+の状況を検出するフローサイトメトリによって評価した、溶液中の非特異的CD4及びCD8 T細胞活性化を説明する棒グラフを示す。凡例において上から下に示す結合タンパク質を、x軸に沿って左から右に示す。図8Bは、非特異的CD8活性化を示す。図8Cは、非特異的CD4活性化を示す。

【図9A-9B】図9A~9Bは、CD25+の表面発現を検出するフローサイトメトリによって評価した、プレート吸着抗体における非特異的CD8及びCD4 T細胞活性化を説明する棒グラフを示す。図9Aは、非特異的CD8活性化を示す。凡例において上から下に示す結合タンパク質を、x軸に沿って左から右に示す。図9Bは、非特異的CD4活性化を示す。凡例において上から下に示す結合タンパク質を、x軸に沿って左から右に示す。

10

【図10A-10C】図10A~10Eは、非開裂結合タンパク質によって誘導されたインビトロ細胞溶解及びT細胞活性化プロファイルを示す。図10Aは、MCAZ 7.1結合タンパク質の構造を示す。図10Bは、MCAZ 10.3結合タンパク質の構造を示す。図10Cは、CD20+B細胞株Tolledo、Oci-LY18、及びSU-DHL5（細胞あたりそれぞれ12420、20244、及び27152 CD20抗原を発現）に対する細胞溶解を評価したことを示す。図10Dは、細胞株毎のMCAZ 7.1細胞溶解EC50値を示す。図10Eは、CD25発現細胞%として評価したCD4及びCD8 T細胞活性化を示す。

20

【図10D-10E】同上。

【図11A-11H】図11A~11Hは、リンカー長が修飾された結合タンパク質によって誘導されるインビトロ細胞溶解、特異的及び非特異的T細胞活性化プロファイルを示す。図11Aは、CD20結合ドメインとTCR結合ドメインとの間に追加のリンカーを含むMCAZ 7.7結合タンパク質の構造を示す。図11Bは、CD20+Raji B細胞株（細胞あたり85000 CD20抗原を発現）に対する細胞溶解を評価したことを示す。図11Cは、CD25発現細胞%として評価したCD4及びCD8 T細胞活性化プロファイルを示す。図11Dは、結合タンパク質をプレート結合させて、1.5e5精製T細胞を、腫瘍細胞及び関連プロテアーゼの不在下で加えたことを示す。非特異的CD8及びCD4 T細胞活性化レベルを、フローサイトメトリによって、CD69+/CD25+表面発現%として評価した。図11Eは、切断型リンカーの除去に加えた、TGG5（配列番号46）リンカー及びHAタグの除去によって、CD8アームがよりリジッドなMCAZ 10.1結合タンパク質の構造を示す。図11Fは、OCI-LY18 B細胞株に対する細胞溶解を評価したことを示す。B細胞株をCTV染色して、PBMCを5:1のE:T比にて3日間インキュベートした。細胞溶解%を、フローサイトメトリによって測定した。図11Gは、CD8及びCD4 T細胞活性化プロファイルを、CD25細胞発現%として評価したことを示す。図11Hは、CD8及びCD4 T細胞活性化プロファイルを、CD25細胞発現%として評価したことを示す。

30

【図11C-11D】同上。

40

【図11E-11F】同上。

【図11G-11H】同上。

【図12A-12C】図12A~12Eは、結合タンパク質に及ぼすCD8位置決めの影響の評価を示す。図12Aは、MCAZ 8.71結合タンパク質の構造を示す。図12Bは、MCAZ 8.81結合タンパク質の構造を示す。図12Cは、CD20+B Raji細胞株（細胞あたり85000 CD20抗原を発現）に対する細胞溶解を評価したことを示す。図12Dは、細胞株毎の細胞溶解EC50値を示す。図12Eは、CD25発現細胞%として評価したCD4及びCD8 T細胞活性化プロファイルを示す。

【図12D-12E】同上。

【図13A-13C】図13A~13Eは、TCR VHH及びCD8 VHH二重特異

50

性結合タンパク質の評価を示す。図13Aは、MCAZ 8.69結合タンパク質の構造を示す。図13Bは、MCAZ 8.70結合タンパク質の構造を示す。図13Cは、CD20+B Raji細胞株(細胞あたり85000 CD20抗原を発現)に対して評価した細胞溶解を示す。図13Dは、細胞株毎の細胞溶解EC50値を示す。図13Eは、CD25発現細胞%として評価したCD4及びCD8 T細胞活性化プロファイルを示す。

【図13D-13E】同上。

【図14A-14B】図14Aは、種々の結合タンパク質についての非特異的T細胞活性化評価を示す。様々な濃度の結合タンパク質をプレート結合させて、 $1.5 \times 10^5$ 精製T細胞を、腫瘍細胞及び関連プロテアーゼの不在下で加えた。48時間のインキュベーション後、非特異的CD8 T細胞活性化レベルを、CD69+/CD25+表面発現%としてフローサイトメトリによって評価した。図14Bは、種々の結合タンパク質についての非特異的T細胞活性化評価を示す。様々な濃度の結合タンパク質をプレート結合させて、 $1.5 \times 10^5$ 精製T細胞を、腫瘍細胞及び関連プロテアーゼの不在下で加えた。48時間のインキュベーション後、CD4 T細胞活性化レベルを、CD69+/CD25+表面発現%としてフローサイトメトリによって評価した。

10

【図15A】図15Aは、Fc領域が異なるMCAZ 8.71結合タンパク質の概略図である。

【図15B-15D】図15Bは、5:1のE:T比のPBMCによる、OCI-Ly18 B細胞株に対する72時間目の結合タンパク質の細胞溶解活性を示す。図15Cは、表面CD25+ T細胞の%を測定することによって評価したCD8及びCD4 T細胞の活性化プロファイルを示す。図15Dは、表面CD25+ T細胞の%を測定することによって評価したCD8及びCD4 T細胞の活性化プロファイルを示す。

20

【図16A-16C】図16A~16Cは、修飾リンカーを有するMCAZ 7.1バリエーション(TENG0093)の細胞溶解活性を示す。具体的には、バリエーションは、図16Aに示すCD8及びTCR VHHアーム上に類似したリンカーを含んだ。バリエーションは、幅広いCD3×CD20二価エンゲージャとプロファイルが異なった。図16Aは、リンカーが異なる修飾MCAZ 7.1、及びコンプレータとして用いた幅広いCD3×CD20二価エンゲージャの構造を示す。図16Bは、OCI-Ly18 B細胞株に対するMCAZ 7.1バリエーション及びCD3×CD20二価エンゲージャの細胞溶解活性を示す。図16Cは、CD25の表面発現として72時間目に評価したCD4及びCD8 T細胞活性化プロファイルを示す。

30

【図17A-17B】図17A~17Fは、MCAZ 7.1が、幅広いCD3×CD20二価エンゲージャと比較して、CD8 T細胞への強い結合を示し、且つCD8 T細胞とのCD20+腫瘍細胞の選択的結合を誘導したことを示す。図17Aは、CD20+腫瘍B細胞株(OCI-Ly-18)についてのMCAZ 7.1結合プロファイルを示す。図17Bは、健康なドナー由来のPBMCからの精製CD4 T細胞についてのMCAZ 7.1結合プロファイルを示す。図17Cは、健康なドナー由来のPBMCからの精製CD8 T細胞についてのMCAZ 7.1結合プロファイルを示す。図17Dは、CD8 T細胞に結合するCD3×CD20二価エンゲージャの拡大を示す。図17Eは、CD8 B細胞コンジュゲート及びCD4 T細胞コンジュゲートの%を、MCAZ 7.1とのインキュベーション後のCD4及びCD8 T細胞の染色後のフローサイトメトリによって評価した図である。図17Fは、CD8 B細胞コンジュゲート及びCD4 T細胞コンジュゲートの%を、CD3×CD20二価エンゲージャとのインキュベーション後のCD4及びCD8 T細胞の染色後のフローサイトメトリによって評価した図である。

40

【図17C-17F】同上。

【図18A-18F】図18A~18Fは、細胞溶解中のCD8 T細胞のMCAZ 7.1選択的結合が、CD3×CD20二価エンゲージャによる幅広いCD3+ T細胞結合よりもかなり低いサイトカイン放出と関連したことを示す。MCAZ 7.1結合タンパク質及びCD3×CD20二価エンゲージャを、OCI-Ly18 B細胞株及びPBMC

50

Cと、5 : 1のE : T比にて72時間インキュベートした。放出された炎症誘発性サイトカイン：IL - 6 (図18A)、TNF - a (図18B)、IL - 10 (図18C)、IFN - g (図18D)、IL - 2 (図18E)、及びIL - 17A (図18F)の濃度を測定するために、上清を収集して、多重アッセイによって分析した。

【図19A】図19A ~ 19Bは、MCAZ 7.1が、CD3 x CD20二価エンゲージと比較して、かなりのレベルのT細胞活性化及びサイトカイン放出を誘導しなかったことを示す。種々の濃度のMCAZ 7.1結合タンパク質及びCD3 x CD20二価エンゲージをプレート結合させて、健康なドナー由来の1.5e5 PBM Cを加えて、48時間インキュベートした。図19Aは、フローサイトメトリによってCD25 / CD69 + 表面発現レベルについて評価したCD4及びCD8非特異的T細胞活性化プロファイルを示す。図19Bは、収集した上清についての放出された炎症誘発性サイトカインの濃度を測定する多重アッセイを示す。

【図19B】同上。

【図20A - 20B】図20A ~ 20Bは、MCAZ 7.1バリエーション (TENG0093) 結合タンパク質及びCD3 x CD20二価エンゲージが、3Dスフェロイドモデルにおいて強い細胞溶解活性を誘導したことを示す。GFP発現CD20 + B細胞株 (TMD8、100000 CD20 / 細胞) を、低接着プレート内にプレATINGして、3Dスフェロイドを72時間形成した。続いて、精製panT細胞を、15 : 1のE : T比にて加えて、エンゲージなし、MCAZ 7.1バリエーション結合タンパク質、又はCD3 x CD20二価エンゲージと96時間共インキュベートした。図20Aは、結合タンパク質の不在下での、MCAZ 7.1バリエーション結合タンパク質による、又はCD3 x CD20二価エンゲージによるスフェロイドの代表的な画像を示す。図20Bは、96時間のインキュベーション後のT細胞エンゲージの種々の濃度での、エンゲージなし対照と比較したGFPシグナル強度の平均%を示す。

【図21】図21は、MCAZ 7.1結合タンパク質の単回用量後のPK評価を示す。panT細胞によりヒト化したNSGマウスに、示す0.5mg / kgの結合タンパク質を注入して、結合タンパク質の全身濃度を、1時間、6時間、24時間、48時間、72時間、及び168時間後に測定した。

【図22】図22は、ヒト化NSGマウスモデルにおけるB細胞リンパ腫内のMCAZ 7.1結合タンパク質のインビボ有効性を示す。NSGマウスにpanT細胞を、研究開始の2日前に移植した。5e6 OCI - Ly18 CD20 + 腫瘍細胞株を0日目にs.c.移植して、動物に2日目に1mg / kgのMCAZ 7.1結合タンパク質又はCD3 x CD20二価エンゲージをi.p.投与してから、X軸の下の灰色の矢印によって示すのと同じ濃度にて毎週投与した。

【図23A - 23D】図23A ~ 23Fは、CRSマウスモデルにおけるCD3 x CD20二価エンゲージと比較したMCAZ 7.1結合タンパク質のインビボサイトカイン放出評価を示す。平均 + / - SDを、IL - 6 (図23A)、TNF - a (図23B)、IL - 10 (図23C)、IFN - g (図23D)、IL - 2 (図23E)、及びIL - 17A (図23F)についてプロットしている。

【図23E - 23F】同上。

【図24A - 24D】図24A ~ 24Hは、非ホジキンリンパ腫 (NHL) ドナー由来のPBM C上のMCAZ 7.1及びMCAZ 7.1バリエーションについての結合タンパク質インビボ活性を示す。B細胞死を、NHL (DLBCL) ドナー由来のPBM Cについて評価した。MCAZ 7.1バリエーション結合タンパク質を、示す濃度にて、そして48時間後にPBM C内にスパイクして、B細胞%を、患者毎にフローサイトメトリによって評価した (図24A、図24C、図24E、図24G)。B細胞細胞溶解%を、3つの異なるDLBCLドナーについて示す結合タンパク質の様々な濃度にて示した (図24B、図24D、図24F、図24H)。CD4及びCD8 T細胞活性化プロファイルを、CD25 + T細胞の%として評価した。

【図24E - 24F】同上。

10

20

30

40

50

【図 2 4 G - 2 4 H】同上。

【図 2 5 A - 2 5 B】図 2 5 A ~ 2 5 B は、EGFR TITAN、及びコンプレータとして用いた幅広い CD 3 エンゲージャの代表的な分子フォーマットを示す。

【図 2 6 A - 2 6 B】図 2 6 A は、NCI H 1 9 6 に対する EGFR TITAN (MCAZ 1 3 . 8) 及び幅広い CD 3 コンプレータの結合プロファイルを示す。図 2 6 B は、MDA - MB 2 3 1 に対する EGFR TITAN (MCAZ 1 3 . 8) 及び幅広い CD 3 コンプレータの結合プロファイルを示す。

【図 2 7 A - 2 7 B】図 2 7 A ~ 2 7 B は、NCI H 1 9 6 - EGFR 高についてのインビトロ細胞傷害及び T 細胞活性化プロファイルを示す。図 2 7 A は、NCI H 1 9 6 腫瘍細胞株に対する EGFR TITAN、及びコンプレータとして用いた幅広い CD 3 エンゲージャの等価の細胞溶解活性を示す。図 2 7 B は、T 細胞上での CD 2 5 表面発現 % によって強調される、EGFR TITAN (MCAZ 1 3 . 8) について強く偏った CD 8 T 細胞活性化プロファイルを示す。

【図 2 8 A - 2 8 E】図 2 8 A ~ 2 8 E は、細胞溶解中の CD 8 T 細胞の EGFR TITAN (MCAZ 1 3 . 8) 選択的係合が、CD 3 x EGFR 二価コンプレータによる幅広い CD 3 + T 細胞係合よりもかなり低いサイトカイン放出と関連することを示す。

【図 2 9 A - 2 9 B】図 2 9 A ~ 2 9 B は、MDA - MB - 2 3 1 - EGFR 高についてのインビトロ細胞傷害及び T 細胞活性化の偏りを示す。図 2 9 A は、MDA - MB - 2 3 1 腫瘍細胞株上の EGFR TITAN、及びコンプレータとして用いた幅広い CD 3 エンゲージャの等価の細胞溶解活性を示す。図 2 9 B は、T 細胞上での CD 2 5 表面発現 % によって強調される、EGFR TITAN (MCAZ 1 3 . 8) について強く偏った CD 8 T 細胞活性化プロファイルを示す。

【図 3 0 A - 3 0 E】図 3 0 A ~ 3 0 E は、細胞溶解中の CD 8 T 細胞の EGFR TITAN (MCAZ 1 3 . 8) 選択的係合が、CD 3 x EGFR 二価コンプレータによる幅広い CD 3 + T 細胞係合よりもかなり低いサイトカイン放出と関連することを示す。

【図 3 1 A】図 3 1 A ~ 3 1 B は、T 細胞活性化を示す。図 3 1 A は、EGFR TITAN (MCAZ 1 3 . 8) 結合タンパク質が、様々な濃度にてプレート結合した場合に T 細胞を活性化させないことを示す。比較において、コンプレータとして用いた幅広い CD 3 エンゲージャは、用いた最も高い濃度にて、かなりの T 細胞活性化を誘導する。図 3 1 B は、プレート結合 EGFR TITAN (MCAZ 1 3 . 8) によって誘導した T 細胞活性化の不在が、サイトカイン放出の不在と関連することを示す。

【図 3 1 B】同上。

【図 3 2 A - 3 2 C】図 3 2 A ~ 3 2 C は、TENGO 0 0 9 3 が、完全ヒト化 NSG マウスにおいて B 細胞を強力に減少させることを示す。NSG - SGM 3 マウスを、ヒト幹細胞 (CD 3 4 + 細胞) によりヒト化した。1 4 週後に、動物を、2 0 mg / kg の Fc ブロックにより I . P . 処置して、1 6 時間後に、1 mg / kg の TENGO 0 0 9 3 又は CD 3 x CD 2 0 二価エンゲージャにより I . P . 処置した。6 日目のポストエンゲージャ処置時に、B 細胞枯渇有効性を、抗 CD 1 9 表面染色を用いたフローサイトメトリによって評価した。双方の CD 2 0 T 細胞エンゲージャが、PBS 処置群 (非処置群) と比較して、血液 (図 3 2 A)、脾臓 (図 3 2 B)、及び骨髄 (図 3 2 C) において強力且つほぼ完全な B 細胞枯渇効力を誘導した。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 8】

本開示は、一般に、抗原結合部位、T 細胞受容体結合部位、及び T 細胞共刺激分子結合部位を含む結合タンパク質に関する。また、本開示は、そのような結合タンパク質を含む組成物及びそのような結合タンパク質をコードする核酸分子を提供する。本開示はさらに、そのような結合タンパク質を用いて障害又は症状を処置する方法に関する。

【0 0 1 9】

本明細書中で開示される結合タンパク質は、CD 8 + T 細胞に選択的に結合する。CD 8 + T 細胞への選択的結合の結果、結合タンパク質は、腫瘍促進 T 細胞、例えば T r e g

、Th2、及びTh17細胞との係合を回避し、そして放出症候群(CRS)を引き起こす大部分のサイトカインを産生するCD4+T細胞との係合を回避する。活性化されるT細胞の割合を引き下げることによって、本明細書中で開示される結合タンパク質はCRSを引き下げる。加えて、本明細書中で開示される結合タンパク質によって結合されるCD8+T細胞は、免疫原性であるピロトシスと呼ばれる種類のプログラム細胞死を誘導する。ピロトシス細胞は、抗原提示細胞によって取り組まれて、更なる腫瘍特異的T細胞応答を駆動し得る。

【0020】

本明細書中に記載される本開示の特定の態様は、提示される特定の態様に限定されず、変化し得ることを理解されたい。また、本明細書中で用いられる専門用語は、特定の態様を説明するためだけのものであり、本明細書中で特に定義されない限り、限定することを意図するものではないことも理解されるであろう。さらに、本明細書中で開示される特定の態様は、当業者によって認識されるように、限定されることなく、本明細書中で開示される他の態様と組み合わせることができる。

10

【0021】

別段の指示がない限り、又は文脈及び当業者の理解から別段明らかとならない限り、範囲として表される本明細書中の値は、内容から別段明らかに示されない限り、範囲の下限の単位の10分の1まで、本開示の様々な実施形態において記載される範囲内のあらゆる具体的な値又は部分範囲を想定し得る。

【0022】

本開示の全体を通して、文脈が別段具体的に示さない限り、用語「含む(comprise)」及び「含む(include)」並びにそれらの変形(例えば、「含む(comprises)」、「含んでいる(comprising)」、「含む(include)」、及び「含んでいる(including)」)は、記載された構成要素、特徴、要素若しくは工程、又は構成要素群、特徴群、要素群若しくは工程群を含むが、他のいかなる構成要素、特徴、要素、工程も、構成要素群、特徴群、要素群、工程群も除外しないことを示すと理解されるであろう。用語「～を含む」、「～から本質的になる」、及び「～からなる」はいずれも、それらの通常の意味を保持しながら、他の2つの用語のいずれかと置き換えられ得る。

20

【0023】

本明細書中で用いられる単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、文脈が別段明らかに示さない限り、複数の指示対象形を含む。

30

【0024】

本明細書中で開示されるパーセンテージは、開示された値から±10、20、又は30%の量で変化し得、且つ企図される開示の範囲内に留まり得る。

【0025】

本明細書中で用いられる範囲及び量は、「約」特定の値又は範囲として表され得る。また、約は、正確な量も含む。例えば、「約5%」は、「約5%」を意味し、また「5%」も意味する。また、用語「約」は、所与の値又は値の範囲の±10%を指し得る。したがって、約5%は、例えば、4.5%~5.5%をも意味する。

40

【0026】

本明細書中で用いられる用語「又は」及び「及び/又は」は、複数の構成要素を互いに組み合わせて、又は互いとは排他的に記述するのに利用される。例えば、「x、y、及び/又はz」は、「x」単独、「y」単独、「z」単独、「x、y、及びz」、「(x及びy)又はz」、「x又は(y及びz)」、又は「x又はy又はz」を指し得る。

【0027】

本開示に従って利用されるように、別段の指示がない限り、全ての科学技術用語は、当業者によって一般に理解されている意味と同じ意味を有すると理解されるものとする。別途文脈によって求められない限り、単数形用語は複数を含むものとし、複数形用語は単数を含むものとする。

50

## 【0028】

本明細書中で用いられる用語「結合タンパク質」は、少なくとも1つの抗原結合部位を形成する多数のポリペプチド鎖を含む、天然に存在しない（又は組換え）分子を指す。

## 【0029】

「組換え」分子は、組換えDNA技術手段によって調製、発現、作製、又は単離されたものである。

## 【0030】

本明細書中で用いられる用語「抗体」は、抗原を認識して、抗原に特異的に結合することができるタンパク質を指す。通常又は従来の哺乳動物抗体は、四量体を構成し、これは、典型的には2つの同一のポリペプチド鎖対で構成され、各対は、1つの「軽」鎖（典型的には約25kDaの分子量を有する）及び1つの「重」鎖（典型的には約50～70kDaの分子量を有する）からなる。本明細書中で用いられる用語「重鎖」及び「軽鎖」は、標的抗原に対する特異性を付与するのに十分な可変ドメイン配列を有するあらゆる免疫グロブリンポリペプチドを指す。各軽鎖及び各重鎖のアミノ末端部分は、典型的には、抗原認識を典型的に担う約100～110個又はそれを超えるアミノ酸の可変ドメインを含む。可変ドメインは、抗体が非ヒト源に由来するならば、フレームワーク領域をヒト化する更なるタンパク質操作に供されてもよい。各鎖のカルボキシル末端部分は、典型的には、エフェクタ機能を担う定常ドメインを画定する。ゆえに、天然に存在する抗体では、完全長の重鎖免疫グロブリンポリペプチドは、可変ドメイン（V<sub>H</sub>）、3つの定常ドメイン（C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、及びC<sub>H3</sub>）、及びC<sub>H1</sub>とC<sub>H2</sub>との間にあるヒンジ領域を含み、V<sub>H</sub>ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端に存在し、C<sub>H3</sub>ドメインは、カルボキシル末端に存在し、完全長の軽鎖免疫グロブリンポリペプチドは、可変ドメイン（V<sub>L</sub>）及び定常ドメイン（C<sub>L</sub>）を含み、V<sub>L</sub>ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端に存在し、C<sub>L</sub>ドメインは、カルボキシル末端に存在する。

## 【0031】

完全長の軽鎖及び重鎖内では、可変ドメイン及び定常ドメインは、典型的には、約12個以上のアミノ酸の「J」領域によって連結されており、重鎖はまた、約10個超のアミノ酸の「D」領域を含む。各軽鎖/重鎖対の可変領域は、典型的には、抗原結合部位を形成する。天然に存在する抗体の可変ドメインは、典型的には、相補性決定領域又はCDRとも呼ばれる3つの超可変領域によって連結された、全体構造が同じ、比較的保存されたフレームワーク領域（FR）を示す。各対の2本の鎖由来のCDRは、典型的には、フレームワーク領域によってアラインされており、これにより特定のエピトープに結合することが可能となり得る。アミノ末端からカルボキシル末端まで、軽鎖及び重鎖の双方の可変ドメインは、典型的には、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4を含む。

## 【0032】

「その抗原結合フラグメント」は、抗体が標的とする特定の抗原に結合することができる抗体の少なくとも最小部分、例えば、B細胞によって産生される典型的な抗体の文脈において、重鎖（V<sub>H</sub>）可変ドメイン及び軽鎖（V<sub>L</sub>）可変ドメインの相補性決定領域（CDR）の少なくとも一部を指す。抗体又はその抗原結合フラグメントは、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、エピトープ結合フラグメント、例えば、Fab、Fab'、及びF(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、単鎖Fv(scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、V<sub>L</sub>ドメイン又はV<sub>H</sub>ドメインを単独で、又は対向するドメインの一部と組み合わせられて含むフラグメント（例えば、全V<sub>L</sub>ドメイン、及び1つ、2つ、又は3つのCDRを有する部分V<sub>H</sub>ドメイン）、並びにFab発現ライブラリによって産生されるフラグメントであり得るか、又はそれらに由来し得る。scFv分子は、当該技術分野において知られており、例えば米国特許第5,892,019号明細書に記載されている。

## 【0033】

本明細書中で用いられる用語「ネイティブFc」は、単量体型であるか多量体型である

10

20

30

40

50

かを問わず、抗体の消化により生じるか、又は他の手段によって生成される非抗原結合フラグメントの配列を含む分子を指し、ヒンジ領域を含有し得る。ネイティブFcの元々の免疫グロブリン源は、好ましくはヒト起源のものであり、あらゆる免疫グロブリンであり得る。ネイティブFc分子は、単量体ポリペプチドから構成され、これは、共有結合（すなわちジスルフィド結合）及び非共有結合による会合によって連結されて二量体型又は多量体型となり得る。ネイティブFc分子の単量体サブユニット間の分子内ジスルフィド結合の数は、クラス（例えば、IgG、IgA、及びIgE）又はサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、及びIgGA2）に応じて、1～4の範囲である。ネイティブFcの一例として、IgGのパパイン消化により生じるジスルフィド結合型二量体がある。本明細書中で用いられる用語「ネイティブFc」は、単量体型、二量体型、及び多量体型の総称である。

10

**【0034】**

本明細書中で用いられる用語「Fcバリエーション」は、ネイティブFcから修飾されているが、依然としてサルヴェージ受容体FcRn（新生児Fc受容体）に対する結合部位を含む分子又は配列を指す。例示的なFcバリエーション、及びその、サルヴェージ受容体との相互作用は、当該技術分野において知られている。ゆえに、用語「Fcバリエーション」は、非ヒトネイティブFcからヒト化された分子又は配列を含み得る。さらに、ネイティブFcは、本開示の結合タンパク質に必要とされない構造的特徴又は生物学的活性を提供する、特定の残基を変更するFcバリエーションを生成するように除去又は変異され得る領域を含む。ゆえに、用語「Fcバリエーション」は：（1）ジスルフィド結合の形成、（2）選択された宿主細胞との不適合性、（3）選択された宿主細胞における発現直後のN末端の不均一性、（4）グリコシル化、（5）補体との相互作用、（6）サルヴェージ受容体以外のFc受容体への結合、又は（7）抗体依存性細胞傷害（ADCC）に影響するか、又はこれらに關与する1つ以上のネイティブFc部位若しくは残基を欠いているか、又は1つ以上のFc部分若しくは残基が修飾されている分子又は配列を含む。

20

**【0035】**

本明細書中で用いられる用語「Fc」は、先で定義されるネイティブFc及びFcバリエーションを包含する。Fcバリエーション及びネイティブFc分子と同様、用語「Fc」は、全長抗体から消化されたものであるか、その他の手段によって生成されたものであるかを問わず、単量体型又は多量体型の分子を含む。

30

**【0036】**

本開示によって包含される結合タンパク質は、免疫グロブリン分子のあらゆるタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）、又はサブクラスのものであり得、又はそれらに由来し得る。

**【0037】**

本明細書中で用いられる用語「抗原」又は「標的抗原」は、本開示の結合タンパク質の抗原結合部分が認識且つ結合することができる分子又は分子の一部を指す。標的抗原は、動物において、当該抗原のエピトープに結合することができる抗体を生成するのに用いることができる。標的抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。結合タンパク質の抗原結合部分によって認識される各標的抗原に関して、標的抗原を認識するインタクト抗体と競合することができる。

40

**【0038】**

本明細書中で用いられる用語「抗原結合部位」は、本開示の結合タンパク質の表面上に生じる部位を指し、そこに抗原又は抗原上のエピトープが結合される。

**【0039】**

本明細書中で用いられる用語「リンカー」は、本開示の結合タンパク質のドメイン間に挿入される1つ以上のアミノ酸残基を指す。例えば、リンカーが、配列レベルにてドメイン間に挿入され得る。ドメイントランジションの正確な位置は、実験データによって実証されるように、又はモデル化若しくは第2の構造予測の技術によって想定され得るように

50

、ベータシート又はアルファヘリックス等の第2の構造要素を形成しないペプチドストレッチを位置決めすることによって決定され得る。多くの場合、天然のリンカーが免疫グロブリンドメイン間で見出されるので、リンカーは、タンパク質融合の終止残基及び開始残基が選択される場所に依りて、必要とされても必要とされなくてもよい。

【0040】

本明細書中で用いられる用語「ポリヌクレオチド」は、単一の核酸及び多数の核酸を含み、単離された核酸分子又は構築物、例えば、メッセンジャーRNA (mRNA) 又はプラスミドDNA (pDNA) を指す。用語「核酸」は、DNA 又はRNA 等のあらゆる核酸型を含む。

【0041】

本明細書中で用いられる用語「ベクター」は、宿主細胞に導入されることによって、形質転換された宿主細胞を生成する核酸分子を指し得る。ベクターは、宿主細胞内での複製を可能にする核酸配列、例えば複製起点を含み得る。また、ベクターは、当該技術分野において知られている1つ以上の選択マーカー遺伝子及び他の遺伝要素を含み得る。本明細書で想定される特定の型のベクターが、ウイルスと結合されるか、又はウイルス中に組み込まれて、細胞形質転換を促進することができる。

【0042】

本明細書中で用いられる用語「処置する」、「処置」、又は「~の処置」は、疾患病理の軽減、疾患徴候の軽減若しくは除去、生存率の増大の促進、及び/又は不快感の軽減を指す。例えば、処置することは、対象に投与された場合に疾患の徴候、サイン、又は原因を軽減させる治療の能力を指し得る。また、処置することは、少なくとも1つの臨床症状の緩和若しくは低下、及び/又は症状の進行の阻害若しくは遅延、及び/又は疾患若しくは疾病の発症の予防若しくは遅延を指す。

【0043】

本明細書中で用いられる用語「投与」又は「投与すること」は、所望の効果を達成するのに適切なあらゆる経路によって結合タンパク質を提供すること、接触させること、及び/又は送達することを指す。投与として、以下に限定されないが、経口、舌下、非経口(例えば、静脈内、皮下、皮内、筋肉内、関節内、動脈内、関節滑液嚢内、胸骨内、くも膜下腔内、病変内、又は頭蓋内注射)、経皮、局所、口腔内、直腸、膣、経鼻、点眼、吸入経路、及びインプラントが挙げられ得る。

【0044】

本明細書中で用いられる用語「対象」、「個体」、又は「患者」は、診断、予後、又は治療が所望されるあらゆる対象、特に哺乳動物対象を指す。哺乳動物対象として、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、クマ等が挙げられる。

【0045】

本明細書中で用いられる用語、投与される治療物質、例えば結合タンパク質の「有効量」又は「治療的に有効な量」は、癌を処置すること又は癌の処置等の具体的に記載又は意図される目的を実行するのに十分な量である。「有効量」は、記載される目的に関して、日常的な実験に基づいて決定することができる。

【0046】

本明細書中で用いられる用語「医薬組成物」は、対象に適切に投与された場合に所望の治療効果を誘導することができる化合物又は組成物を指す。一部の態様において、本開示は、薬学的に許容される担体及び治療的に有効な量の本開示の結合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。本明細書中で用いられる用語「薬学的に許容される担体」又は「生理学的に許容される担体」は、本開示の1つ以上の結合タンパク質の送達を達成又は増強するのに適した1つ以上の製剤材料を指す。

【0047】

特定の態様において、本明細書中で開示される結合タンパク質は、薬学的に許容可能な担体、賦形剤、又は安定剤と共に、医薬組成物として製剤化され得る。特定の態様におい

10

20

30

40

50



3は、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；Fcは、免疫グロブリンヒンジ領域、並びにC<sub>H2</sub>及びC<sub>H3</sub>免疫グロブリン重鎖定常ドメインである。

【0052】

本明細書中に記載される一部の態様は、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を提供し、2つのポリペプチド鎖は、式： $V_L - C_L$ によって表される構造を有し、2つのポリペプチド鎖は、式： $I I_1 - V_{H1} - C_{H1} - V_{H2} - Fc - I I_2$ によって表される構造を有し； $V_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり； $V_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり； $C_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり； $C_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリンC<sub>H1</sub>重鎖定常ドメインであり； $V_{H2}$ は、T細胞受容体に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；Fcは、免疫グロブリンヒンジ領域、並びにC<sub>H2</sub>及びC<sub>H3</sub>免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり； $I I_1$ 及び $I I_2$ は各々、独立して、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインであるか、又は不在であり； $I I_1$ 及び $I I_2$ の少なくとも1つが、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインである。

10

【0053】

本明細書中に記載される一部の態様は、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を提供し、2つのポリペプチド鎖は、式： $I I_1 - V_L - C_L I I_2$ によって表される構造を有し；2つのポリペプチド鎖は、式： $V_{H1} - C_{H1} - V_{H2} - Fc$ によって表される構造を有し； $V_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり； $V_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり； $C_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり； $C_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリンC<sub>H1</sub>重鎖定常ドメインであり； $V_{H2}$ は、T細胞受容体に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；Fcは、免疫グロブリンヒンジ領域、並びにC<sub>H2</sub>及びC<sub>H3</sub>免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり； $I I_1$ 及び $I I_2$ は各々、独立して、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインであるか、又は不在であり； $I I_1$ 及び $I I_2$ の少なくとも1つが、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインである。

20

30

【0054】

本明細書中に記載される一部の態様は、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を提供し、2つのポリペプチド鎖は、式： $V_L - C_L$ によって表される構造を有し、1つのポリペプチド鎖は、式： $V_{H1} - C_{H1} - Fc$ によって表される構造を有し；1つのポリペプチド鎖は、式： $V_{H2} - V_{H3} - Fc$ によって表される構造を有し； $V_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり； $V_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり； $C_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり； $C_{H1}$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリンC<sub>H1</sub>重鎖定常ドメインであり； $V_{H2}$ は、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり； $V_{H3}$ は、T細胞受容体結合部位に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；Fcは、免疫グロブリンヒンジ領域、並びにC<sub>H2</sub>及びC<sub>H3</sub>免疫グロブリン重鎖定常ドメインである。

40

【0055】

本明細書中に記載される一部の態様は、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する3つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を提供し、第1のポリペプチド鎖は、式： $V_L - C_L$ によって表される構造を有し；第2のポリペプチド鎖は、式： $V_{H1} - C_{H1} - V_{H2} - Fc$ によって表される構造を有し；第3のポリペプチド鎖は、式： $V_{H1} - V_{H3} - Fc$ によって表される構造を有し； $V_L$ は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖可変ドメインであり；V

50

H<sub>1</sub>は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン重鎖可変ドメインであり；C<sub>L</sub>は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリン軽鎖定常ドメインであり；C<sub>H1</sub>は、腫瘍関連抗原に特異的に結合する免疫グロブリンC<sub>H1</sub>重鎖定常ドメインであり；V<sub>H2</sub>は、T細胞受容体に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；V<sub>H3</sub>は、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインであり；F<sub>c</sub>は、C<sub>H2</sub>及びC<sub>H3</sub>免疫グロブリン重鎖定常ドメインである。

【0056】

一部の態様において、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインは、免疫グロブリン重鎖可変ドメインである。一部の態様において、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインは、シングルドメイン配列である。特定の態様において、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインは、ナノボディである。特定の態様において、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインは、ラクダ科動物のものである。特定の態様において、T細胞共刺激分子に特異的に結合する重鎖可変ドメインは、シングルドメイン可変新抗原受容体である。

10

【0057】

一部の態様において、T細胞受容体結合部位に特異的に結合する重鎖可変ドメインは、免疫グロブリン重鎖可変ドメインである。一部の態様において、T細胞受容体結合部位に特異的に結合する重鎖可変ドメインは、シングルドメイン配列である。特定の態様において、T細胞受容体結合部位に特異的に結合する重鎖可変ドメインは、ナノボディである。特定の態様において、T細胞受容体結合部位に特異的に結合する重鎖可変ドメインは、ラクダ科動物のものである。特定の態様において、T細胞受容体結合部位に特異的に結合する重鎖可変ドメインは、シングルドメイン可変新抗原受容体である。

20

【0058】

一部の態様において、結合タンパク質のF<sub>c</sub>は、IgG抗体、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、及びIgGA2に由来する。

【0059】

一部の態様において、結合タンパク質は、リンカーを含む。リンカー内のアミノ酸残基の同一性及び配列は、達成されるのに必須の第2の構造要素の型に応じて変化し得る。例えば、リンカーが最大フレキシビリティを有するのに、グリシン、セリン、及びアラニンが最良である。よりリジッドな、且つ拡張されたリンカーが必要であるならば、グリシン、プロリン、トレオニン、及びセリンの多少の組合せが有用である。あらゆるアミノ酸残基が、必要に応じて、所望の性質に応じてより大きなペプチドリンカーを構築するための、1つ以上の他のアミノ酸残基と組み合わせるリンカーとみなされ得、これは、第1のアミノ酸残基と同じであっても異なってもよい。一部の態様において、結合タンパク質は、第3のポリペプチド鎖上のC<sub>H1</sub>とV<sub>H2</sub>との間に位置するリンカー、L<sub>1</sub>、及び第3のポリペプチド鎖上のV<sub>H2</sub>とF<sub>c</sub>との間に位置するリンカー、L<sub>2</sub>を含み、L<sub>1</sub>及びL<sub>2</sub>は各々、独立して、リンカーであるか、又は不在である。一部の態様において、結合タンパク質は、第4のポリペプチド鎖上のC<sub>H1</sub>とV<sub>H3</sub>との間に位置するリンカー、L<sub>3</sub>、及び第4のポリペプチド鎖上のV<sub>H3</sub>とF<sub>c</sub>との間に位置するリンカー、L<sub>4</sub>を含み、L<sub>3</sub>及びL<sub>4</sub>は各々、独立して、リンカーであるか、又は不在である。一部の態様において、L<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>3</sub>、及びL<sub>4</sub>は各々、独立して、リンカーであるか、又は不在である。一部の態様において、リンカーは、アミノ酸配列TGGG S（配列番号46）を含む。一部の態様において、リンカーは、アミノ酸配列GGGG S（配列番号47）を含む。一部の態様において、リンカーは、アミノ酸配列AAAYPYDVPDYGGSGEGTSTGGSGGGSGGGA（配列番号48）を含む。一部の態様において、リンカーはさらに、ヘマグルチニンタグを含む。

30

40

【0060】

一部の態様において、結合タンパク質は、第3のポリペプチド鎖上のC<sub>H1</sub>とV<sub>H2</sub>との間に位置する免疫グロブリンヒンジ領域、H<sub>1</sub>、及び第3のポリペプチド鎖上のV<sub>H2</sub>とF<sub>c</sub>との間に位置する免疫グロブリンヒンジ領域、H<sub>2</sub>を含み、H<sub>1</sub>及びH<sub>2</sub>は各々、

50

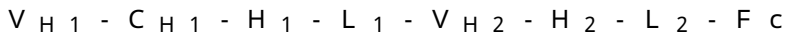
独立して、免疫グロブリンヒンジ領域であるか、又は不在である。一部の態様において、結合タンパク質は、第4のポリペプチド鎖上の $C_{H1}$ と $V_{H3}$ との間に位置する免疫グロブリンヒンジ領域、 $H_3$ 、及び第4のポリペプチド鎖上の $V_{H3}$ と $F_c$ との間に位置する免疫グロブリンヒンジ領域、 $H_4$ を含み、 $H_3$ 及び $H_4$ は各々、独立して、免疫グロブリンヒンジ領域であるか、又は不在である。一部の態様において、 $H_1$ 、 $H_2$ 、 $H_3$ 、及び $H_4$ は各々、独立して、免疫グロブリンヒンジ領域であるか、又は不在である。

## 【0061】

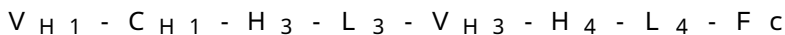
一部の態様において、結合タンパク質は、式：



によって表される構造を有する第1及び第2のポリペプチド鎖、式：



によって表される構造を有する第3のポリペプチド鎖、及び式：



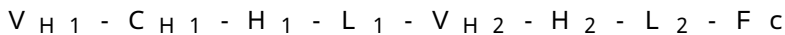
によって表される構造を有する第4のポリペプチド鎖を含む。

## 【0062】

他の態様において、結合タンパク質は、式：



によって表される構造を有する第1のポリペプチド鎖、式：



によって表される構造を有する第2のポリペプチド鎖、及び式：



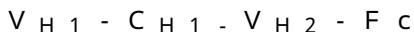
によって表される構造を有する第3のポリペプチド鎖を含む。

## 【0063】

他の態様において、結合タンパク質は、式：



によって表される構造を有する2つのポリペプチド鎖；及び式：



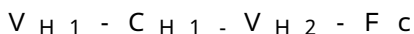
によって表される構造を有する2つのポリペプチド鎖を含む。

## 【0064】

他の態様において、結合タンパク質は、式：



によって表される構造を有する第1のポリペプチド鎖、式：



によって表される構造を有する第2のポリペプチド鎖、及び式：



によって表される構造を有する第3のポリペプチド鎖を含む。

## 【0065】

一部の態様において、結合タンパク質は、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖は、

- (a) 配列番号1、配列番号2、及び配列番号3の配列のアミノ酸；
- (b) 配列番号1、配列番号2、及び配列番号4の配列のアミノ酸；
- (c) 配列番号1、配列番号9、及び配列番号10の配列のアミノ酸；
- (d) 配列番号1、配列番号11、及び配列番号12の配列のアミノ酸；
- (e) 配列番号1、配列番号13、及び配列番号14の配列のアミノ酸；
- (f) 配列番号1及び配列番号19の配列のアミノ酸；
- (g) 配列番号1、配列番号22、及び配列番号23の配列のアミノ酸；
- (h) 配列番号29及び配列番号30の配列のアミノ酸；
- (i) 配列番号31及び配列番号32の配列のアミノ酸；
- (j) 配列番号33及び配列番号34の配列のアミノ酸；

10

20

30

40

50

(k) 配列番号 35 及び配列番号 36 の配列のアミノ酸；又は  
 (l) 配列番号 37 及び配列番号 38 の配列のアミノ酸  
 を含む。

【0066】

一部の態様において、結合タンパク質は、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する3つ又は4つのポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖は、

- (a) 配列番号 1、配列番号 2、及び配列番号 3 の配列のアミノ酸；
- (b) 配列番号 1、配列番号 2、及び配列番号 4 の配列のアミノ酸；
- (c) 配列番号 1、配列番号 9、及び配列番号 10 の配列のアミノ酸；
- (d) 配列番号 1、配列番号 11、及び配列番号 12 の配列のアミノ酸；
- (e) 配列番号 1、配列番号 13、及び配列番号 14 の配列のアミノ酸；
- (f) 配列番号 1 及び配列番号 19 の配列のアミノ酸；
- (g) 配列番号 1、配列番号 22、及び配列番号 23 の配列のアミノ酸；
- (h) 配列番号 29 及び配列番号 30 の配列のアミノ酸；
- (i) 配列番号 31 及び配列番号 32 の配列のアミノ酸；
- (j) 配列番号 33 及び配列番号 34 の配列のアミノ酸；
- (k) 配列番号 35 及び配列番号 36 の配列のアミノ酸；
- (l) 配列番号 37 及び配列番号 38 の配列のアミノ酸；
- (m) 配列番号 39 及び配列番号 40 の配列のアミノ酸；
- (n) 配列番号 41 及び配列番号 42 の配列のアミノ酸；又は
- (o) 配列番号 45 及び配列番号 54 の配列のアミノ酸

10

20

を含む。

【0067】

一部の態様において、結合タンパク質は、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する3つのポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖は、配列番号 43、配列番号 44、及び配列番号 45 の配列のアミノ酸、又は (q) 配列番号 1、配列番号 11、及び配列番号 12 の配列のアミノ酸を含む。一実施形態において、結合タンパク質は、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する3つのポリペプチド鎖を含み、これは、配列番号 43、配列番号 44、及び配列番号 45 の配列のアミノ酸を含む。

30

30

【0068】

一部の態様において、本明細書中で提供されるのは、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であり、ポリペプチド鎖は、配列番号 1～56 に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも80%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様において、本明細書中で提供されるのは、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であり、ポリペプチド鎖は、配列番号 1～42 に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも80%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様において、本明細書中で提供されるのは、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する3つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であり、ポリペプチド鎖は、配列番号 1～56 に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも80%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の態様において、本明細書中で提供されるのは、2つの腫瘍関連抗原結合部位、T細胞受容体結合部位、及びT細胞共刺激分子結合部位を形成する3つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であり、ポリペプチド鎖は、配列番号 1～42 に示されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも80%、又は少

40

50

なくとも90%、又は少なくとも95%、又は少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0069】

特定の態様において、本明細書中で提供されるのは、本明細書中で開示される配列のアミノ酸配列と比較して類似するか、又は同様の性質を有するアミノ酸によって置換されたアミノ酸が最大10個、最大8つ、最大5つ、及び最大3つ存在する保存的バリエーションを有するアミノ酸配列である。

【0070】

本開示の結合タンパク質は、例えば、ヒト、マウス、又はヒト化抗体が挙げられるあらゆるヒト又は非ヒト抗体から得られるか、又はこれに由来するドメイン又は配列を用いて調製され得る。

10

【0071】

本開示の一部の態様は、本明細書中に記載される結合タンパク質をコードする単離核酸配列に関する。単離核酸配列は、ベクター中に含まれ得る。

【0072】

一部の態様において、本明細書中で開示される方法は、有効な量の結合タンパク質を投与することによって、癌について対象を処置することに関する。また、本開示は、対象において癌を処置するのに用いられる治療的に有効な量の結合タンパク質を提供する。一実施形態において、有効な量の結合タンパク質を投与することによって、炎症疾患について対象を処置する方法が提供される。一実施形態において、医薬として用いられる結合タンパク質、又は結合タンパク質及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。別の実施形態において、癌の処置に用いられる結合タンパク質、又は結合タンパク質及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。別の実施形態において、炎症疾患の処置に用いられる結合タンパク質、又は結合タンパク質及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。別の実施形態において、炎症疾患の処置に用いられる医薬の製造における、結合タンパク質、又は結合タンパク質及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物の使用が提供される。更なる実施形態において、癌の処置に用いられる医薬の製造における、結合タンパク質、又は結合タンパク質及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物の使用が提供される。

20

【0073】

一部の態様において、癌は、慢性リンパ球性白血病、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫が挙げられるB細胞悪性腫瘍を含む。

30

【0074】

一部の態様において、本明細書中で開示される方法は、有効な量の結合タンパク質を投与することによって、B細胞が関与する炎症疾患について対象を処置することに関する。また、本開示は、対象におけるB細胞が関与する炎症疾患を処置するのに用いられる治療的に有効な量の結合タンパク質を提供する。本開示の処置の方法において、結合タンパク質は、対象においてT細胞のサブセットを選択的に活性化することができる。T細胞のサブセットは、CD8+T細胞であり得る。CD8+T細胞は、CD4+T細胞と比較して、選択的に活性化され得る。CD8+T細胞の選択的活性化は、腫瘍促進T細胞との係合、及び放出症候群(CRS)を引き起こす大部分のサイトカインを産生するCD4+T細胞を引き下げる。加えて、CD8+T細胞の選択的係合は、ピロトーシスを誘導する。

40

【0075】

本開示の方法によるT細胞の活性化は、表面インターロイキン-2受容体アルファ鎖-ポジティブ(CD25+)T細胞のパーセンテージを測定することによって判定され得る。CD8+T細胞である表面CD25+T細胞のパーセンテージは、CD4+T細胞である表面CD25+T細胞のパーセンテージよりも高くなり得る。特定の態様において、T細胞の活性化は、CD69+/CD25+T細胞のパーセンテージによって判定され得る。特定の態様において、T細胞の活性化は、活性化されたT細胞によって放出されるサイトカインのレベルを測定することによって判定され得る。

50

## 【0076】

本開示の処置の方法は、当該技術分野において以前から知られている二重特異性T細胞エンゲージャ（BiTE）により生じるものと比較して、制御性T細胞（Treg）の係合の引下げ、細胞溶解活性の増大、及び/又はサイトカイン放出症候群（CRS）の発病率の引下げをもたらす得る。また、本開示は、当該技術分野において以前から知られている二重特異性T細胞エンゲージャ（BiTE）により生じるものと比較して、制御性T細胞（Treg）の係合を引き下げるのに、細胞溶解活性を増大させるのに、且つ/又はサイトカイン放出症候群（CRS）の発病率を引き下げるのに用いられる治療的に有効な量の結合タンパク質を提供する。

## 【0077】

本開示を考慮して、本明細書に記載される方法及び組成物は、所望の必要性を満たすように当業者によって構成され得る。

## 【0078】

一部の態様において、B細胞が関与する炎症疾患又は炎症疾患は、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、炎症性腸疾患、乾癬、天疱瘡、深在性エリテマトーデス、硬皮症、円板状エリテマトーデス、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、アトピー性皮膚炎、及びアレルギー性接触性皮膚炎から選択される。

## 【実施例】

## 【0079】

以下の実施例は、本開示の具体的な態様、及びその種々の使用を例示する。これらは、あくまで説明を目的として記載され、決して本開示の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

## 【0080】

実施例1：結合タンパク質の構造及び細胞溶解性T細胞活性

安全性を向上させ、且つ有効性を増大させるように操作された新規のクラスの結合タンパク質を、本明細書中に記載する。多数の結合タンパク質フォーマットを試験して、TCR結合ドメインの配置、T細胞共刺激ドメインの配置、リンカーサイズ及び開裂性、並びに用いられることとなるFc部分を決定した。図1は、これらの結合タンパク質についての代表的な構造を示す。図2A及び図2Bに示すように、2つのCD20結合部位、CD8共刺激結合アーム（図2A）、及びCD137結合アーム（図2B）、TCR結合ドメイン、及び2つのプロテアーゼ切断部位を含むように結合タンパク質MCAZ 6.9及びMCAZ 6.10をそれぞれ生成した。同様に、2つのCD20結合部位、CD8共刺激結合アーム、及びTCR結合ドメインを含むようにMCAZ 7.1を生成したが、2つのプロテアーゼ切断部位は含まなかった（図10A）。

## 【0081】

MCAZ 6.9及びMCAZ 6.10結合タンパク質を、CD20+B細胞株Daudi、Ramos、及びRajiに対するインビトロ細胞溶解について評価した。B細胞及び精製pan T細胞を、B細胞株と、5:1のE:T比にて4日間インキュベートして、細胞溶解%をフローサイトメトリによって測定した。MCAZ 7.1についての細胞溶解を、CD20+B細胞株Toledo、Oci-LY18、及びSU-DHL5（細胞あたりそれぞれ12420、20244、及び27152 CD20抗原を発現）に対して評価した。B細胞株をCTV染色して、PBMCを5:1のE:T比にて4日間インキュベートした。細胞溶解%を、フローサイトメトリによって測定した。

## 【0082】

MCAZ 6.9、MCAZ 6.10、及びMCAZ 7.1結合タンパク質が、強いインビトロ細胞溶解活性を誘導した（図3A~図3C、図10C及び図10D）。細胞溶解は、MCAZ 6.9及びMCAZ 7.1について、CD8 T細胞に偏った強力なT細胞活性化と関連し（図4A、図5A、図6、及び図10E）、MCAZ 6.10について、CD4に偏ったプロファイル又は等価のCD4/CD8プロファイルであった（図4B、図5B、及び図6）。

10

20

30

40

50

## 【0083】

TCR結合ドメインの最適な配置を判定するために、MCAZ 88、MCAZ 7.5、MCAZ 89を各々、TCR結合ドメインの固有の配置又はTCR結合ドメインの不在と共に生成した。MCAZ 88は、可変重ドメインの各々の末端に2つのTCR結合ドメインを含み(図7A)、MCAZ 7.5は、結合タンパク質のヒンジ部分内にTCR結合ドメインが置かれ(図8A)、MCAZ 89結合タンパク質は、いかなるTCR結合ドメインも含まなかった(図8A)。

## 【0084】

MCAZ 88について細胞溶解を試験するために、Raji細胞株(CD20+、細胞あたり85371抗原)に対する、誘導された細胞溶解を評価した。B細胞及びPBMCを、B細胞株と、5:1のE:Tの比にて4日間インキュベートして、細胞溶解%をフローサイトメトリによって測定した。また、表面CD25+細胞%及びCD69+/CD25+表面発現%を測定することによって、CD4及びCD8 T細胞活性化プロファイルを、MCAZ 88、MCAZ 7.5、及びMCAZ 89結合タンパク質について評価した。結果は、T細胞共刺激ドメインの不在下での2つのTCR結合ドメインの存在が、細胞溶解を誘導するのに十分であることを実証した(図7B)。しかしながら、結合タンパク質の最上位でのTCR結合ドメインの不在及びTCR結合ドメインの配置の双方が、非特異的T細胞活性化を生じさせた(図7C、図8B、図8C、図9)。非特異的T細胞活性化は、TCR結合ドメインが結合タンパク質のヒンジ領域内にあった場合にのみ、強く低下した(図8B、図8C)。

## 【0085】

結合タンパク質機能に及ぼすCD8位置決めの影響を評価するために、結合タンパク質上の固有の配置において、結合タンパク質MCAZ 8.71及びMCAZ 8.81を各々、2つのT細胞共刺激分子と共に生成した(図12A~図12B)。CD20+B Raji細胞株(細胞あたり85000 CD20抗原を発現)に対する細胞溶解を評価した。B細胞株をCTV染色して、5:1のE:T比にてPBMCと4日間インキュベートした。細胞溶解%を、フローサイトメトリによって測定した。CD4及びCD8 T細胞活性化プロファイルを、CD25発現細胞%として評価した。結合タンパク質におけるT細胞共刺激分子の様々な位置又は追加のT細胞共刺激分子の存在にも拘わらず、MCAZ 8.71及びMCAZ 8.81は双方とも、類似した細胞溶解を示した(図12C~図12D)。細胞溶解は、MCAZ 8.71及びMCAZ 8.81について、CD8 T細胞に偏った強力なT細胞活性化と関連した(図12E)。これらの結果は、共刺激分子の位置が、結合タンパク質内でフレキシブルであったことを実証している。しかしながら、追加の分子は、結合タンパク質の効力を増大させなかった。

## 【0086】

T細胞共刺激ドメイン及びT細胞結合ドメインの配置を互いに関して試験するために、様々な向きの結合タンパク質を試験した。MCAZ 10.3を、同じポリペプチド上のCD8ドメイン及びTCR結合ドメインの双方を含むように生成した(図10C)。また、T細胞共刺激ドメイン及びT細胞結合ドメインを、別々の結合タンパク質について試験した。具体的には、MCAZ 8.69を、T細胞共刺激分子しか含まない結合タンパク質として生成し、そしてMCAZ 8.70を、TCR結合ドメインしか含まない結合タンパク質として生成した(図13A)。CD20+B Raji細胞株、Toledo、Oci-LY18、及びSU-DHL5細胞株に対する細胞溶解を評価した。B細胞株をCTV染色して、5:1のE:T比にてPBMCと4日間インキュベートした。細胞溶解%を、フローサイトメトリによって測定した。CD4及びCD8 T細胞活性化プロファイルを、CD25発現細胞%として評価した。結果は、CD8ドメイン及びTCR結合ドメインの理想的な位置が、別々のアーム上にあるが、細胞溶解及びT細胞活性化について、同じ結合タンパク質内に存在することを実証した(図10C~図10E及び図13)。

## 【0087】

修飾リンカー長を試験して、結合タンパク質の安定性及び機能にとって最適なリンカー

10

20

30

40

50

を決定した。リンカー（T）がCD20結合ドメインとTCR結合ドメインとの間に位置するMCAZ 7.1と比較して、CD20結合ドメインとTCR結合ドメインとの間により長い修飾リンカー（GGGSGGGGS）が位置するMCAZ 7.7を生成した（図11A）。MCAZ 7.1と比較してCD8アームがよりリジッドなMCAZ 10.1を生成した。具体的に、CD20結合ドメインとCD8ドメインとの間に位置する（TGG（配列番号46））リンカーを除去して、CD8ドメインとFcドメインとの間に位置するリンカーを、MCAZ 7.1内の（AAAYPYDVPDYGSGETSTGSGGSGGSGGA（配列番号48））からMCAZ 10.1内の（G）にスイッチした（図11E）。加えて、リンカー（GETSTGSGGSGGSGGA（配列番号49））を有するMCAZ 7.1と比較して、TCR結合ドメインとFcとの間に位置するリンカー（T）及び短くされたリンカー（G）を有するMCAZ 7.1と比較して、CD20結合ドメインとTCR結合ドメインとの間に位置するリンカーが欠失したMCAZ 10.1を生成した。MCAZ 7.7について、CD20+Raji B細胞株（細胞あたり85000 CD20抗原を発現）に対する細胞溶解を評価した。B細胞株をCTV染色して、PBMCを5:1のE:T比にて4日間インキュベートした。細胞溶解%を、フローサイトメトリによって測定した。MCAZ 10.1について、OCI-Ly18 B細胞株に対する細胞溶解を評価した。B細胞株をCTV染色して、PBMCを5:1のE:T比にて3日間インキュベートした。細胞溶解%を、フローサイトメトリによって測定した。T細胞活性化プロファイルを、CD25発現細胞%として評価した。MCAZ 7.7について、非特異的及び特異的T細胞活性化を、結合タンパク質をプレート結合させて、1.5e5精製T細胞を腫瘍細胞及び関連プロテアーゼの不在下で加えることによって評価した。48時間のインキュベーション後、非特異的CD8及びCD4 T細胞活性化レベルを、CD69+/CD25+表面発現%としてフローサイトメトリによって評価した。MCAZ 7.7内のより長い修飾リンカーは、MCAZ 7.1と比較して、細胞溶解のレベルを上昇させた。しかしながら、MCAZ 7.7内のより長いリンカーは、非特異的T細胞活性化をもたらした。MCAZ 10.1内のリンカーの除去は、結合タンパク質の機能を阻害し、細胞溶解及びT細胞活性化が最小であった。

10

20

30

40

50

#### 【0088】

様々な非開裂Fc領域を試験するために、IgG1（MCAZ 11.1）、IgG2（MCAZ 11.2）、IgG3（MCAZ 11.3）、IgG4（MCAZ 11.5）、変異IgG1（MCAZ 11.5）、IgD（MCAZ 11.6）、及びIgA1（MCAZ 11.7）が挙げられる、図15Aに例示する種々の結合タンパク質を生成した。結合タンパク質の細胞溶解活性を、OCI-Ly18 B細胞株に対して、5:1のE:T比のPBMCで72時間目に試験した。CD8及びCD4 T細胞活性化プロファイルを、表面CD25+T細胞の%を測定することによって評価した。IgG Fc領域を有する結合タンパク質は、細胞溶解及びT細胞活性化の誘導に最も有効であった（図15B～図15D）。

#### 【0089】

上述の実験に基づいて、例えばMCAZ 7.1において説明されるフォーマットは、最適な細胞溶解及びT細胞活性化の誘導を実現することが見出された。

#### 【0090】

実施例2：幅広いCD3×CD20二価エンゲージャと比較した結合タンパク質のインビトロ試験

本明細書中で開示される新規の結合タンパク質の活性を、臨床処置において有効であると確立された幅広いCD20二価エンゲージャと比較した。

#### 【0091】

MCAZ 7.1のバリエーション及び幅広いCD3×CD20二価エンゲージャの活性を比較した（図16A）。具体的には、バリエーションは、CD20結合ドメインとCD8ドメインとの間のリンカー、及びCD20結合ドメインとTCRドメインとの間のリンカー（

TGGG (配列番号46))、並びにCD8ドメインとFc領域とTCRDメインとFcドメインとの間のリンカー(GGGG (配列番号47))を含んだ。結合タンパク質及び二価エンゲージャを、標的CD20+細胞と、健康なドナー由来のPBMCによる5:1のE:T比にて72時間、インキュベートした。MCAZ7.1バリエーションは、類似のEmax細胞溶解(約pM EC50)を誘導したが、かなりCD8に偏った活性化プロファイルが目立った(図16B)。

#### 【0092】

MCAZ7.1のバリエーション及びCD3×CD20二価エンゲージャのCD8 T細胞への結合を比較した。MCAZ7.1バリエーション結合プロファイルを、CD20+腫瘍B細胞株(OCI-Ly-18)について、健康なドナー由来のPBMCからの精製CD4及びCD8 T細胞について評価した。CD3×CD20二価エンゲージャ誘導B細胞:T細胞結合を評価するために、OCI-Ly18腫瘍細胞をCTV染色して、健康なドナー由来のpan-T細胞と1:1の比にて混合して、室温にて1時間インキュベートした。続いて、CD8B細胞コンジュゲート及びCD4T細胞コンジュゲートの%を、MCAZ7.1バリエーション及びCD3×CD20二価エンゲージャとのインキュベーション後のCD4及びCD8 T細胞の染色後に、フローサイトメトリによって評価した。結果は、治療的に有効な幅広いCD3×CD20二価エンゲージャと比較して、MCAZ7.1バリエーションがCD8 T細胞への強い結合を示して、CD8 T細胞とのCD20+腫瘍細胞の選択的結合を誘導することを実証した(図17A~図17F)。

#### 【0093】

3Dスフェロイドモデルを用いて、CD3×CD20二価エンゲージャと比較して、MCAZ7.1バリエーションの細胞溶解活性を判定した。GFP発現CD20+B細胞株(TMD8、100000 CD20/細胞)を、低接着プレート内にプレーティングして、3Dスフェロイドを72時間形成した。続いて、精製panT細胞を、15:1のE:T比にて加えて、エンゲージャなし、TENGG0093、又はCD3×CD20二価エンゲージャと96時間共インキュベートした。GFP+TMD8細胞を、Cellinsight CX7 HCS Platformイメージャを用いて定量化した。MCAZ7.1のバリエーションは、CD3×CD20二価分子に匹敵する強力なCD20+細胞死を実現した(図20B)。

#### 【0094】

CD3×CD20二価エンゲージャと比較してMCAZ7.1結合タンパク質の炎症性サイトカイン放出を評価するために、MCAZ7.1及びCD3×CD20二価エンゲージャを、5:1のE:T比にてOCI-Ly18 B細胞株及びPBMCと72時間インキュベートした。放出された炎症誘発性サイトカイン: IL-6(図18A)、TNF-a(図18B)、IL-10(図18C)、IFN-g(図18D)、IL-2(図18E)、及びIL-17A(図18F)の濃度を測定するために、上清を収集して、多重アッセイによって分析した。MCAZ7.1のCD8特異的結合により、CD3×CD20二価エンゲージャと類似したCD20+腫瘍細胞のEmax死が実現されたが、細胞溶解は、CD3×CD20二価エンゲージャによるCD3+T細胞結合よりもかなり低い炎症誘発性サイトカイン放出と関連した。

#### 【0095】

実施例3: ヒト化NSGマウスモデルにおけるB細胞リンパ腫でのインビボ有効性

MCAZ7.1の薬物動態を、単回用量の後に評価した。具体的には、panT細胞によりヒト化したNSGマウスに、0.5mg/kgのT細胞エンゲージャを注入して、T細胞エンゲージャの全身濃度を、1時間、6時間、24時間、48時間、72時間、及び168時間後に測定した。結果は、MCAZ7.1結合タンパク質がインビボで安定していたことを実証している(図21)。

#### 【0096】

MCAZ7.1結合タンパク質の腫瘍増殖阻害の有効性を試験するために、NSGマウスにpanT細胞を、研究開始の2日前に移植した。5e6 OCI-Ly18 CD

10

20

30

40

50

20 + 腫瘍細胞株を0日目にs.c.移植して、動物に2日目に1mg/kgのMCAZ 7.1又はCD3×CD20二価エンゲージャをi.p.投与してから、X軸の下の灰色の矢印によって示すのと同じ濃度にて毎週投与した。MCAZ 7.1及びCD3×CD20二価エンゲージャは、類似した有効性及び完全な腫瘍増殖阻害を示した(図22)。

【0097】

CD3×CD20二価エンゲージャと比較したMCAZ 7.1のインビボサイトカイン放出を評価するために、NSGマウスを、48時間後の10<sup>6</sup> PBMC(i.p.)の移植前に照射(2.3Gy)して、Fcブロック(400mg/マウスi.p.)により処置して、24時間後に、OKT3抗体について2mk/kg(i.p.)により、又は1mg/kg(i.p.)の示す結合タンパク質により処置した。血液を、多重アッセイによるサイトカイン濃度の評価のために、注入後6時間及び24時間目に収集した。CRS(サイトカイン放出症候群)モデルにおけるインビボサイトカイン放出評価は、MCAZ 7.1が、CD3×CD20二価分子によって誘導される幅広いCD3+T細胞係合と比較して、より低いサイトカイン放出を誘導することを確認した(図23A~図23F)。

10

【0098】

実施例4：非ホジキンリンパ腫ドナー由来のPBMC上での結合タンパク質インビトロ活性

結合タンパク質のB細胞死及びT細胞活性化の有効性を判定するために、B細胞死を、NHL(DLBCL)ドナー由来のPBMCについて評価した。MCAZ 7.1バリエーションを、種々の濃度にて、そして48時間後にPBMC内にスパイクして、B細胞%を、患者毎にフローサイトメトリによって評価した。CD8特異的T細胞エンゲージャ、MCAZ 7.1及びMCAZ 7.1バリエーションは双方とも、非ホジキンリンパ腫ドナー由来のPBMC上で類似した強いCD20+B細胞死を示し、そしてCD8 T細胞に偏った強い活性化を確認した(図24A~図24F)。

20

【0099】

試験した多数の結合タンパク質フォーマットに基づいて、IgG Fcを用いて、ヒンジ領域に位置する別々のアーム上にTCR結合ドメイン及びT細胞共刺激ドメインを含む新規の高次構造を有する結合タンパク質を特定した。この結合タンパク質は、有利には、腫瘍標的細胞(非特異的T細胞活性化)の不在下で、そして腫瘍標的細胞の存在下での溶解活性の間に、インビトロ及びインビボの双方で細胞溶解活性を増大させ、且つサイトカイン放出の発生率を引き下げた。加えて、本明細書中で開示される結合フォーマットは、幅広いCD3エンゲージャと比較して、CD4係合の引下げを実現し、(i) Treg活性化及び増殖を制限すること、そしてCD8細胞溶解性T細胞上の潜在的抑制活性を制限すること、並びに(ii)他のCD4 T細胞サブセット(Th1、Th2、Th9、TH17)(全てが、サイトカイン放出症候群事象のドライバであることが示されているもの)の係合を引き下げることを含む。

30

【0100】

本明細書中に実例として記載される態様は、好適には、本明細書中で具体的に開示されていない何らかの1つ又は複数の要素、1つ又は複数の限定の不在下で実施することができる。使用されている用語及び表現は、限定としてではなく説明の用語として用いられるものであり、そのような用語及び表現の使用において、示され、且つ記載される特徴又はその一部のいかなる均等物も除外することを意図するものではなく、特許請求される態様の範囲内で種々の修正が可能であることが認識される。ゆえに、本説明は、態様によって具体的に開示されているが、当業者であれば、本明細書中で開示される概念の任意選択の特徴、修正、及び変形に依ることができ、そのような修正及び変形は、明細書及び添付の特許請求の範囲によって定義されるこれらの態様の範囲内にあるとみなされることを理解されたい。本明細書中では、本開示の一部の態様が特に有利であると特定される場合があるが、本開示は、本開示のこの特定の態様に限定されないことが企図される。

40

【0101】

50

群の1つ以上のメンバー間に「又は」を含む請求項又は明細書は、反対の意味が記載されているか又は文脈から別段の解釈が明らかとならない限り、その群のメンバーの1つ、複数、又は全てが、所与の製品又はプロセスに存在するか、使用されるか、又はそうでなければ関連している場合に満たされるとみなされる。本開示は、その群のメンバーの厳密に1つが、所与の製品又はプロセスに存在するか、使用されるか、又はそうでなければ関連している態様を含む。本開示は、その群のメンバーの複数又は全てが、所与の製品又はプロセスに存在するか、使用されるか、又はそうでなければ関連している態様を含む。

【0102】

さらに、本開示は、列挙される1つ以上の請求項からの1つ以上の限定、要素、節、及び説明用語が別の請求項に導入される、全ての変形、組合せ、及び置換を包含する。例えば、別の請求項に従属するいかなる請求項も、ベースとなる同じ請求項に従属する他の任意の請求項に見出される1つ以上の限定を含むように修正することができる。要素が例えばマーカッシュ群形式のリストとして提示される場合、要素の各サブグループも開示され、またいかなる要素もその群から除くことができる。

10

【0103】

一般に、本開示又は本開示の態様が、特定の要素及び/又は特徴を含むと言及されている場合、本開示の特定の態様又は本開示の態様は、そのような要素及び/又は特徴からなるか、又はそれから実質的になると理解されたい。簡潔にするために、それらの態様は、本明細書中で具体的にこれらの言葉で説明されていない。

20

【0104】

30

40

50

【表 1】

配列番号	説明	配列
1	MCAZ6.9軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
2	MCAZ6.9重鎖1	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT.E VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFL GWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGR FTISRDESKNMVYLMNSLKPEDTAVYFCRAF RIYPTYDYWGQGLVTVSS.GEGTSTGSGAIPVSL RSGSGSGGAEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLL VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQ KLSLSLSPGK
3	MCAZ6.9重鎖2	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTG GSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDD YAIGWFRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPV KGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDAAYYYC AAGSLYTCVQSIWPARPYDMDYWGKGTQV TVSSAAAYPYDVPDYGS.GEGTSTGSGAIPVSLR GSGSGSGGAEPKSVDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK

10

20

30

40

【 0 1 0 5 】

【表 2】

		GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	
1	MCAZ6.10軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQOKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	10
2	MCAZ6.10重鎖1	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF K GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLG WYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRF TISRDESKNMVYLMNSLKPEDTAVYFCRAFSR IYPDYWGQGLVTVSS.GEGTSTGSGAIPVSLR GSGGSGGAEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVF LFPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLV SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQK SLSLSPGK	20
4	MCAZ6.10重鎖2	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF K GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTG GS.EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS HWMTWFRQAPGKGLEWVAHIKEDGSEKYYED SVEGRFTVSRDNAKNSVYLMNSLRAEDTAVY YCARGGDGYSDFHGVVDVWGQTTVTVSS.GE GTSTGSGAIPVSLRSGGSGGAEPKSVDKTHTCP PCPAPEFEGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPETCV	30 40

【 0 1 0 6 】

【表 3】

		VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
1	MCAZ 88輕鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
5	MCAZ 88重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINF LGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKG RFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAF SRIYPYDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGS QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF K GKATLTADKSSSTAYMQLSSTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
1	MCAZ 89輕鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
6	MCAZ 89重鎖	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDY AIGWFRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVK GRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDAAVYYCA AGSLYTCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQVT

10

20

30

40

【 0 1 0 7 】

【表 4】

		VSSAAAYPYDVPDYGSGGGGSGGGSGGGSSQVQ LQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMH WVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGK ATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARST YYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKLSLSPGK	10
1	MCAZ 7.5軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	20
7	MCAZ 7.5重鎖1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINF LGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKG RFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAF SRIYPYDYWGQGLVTVSSGEGTSTGSGGSGGS GGAEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPR EPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFTQKLSL SPGK	30
8	MCAZ 7.5重鎖2	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTG GSGEGTSTGSGGSGGSGGAEPKSVDKTHTCPPC PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV	40

【 0 1 0 8 】



【表 6】

		AEPKSVDKTHTCPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPK DTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK	
1	MCAZ 10.3軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	10
11	MCAZ 10.3重鎖1	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDY AIGWFRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVK GRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDAAVYYCA AGSLYTCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQVT VSSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHK INFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSA KGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCR AFSRIYPDYWGQGLVTVSSGEPKSSDKTHTC PPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNKEYKCKVSN KALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEM TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNRFQKSLSLSPGK	20
12	MCAZ 10.3重鎖2	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKGEP KSVDKTHTCPPCPAPEFEGGSPVFLFPPKPKDTL MISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV	30 40

【 0 1 1 0 】

【表 7】

		KSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	
1	MCAZ 7.7軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	10
13	MCAZ 7.7重鎖1	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCV ASGDVHKINFLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQ TDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPE DTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGLVTVSSGEGT STGSGAIPVSLRGSGGSGGAEPKSSDKTHTCPPC PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASEIKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTK NQVLSCAVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	20
14	MCAZ 7.7重鎖2	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSST LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTG GSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDD YAIGWFRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPV KGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDAAVYYC AAGSLYTCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQV TVSSGEGTSTGSGAIPVSLRGSGGSGGAEPKSD KHTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY	30 40

【 0 1 1 1 】

【表 8】

		KCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
1	MCAZ 10.1軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	10
15	MCAZ 10.1重鎖1	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKNIFLG WYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRF TISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSR IYPYDYWGQGTLLTVSSGEPKSVDKTHTCPPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	20
16	MCAZ 10.1重鎖2	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKQV QLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIG WFRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVKGRF TISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDAAVYYCAAGS LYTCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQVTVSSG EPKSVDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREP	30 40

【 0 1 1 2 】

【表 9】

		QVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
17	MCAZ 8.71軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGSGGGGSQVQ LQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGW FRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVKGRFTI SSDNAKNTVYLQMNSLKPEDAAVYYCAAGSLY TCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQVTVSS
18	MCAZ 8.71重鎖	QVQLQPPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKNIFLG WYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRF TISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSR IYPYDYWGQGLVTVSSGEGTSTGSGAIPVSLR GSGGSGGAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWIYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KLSLSLSPGK
1	MCAZ 8.81軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

【 0 1 1 3 】



【表 1 1】

		NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	
1	MCAZ 8.70軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	10
21	MCAZ 8.70重鎖	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVVYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLG WYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRF TISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSR IYPYDYWGQGTLLTVSSGEGTSTGSGAIPVSLR GSGGSGGAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	20 30
1	TENG0093軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	
22	TENG0093重鎖1	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVVYCA	40

【 0 1 1 5】

【表 1 2】

		RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKIN FLGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAK GRFTISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRA FSRIYPDYWGQGLVTVSSGGGGSTHTCPPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNRFTQKLSLSPGK	10
23	TENG0093重鎖2	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTGG SQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDY AIGWFRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVK GRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDAAVYYCA AGSLYTCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQVT VSSGGGGSTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETCVVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGDSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSL SPGK	20 30
25	ポリペプチド1 CD3xCD20二価 エンゲージャ	VQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWI NWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFK GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR NVFDGYWLVYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCV VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN	40

【 0 1 1 6】



【表 1 4】

		SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGSGGGGSQVQ LQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGW FRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVKGRFTI SSDNAKNTVYLMNSLKPEDA AVYYCAAGSLY TCVQSIVWPARYYDMDYWGKGTQVTVSS	10
30	MCAZ 11.1 重鎖	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTEV QLVEGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLG WYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRF TISRDESKNMVYLMNSLKPEDTAVYFCRAFSR IYPYDYWGQGTLVTVSSGEGTSTGSGGSGGGSGG AEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG	20
31	MCAZ 11.2 軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGSGGGGSQVQ LQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGW FRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVKGRFTI SSDNAKNTVYLMNSLKPEDA AVYYCAAGSLY TCVQSIVWPARYYDMDYWGKGTQVTVSS	30
32	MCAZ 11.2 重鎖	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV	40

【 0 1 1 8】

【表 1 5】

		FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLG WYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRF TISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSR IYPYDYWGQGLTVTVSSGEGTSTGSGGSGGSGG AERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNG KEYKCKVSNKGLPAPIEKISKTKGQPREPQVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISEWESN GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
33	MCAZ 11.3 輕鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGSGGGGSQVQ LQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGW FRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVKGRFTI SSDNAKNTVYLQMNSLKPEDAAVYYCAAGSLY TCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQVTVSS	10 20
34	MCAZ 11.3 重鎖	QVQLQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLG WYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRF TISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSR IYPYDYWGQGLTVTVSSGEGTSTGSGGSGGSGG AELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEP KSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDP EVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV SVLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDG	30 40

【 0 1 1 9】

【表 1 6】

		<p>FFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNR FTQKSLSLSPG</p>
35	MCAZ 11.4 軽鎖	<p>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQKPGSSPKWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSQVQ LQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGW FRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVKGRFTI SSDNAKNTVYLQMNSLKPEDAAVYYCAAGSLY TCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQVTVSS</p>
36	MCAZ 11.4重鎖	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF K GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLG WYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRF TISRDESKNMVYLMNSLKPEDTAVYFCRAFSR IYPYDYWGQGTLVTVSSGEGTSTGSGGSGGGSGG AESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPETCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG</p>
37	MCAZ 11.5軽鎖	<p>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQKPGSSPKWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSQVQ LQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGW FRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVKGRFTI SSDNAKNTVYLQMNSLKPEDAAVYYCAAGSLY TCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQVTVSS</p>

10

20

30

40

【 0 1 2 0】

【表 1 7】

38	MCAZ 11.5重鎖	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSY          NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF          KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA          RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV          FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW          NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS          LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTEV          QLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLG          WYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRF          TISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSR          IYPYDYWGQGTILVTVSSGEGTSTGSGGSGGSGG          AEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK          DTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD          GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD          WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRR          PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV          EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV          DKSRWQQGNVFSCSVMHGALHNHYTQKYLSPG</p>	10
39	MCAZ 11.6輕鎖	<p>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW          FQKPGSSPKPWYATSNLASGVPVRFSGSGSGT          SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT          KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL          NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS          KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL          SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGSGGGGSQVQ          LQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGW          FRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVKGRFTI          SSDNAKNTVYLQMNSLKPEDAAYYYCAAGSLY          TCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQVTVSS</p>	20
40	MCAZ 11.6重鎖	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCASGYTFTSY          NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF          KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA          RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV          FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW          NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS          LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTEV          QLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLG          WYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRF          TISRDESKNMVYLQMNSLKPEDTAVYFCRAFSR          IYPYDYWGQGTILVTVSSGESPKAQASSVPTAQP          QAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEK          EEQEERETKTPECPSTHTQPLGVYLLTPAVQDLW          LRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTG</p>	30

40

【 0 1 2 1】

【表 1 8】

		GVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTS VTCTLNHPSPQRLMALREPAAQAPVKLSLNL LASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQ REVNTSGFAPARPPPQPRSTTFWAWSVLRVPAP PSPQPATYTCVVSHEDSRLLNASRSLEVSIVTD HGPM	
41	MCAZ 11.7軽鎖	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWYIATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGGSGGGGSQVQ LQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIKW FRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVKGRFTI SSDNAKNTVYVYLMNSLKPEDAAVYYCAAGSLY TCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQVTVSS	10
42	MCAZ 11.7重鎖	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSY NMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKF K GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA RSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLG WYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRF TISRDESKNMVYVYLMNSLKPEDTAVYFCRAFSR IYPYDYWGQGTLLTVSSGEGTSTGSGGSGGGSGG TPPTPSPSTPPTPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLG EANL TCTLTGLRDASGVFTFTWTPSSGKSAVQGP PERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFCTAA YPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELAL NELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREK YLTWASRQEPSQGTTF AVTSILRVA AEDWKKG DTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNV SVVMAEVDGTCY	20 30
43	EGFR TITAN (MCAZ13.8): EGFR HCセツキシマブ +リンカー+リンカー+T CR VHH +リンカー+ リンカー+ Fcドメイン	QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSR LSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARAL TYDYEFAYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDVHKINFLGW	40

【 0 1 2 2】

【表 1 9】

		YRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGSGGSGEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLTSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFQKLSLSPGK	
44	EGFR TITAN (MCAZ13.8): EGFR VHH 9G8+ リンカー+ CD8 VHH リンカー+リンカー+ Fcドメイン	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTSSYAMGWFRQAPGKEREVVAINWSSGSTYYADSVKGRFTISRDNAMNTMYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAGYQINSIGNYFKDYEDYWGQGTQVTVSSTGGSQVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDAAVYYCAAGSLYTCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQVTVSSGGGGSGGGSGSEPKSVDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK	10 20
45	EGFR TITAN (MCAZ13.8): EGFR LCセツキシマブ	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFRNGEC	
46	リンカー	TGGS	30
47	リンカー	GGGS	
48	リンカー	AAAYPYDVPDYGSGEGTSTGSGGSGGSGGA	
49	リンカー	GEGTSTGSGGSGGSGGA	
50	TCR VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCVASGDVHKINF LGWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTDYADSAKGRFTISRDESKNMVYLMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIYPYDYWGQGTLLTVSS	
51	CD8 VHH	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDY AIGWFRQAPGKEREGVSCIRVSDGSTYYADPVKGRFTISSDNAKNTVYLMNSLKPEDAAVYYCAAGSLYTCVQSIVWPARPYDMDYWGKGTQVT VSS	40

【 0 1 2 3】

10

20

30

40

50

【表 2 0】

52	Fcドメイン	APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	EGFR VHH 9G8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSYA MGWFRQAPGKEREFVVAINWSSGSTYYADSVK GRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCA AGYQINSGNYNFKDYEYDYWGQGTQVTVSS
54	EGFR HCセツキシマブ	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFSTR LSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARAL TYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFLPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKVK
55	リンカー	EPKSCDK
56	リンカー	EPKSSDKTHTCPPCP

10

【図 面】

20

【図 1】

【図 2 A - 2 B】

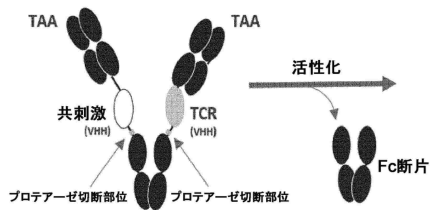
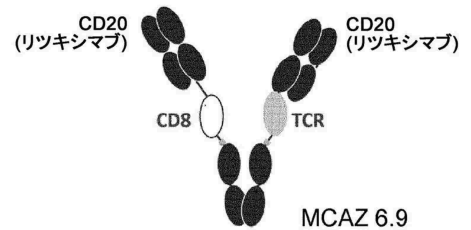


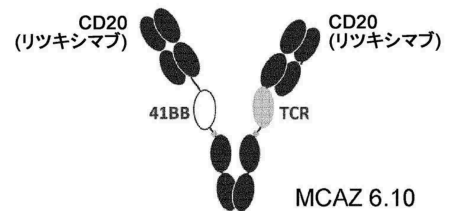
図1

図2A



30

図2B



40

50

【 図 3 A - 3 B 】

【 図 3 C 】

図3A

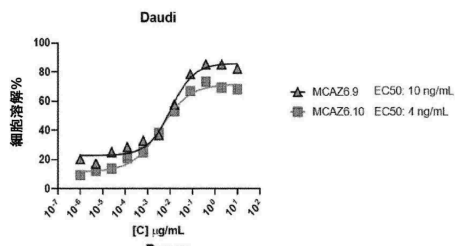


図3B

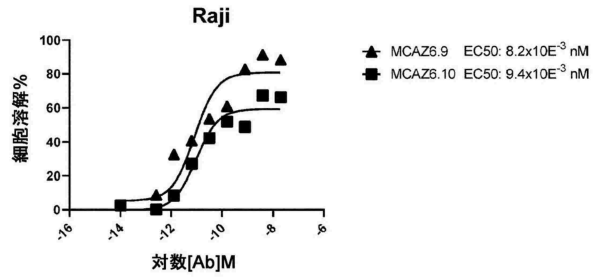
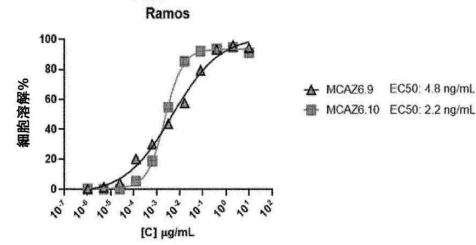


図3C

10

【 図 4 A - 4 B 】

【 図 5 A - 5 B 】

20

図4A

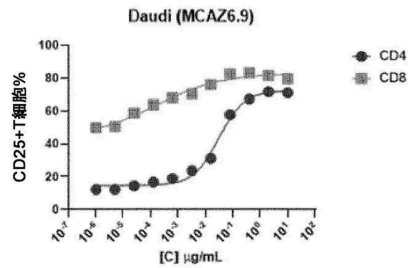
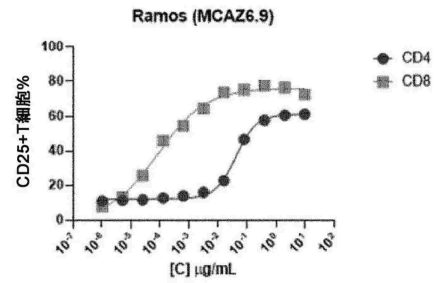


図5A



30

図4B

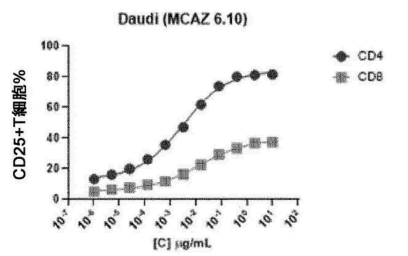
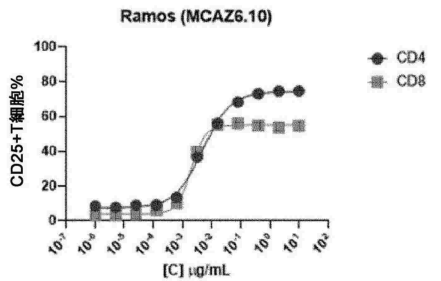


図5B



40

50

【 図 6 】

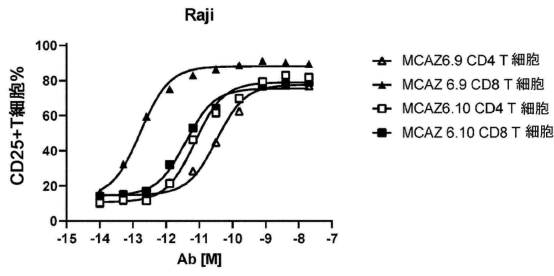


図6

【 図 7 A - 7 C 】

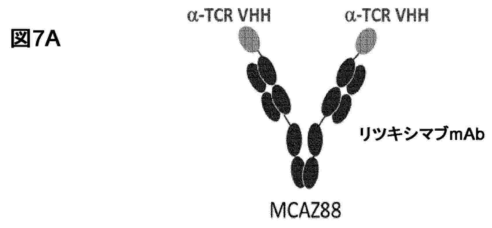


図7A

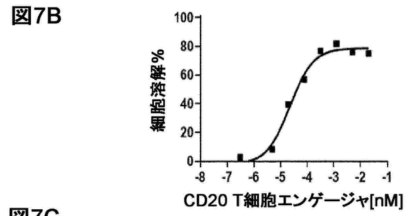


図7B

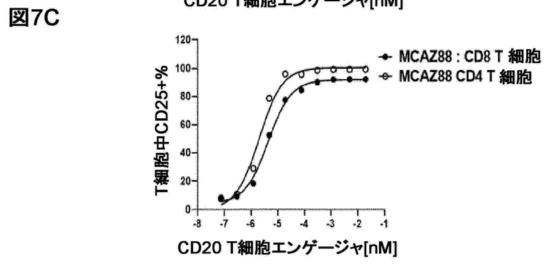


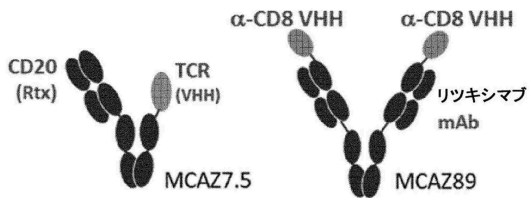
図7C

10

20

【 図 8 A 】

図8A



【 図 8 B - 8 C 】

図8B

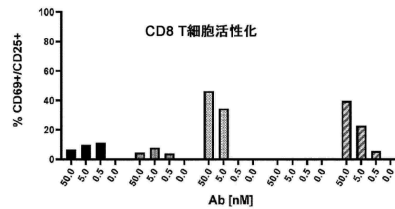
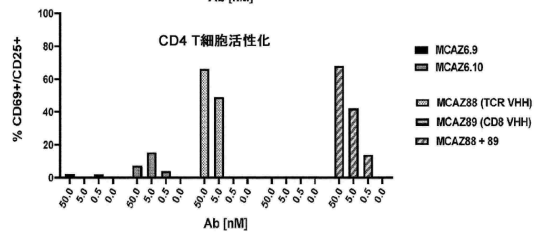


図8C

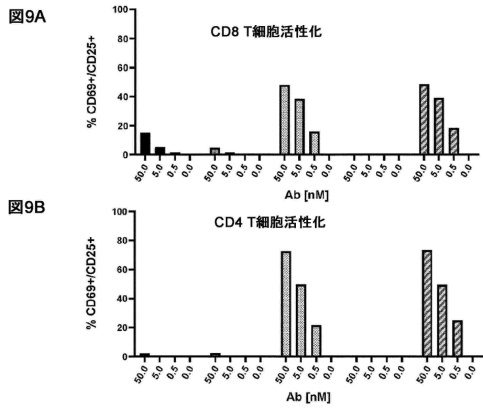


30

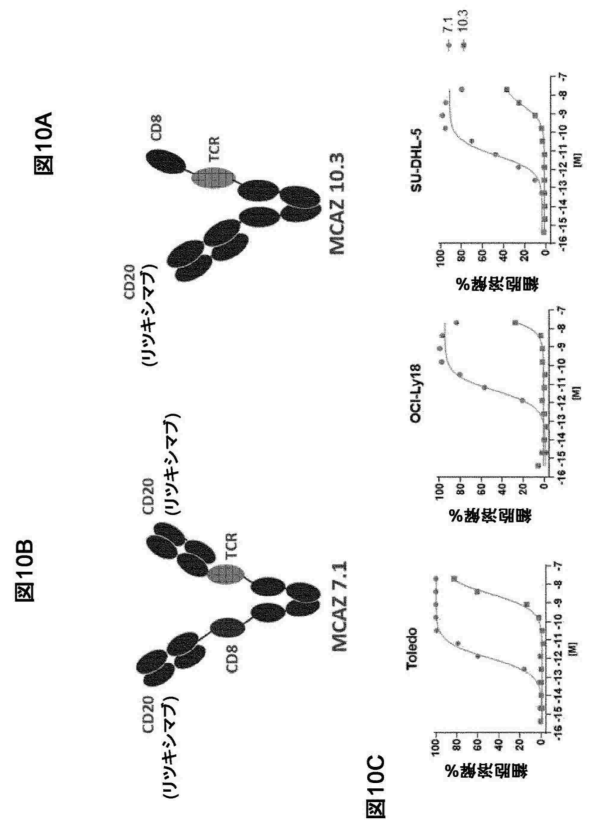
40

50

【 図 9 A - 9 B 】



【 図 10 A - 10 C 】



【 図 10 D - 10 E 】

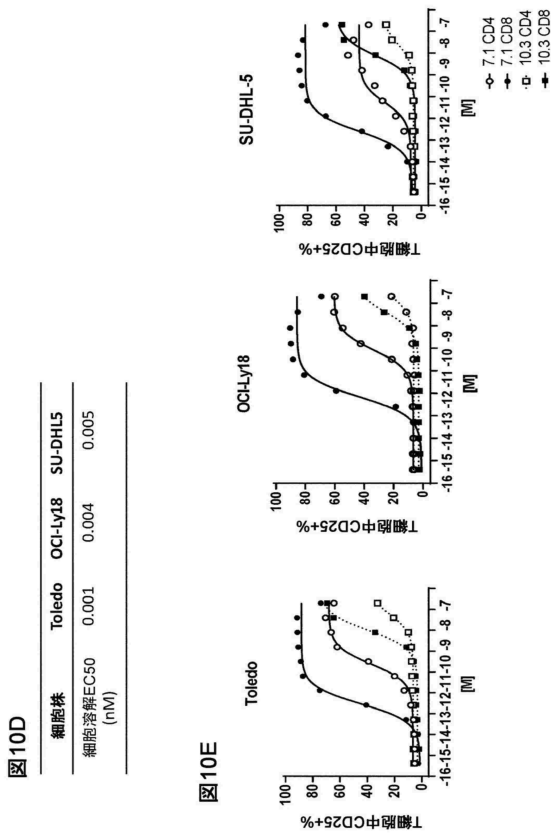


図 10D

細胞株	Toledo	OCI-Ly18	SU-DHL5
細胞溶解EC50 (nM)	0.001	0.004	0.005

図 10E

【 図 11 A - 11 B 】

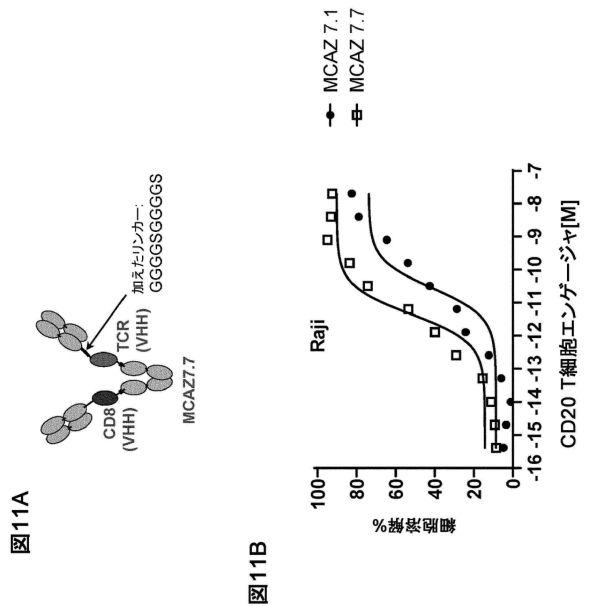


図 11A

図 11B

10

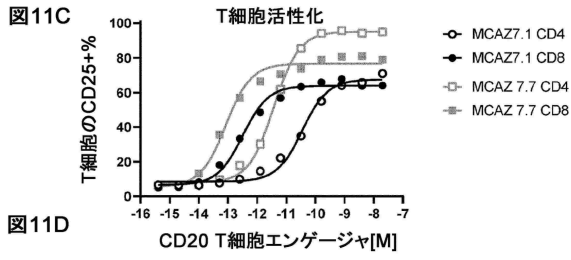
20

30

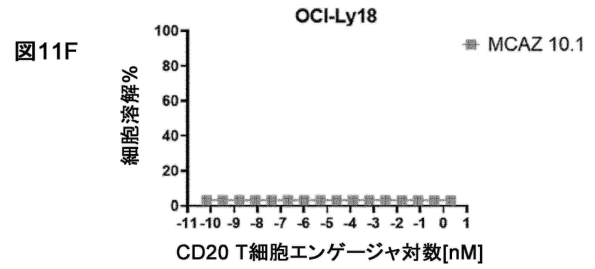
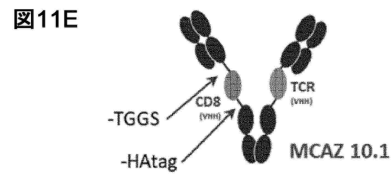
40

50

【 図 1 1 C - 1 1 D 】



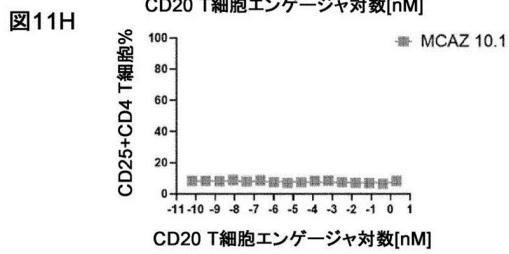
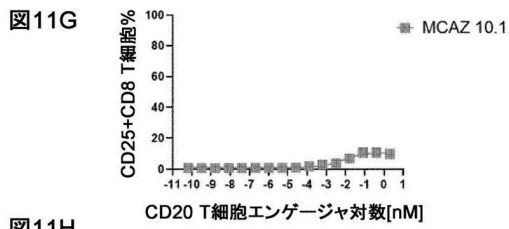
【 図 1 1 E - 1 1 F 】



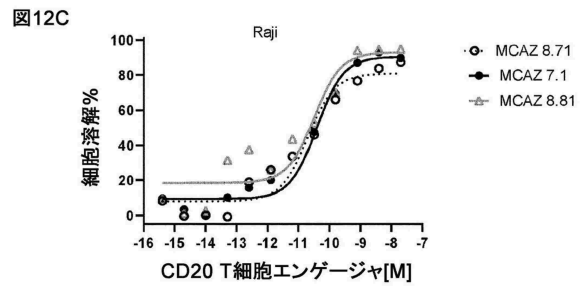
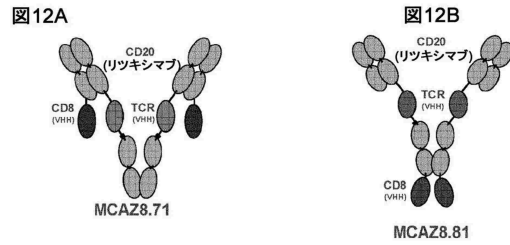
10

20

【 図 1 1 G - 1 1 H 】



【 図 1 2 A - 1 2 C 】



30

40

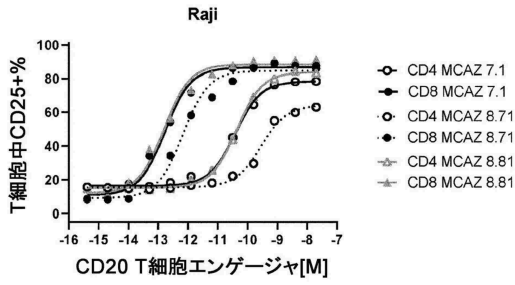
50

【 図 1 2 D - 1 2 E 】

図12D

T細胞エンゲージャ	MCAZ 7.1	MCAZ 8.71	MCAZ 8.81
細胞溶解EC50(nM)	0.004	0.002	0.003

図12E



【 図 1 3 A - 1 3 C 】

図13A

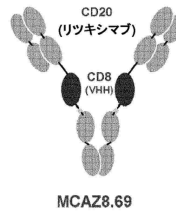


図13B

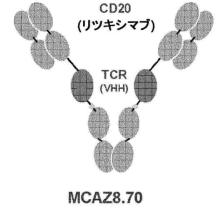
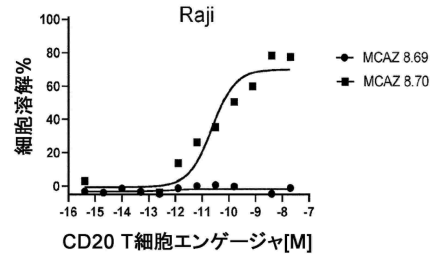


図13C



10

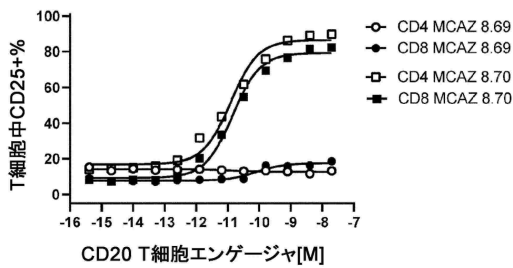
20

【 図 1 3 D - 1 3 E 】

図13D

T細胞エンゲージャ	MCAZ 8.69	MCAZ 8.70
細胞溶解EC50(nM)	0.002	N/A

図13E



【 図 1 4 A - 1 4 B 】

図14A

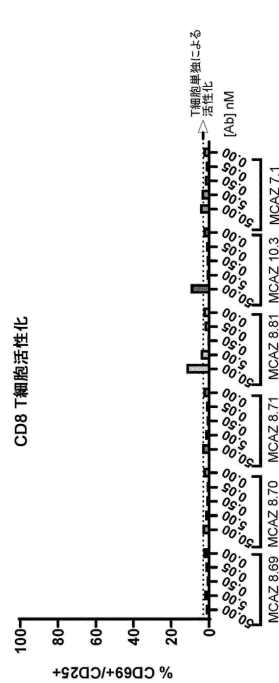
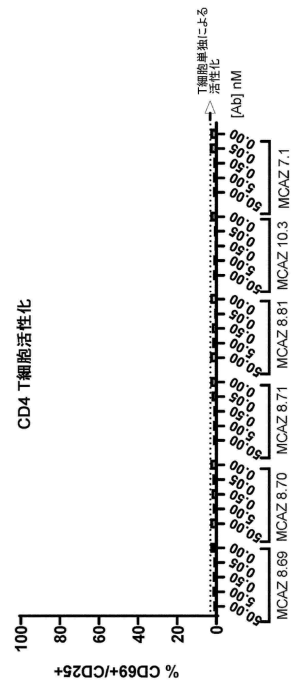


図14B



30

40

50

【 図 15 A 】

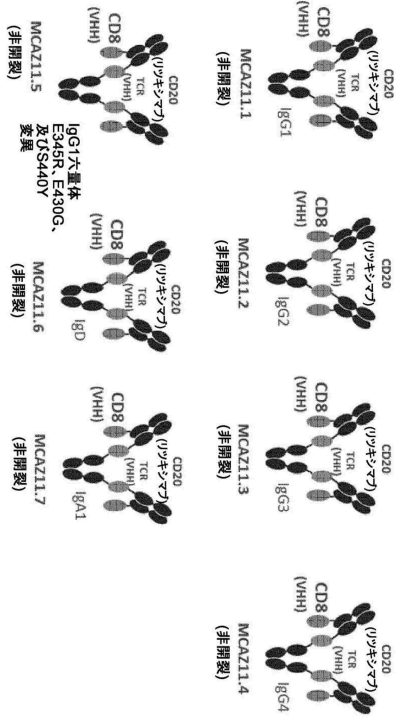
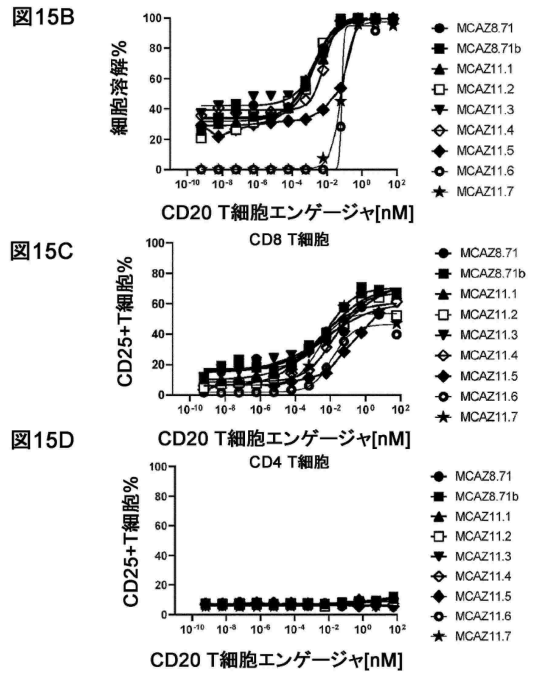


図15A

【 図 15 B - 15 D 】



10

20

【 図 16 A - 16 C 】

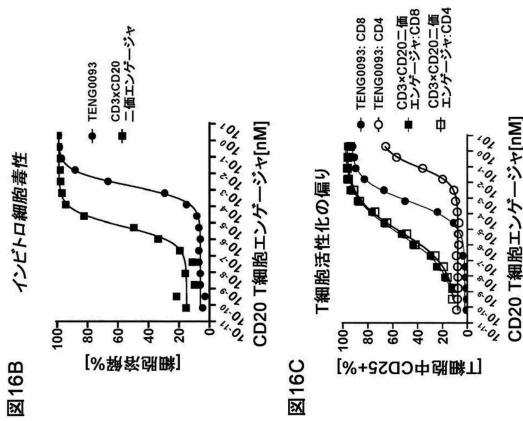


図16B

図16C

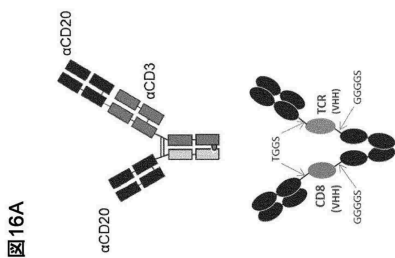


図16A

【 図 17 A - 17 B 】

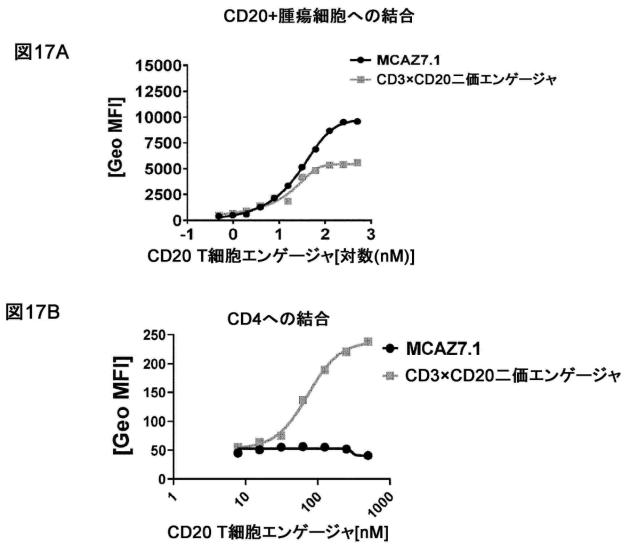


図17A

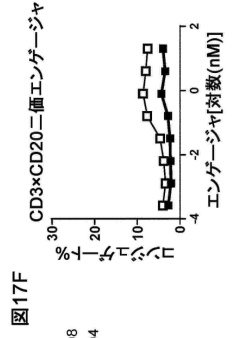
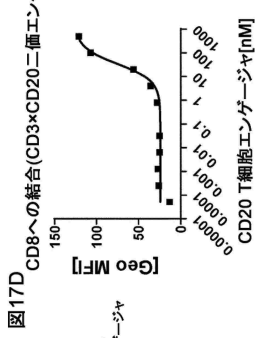
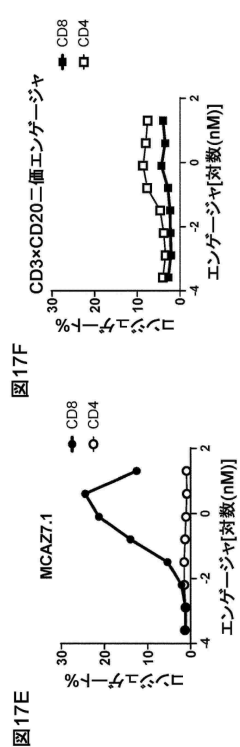
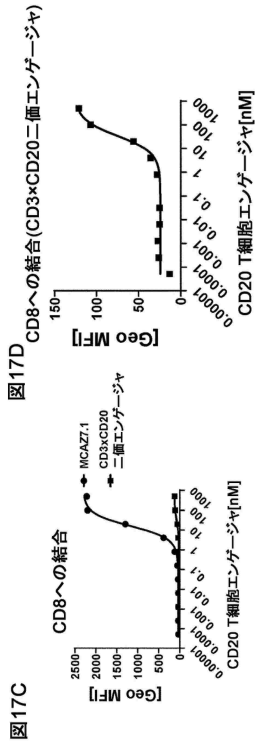
図17B

30

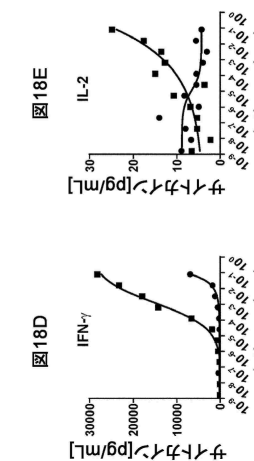
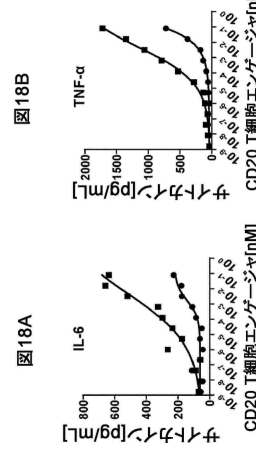
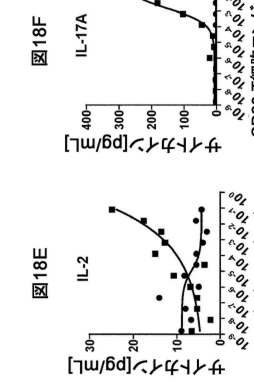
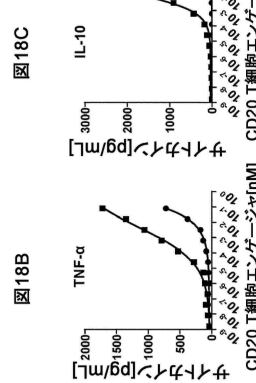
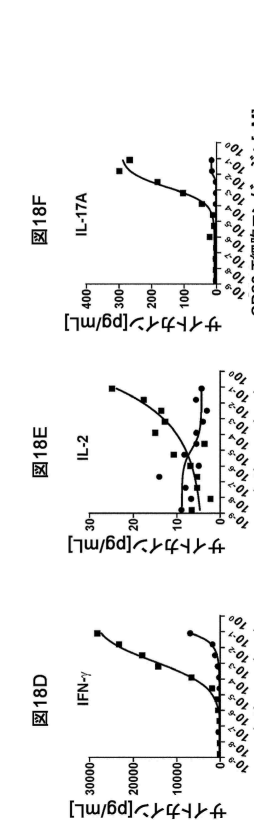
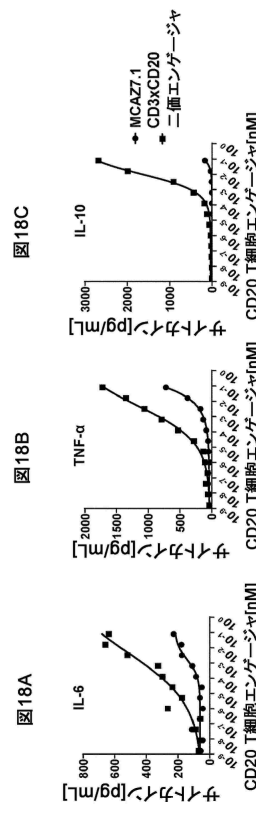
40

50

【 図 17 C - 17 F 】



【 図 18 A - 18 F 】



【 図 19 A 】

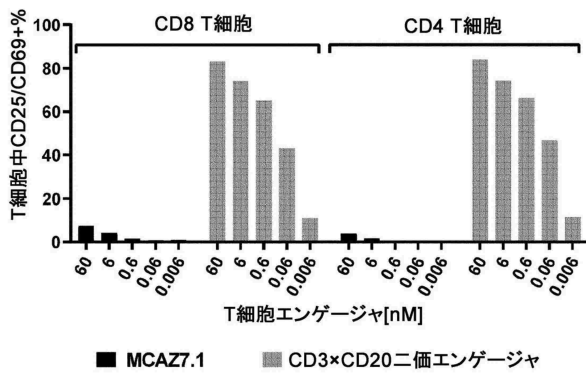


図 19A

【 図 19 B 】

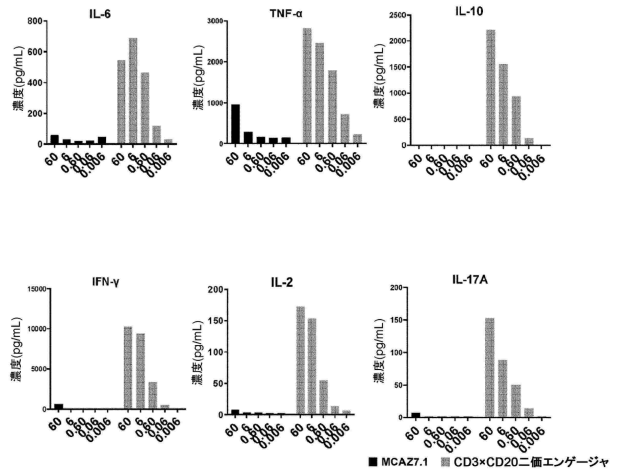


図 19B

10

20

30

40

50

【 図 2 0 A - 2 0 B 】

図20A

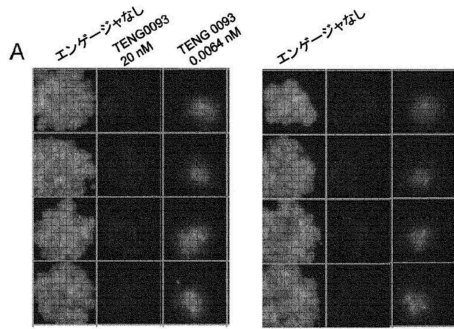
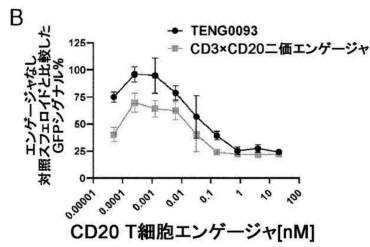


図20B



【 図 2 1 】

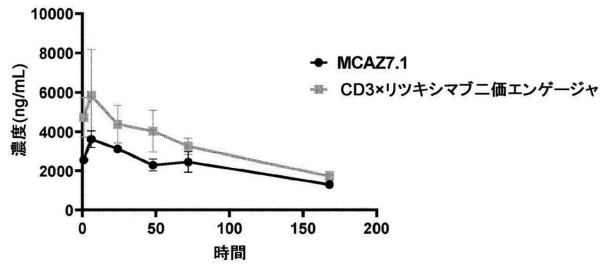


図21

10

20

【 図 2 2 】

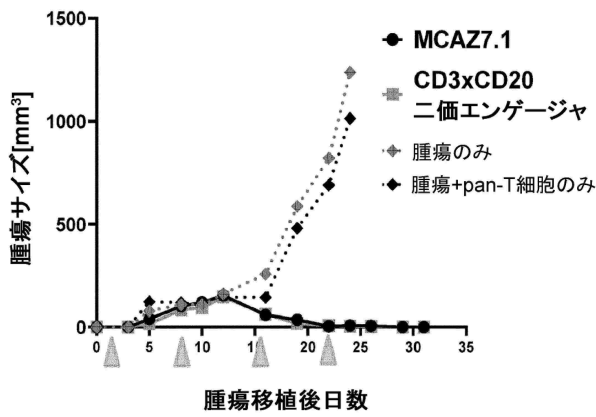
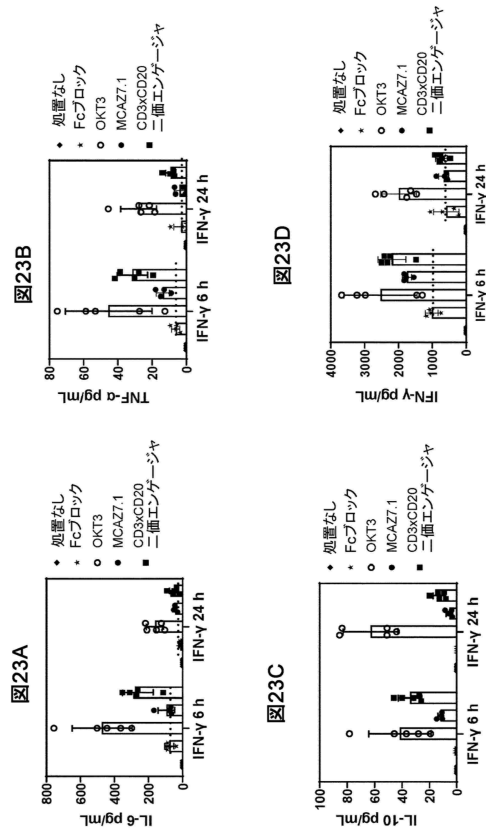


図22

【 図 2 3 A - 2 3 D 】

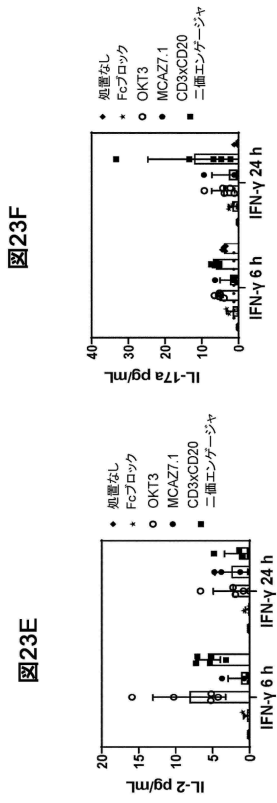


30

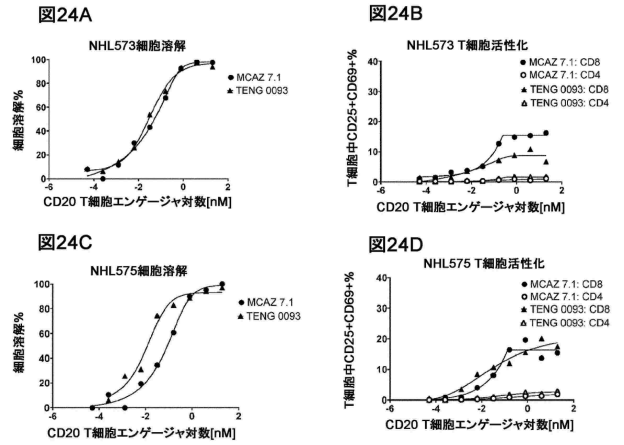
40

50

【 図 2 3 E - 2 3 F 】



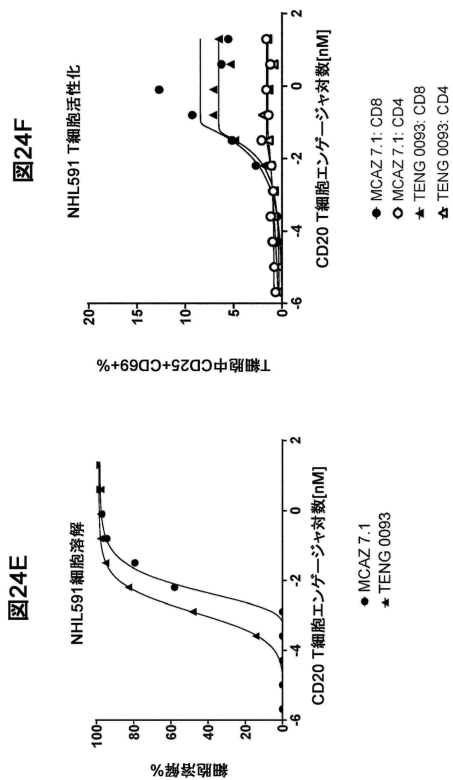
【 図 2 4 A - 2 4 D 】



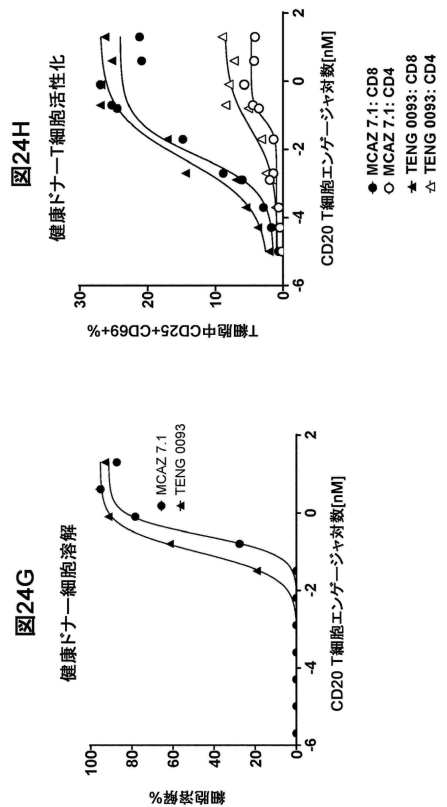
10

20

【 図 2 4 E - 2 4 F 】



【 図 2 4 G - 2 4 H 】



30

40

50

【 図 2 5 A - 2 5 B 】

【 図 2 6 A - 2 6 B 】

図25A

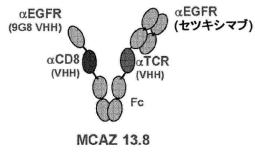


図25B

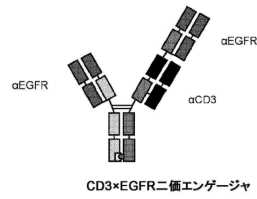


図26A

NCIH196(EGFR高)への結合

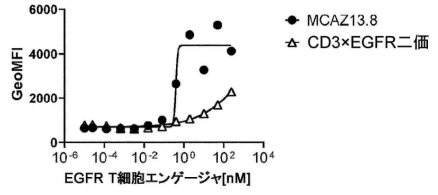
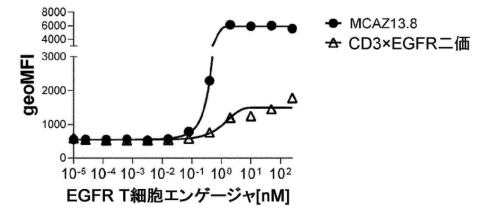


図26B

MDA-MB-231(EGFR中程度)への結合



10

【 図 2 7 A - 2 7 B 】

【 図 2 8 A - 2 8 E 】

20

図27A

インビトロ細胞毒性(NCIH196-EGFR高)

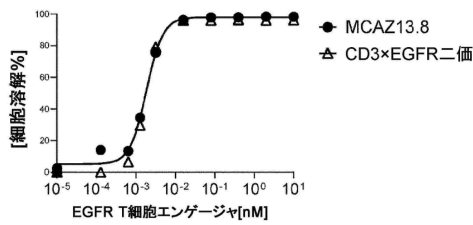


図27B

T細胞活性化の偏り(NCIH196-EGFR高)

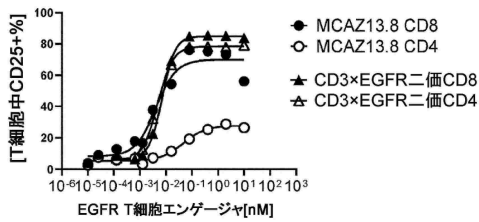


図28A

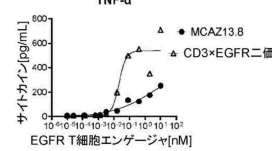


図28B

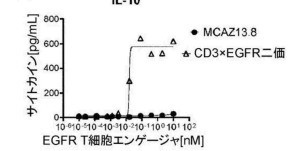


図28C

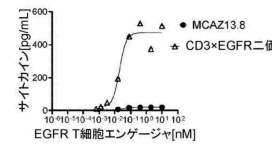


図28D

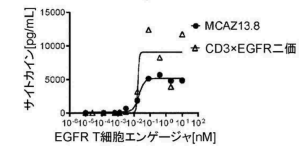
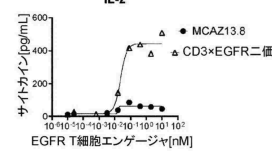


図28E



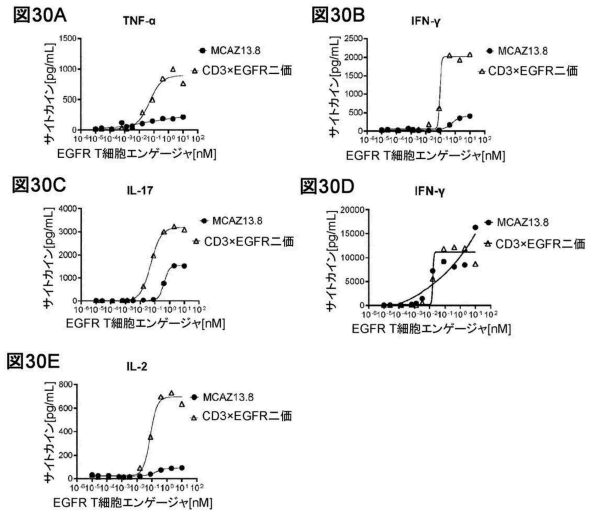
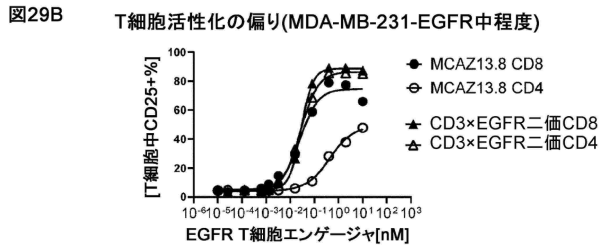
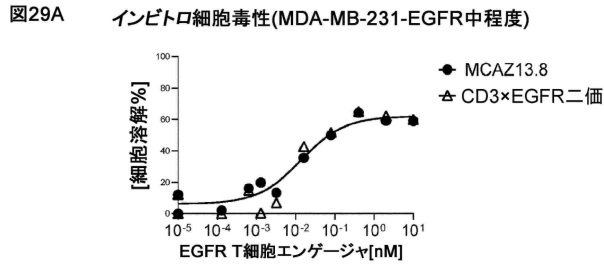
30

40

50

【 図 2 9 A - 2 9 B 】

【 図 3 0 A - 3 0 E 】

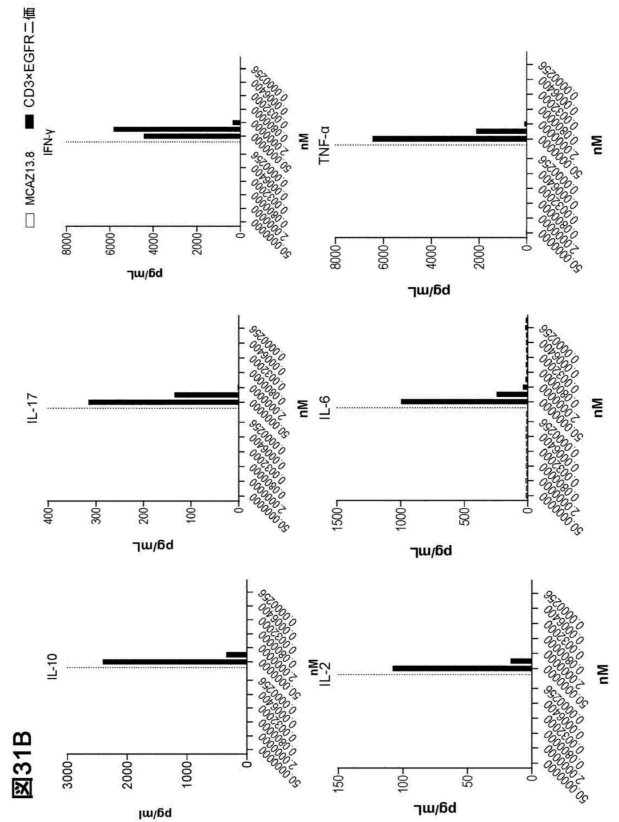
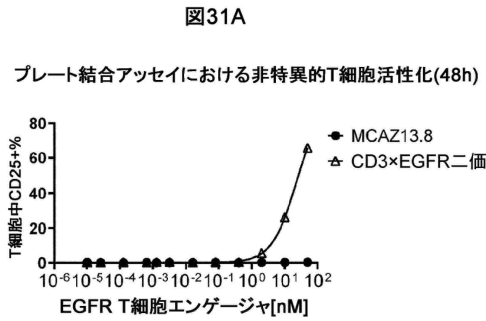


10

【 図 3 1 A 】

【 図 3 1 B 】

20

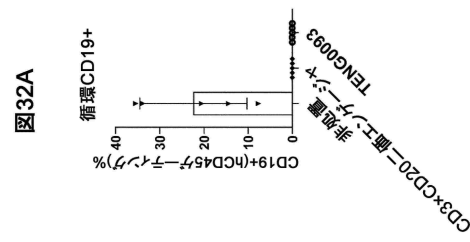
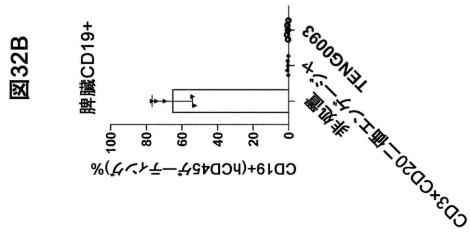
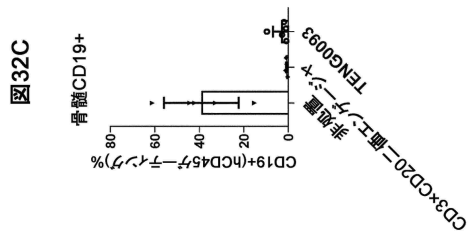


30

40

50

【 図 3 2 A - 3 2 C 】



10

20

【 配 列 表 】

2025512953000001.xml

30

40

50

【 国際調査報告 】

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP2023/059278

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.	<input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed.
b.	<input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
	<input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.	<input type="checkbox"/> 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:

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
**PCT/EP2023/059278**

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

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

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

10

20

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

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

**see additional sheet**

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

30

40

**Remark on Protest**

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No <b>PCT/EP2023/059278</b>
--

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. C07K16/28 A61P35/02		
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>C07K A61P A61K</b>		
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) <b>EPO-Internal, WPI Data</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/105450 A2 (XENCOR INC [US]) 30 June 2016 (2016-06-30)	1-33
Y	The whole document, in particular, Fig.1, Fig.3B, para.345 -----	1-10,12, 17-33
Y	WO 2019/191120 A1 (SYSTIMUNE INC [US]; SICHUAN BAILI PHARMACEUTICAL CO LTD [CN]) 3 October 2019 (2019-10-03) figure 2A -----	1-33
Y	WO 2019/005640 A2 (SYSTIMUNE INC [US]; SICHUAN BAILI PHARMACEUTICAL CO LTD [CN]) 3 January 2019 (2019-01-03) figure 1 -----	1-33
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search <b>8 September 2023</b>	Date of mailing of the international search report <b>18/09/2023</b>	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <b>Chapman, Rob</b>	

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

page 1 of 2

10

20

30

40

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2023/059278
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/005639 A2 (SYSTIMMUNE INC [US]; SICHUAN BAILI PHARMACEUTICAL CO LTD [CN]) 3 January 2019 (2019-01-03) figure 1 -----	1-33
X	WO 2019/126398 A1 (SURROZEN INC [US]) 27 June 2019 (2019-06-27)	11,12, 14-16
Y	The whole document, in particular, Figure 1 -----	1-33
A	WU X & DEMAREST S J ED - WU X & DEMAREST S J: "Building blocks for bispecific and trispecific antibodies", METHODS,, vol. 154, 28 August 2018 (2018-08-28), pages 3-9, XP002801879, The whole document, in particular, Fig.2 and section 3 -----	1
Y	SCHOONJANS R ET AL: "Fab chains as an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILLIAMS & WILKINS CO, US, vol. 165, no. 12, 15 December 2000 (2000-12-15), pages 7050-7057, XP002207879, ISSN: 0022-1767 the whole document -----	12
A	ULRICH BRINKMANN ET AL: "The making of bispecific antibodies", MABS, vol. 9, no. 2, 10 January 2017 (2017-01-10), pages 182-212, XP055531122, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2016.1268307 figure 2 -----	1-33

2

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

page 2 of 2

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/059278

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016105450 A2	30-06-2016	EP 3237449 A2	01-11-2017
		US 2016355600 A1	08-12-2016
		US 2019352416 A1	21-11-2019
		US 2023086017 A1	23-03-2023
		WO 2016105450 A2	30-06-2016
WO 2019191120 A1	03-10-2019	AU 2019243448 A1	24-09-2020
		AU 2019243453 A1	24-09-2020
		CA 3094996 A1	03-10-2019
		CA 3094997 A1	03-10-2019
		CN 111527108 A	11-08-2020
		CN 111566127 A	21-08-2020
		EP 3773621 A1	17-02-2021
		EP 3774918 A1	17-02-2021
		IL 271325 A	30-01-2020
		IL 271348 A	30-01-2020
		JP 2021519072 A	10-08-2021
		JP 2021519289 A	10-08-2021
		KR 20200135935 A	04-12-2020
		KR 20200139130 A	11-12-2020
		RU 2020108447 A	27-04-2022
		RU 2020108448 A	27-04-2022
		SG 11202008470W A	29-10-2020
		SG 11202008474Q A	29-10-2020
		TW 201945013 A	01-12-2019
		TW 202003037 A	16-01-2020
US 2021008113 A1	14-01-2021		
US 2021024630 A1	28-01-2021		
WO 2019191120 A1	03-10-2019		
WO 2019191125 A1	03-10-2019		
WO 2019005640 A2	03-01-2019	AU 2018295119 A1	06-02-2020
		CA 3068049 A1	03-01-2019
		CN 110799540 A	14-02-2020
		EP 3645048 A2	06-05-2020
		IL 271260 A	30-01-2020
		JP 2020530306 A	22-10-2020
		KR 20200092302 A	03-08-2020
		RU 2020102663 A	27-07-2021
		SG 11201912865V A	30-01-2020
		US 2020157224 A1	21-05-2020
		WO 2019005640 A2	03-01-2019
WO 2019005639 A2	03-01-2019	AU 2018295118 A1	06-02-2020
		CA 3068045 A1	03-01-2019
		CN 110831973 A	21-02-2020
		CN 116041530 A	02-05-2023
		CN 116199785 A	02-06-2023
		EP 3645049 A2	06-05-2020
		IL 271257 A	30-01-2020
		JP 2020530777 A	29-10-2020
		KR 20200092301 A	03-08-2020
		RU 2020102662 A	27-07-2021
		SG 11201912864S A	30-01-2020
		US 2022002406 A1	06-01-2022
WO 2019005639 A2	03-01-2019		
WO 2019126398 A1	27-06-2019	AU 2018393073 A1	02-07-2020

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

**PCT/EP2023/059278**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CA 3085782 A1	27-06-2019
		CN 111727203 A	29-09-2020
		EP 3732201 A1	04-11-2020
		JP 7330977 B2	22-08-2023
		JP 2021506297 A	22-02-2021
		JP 2023113950 A	16-08-2023
		WO 2019126398 A1	27-06-2019
-----			

10

20

30

40

50

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10 (completely); 17-33 (partially)

A binding protein comprising four polypeptide chains that form two tumor-associated antigen binding sites, a T cell receptor binding site, and a T cell co-stimulatory molecule binding site, wherein the first and second polypeptide chains have a structure represented by the formula: VL-CL and a third polypeptide chain has a structure represented by the formula: VH1-CH1-VH2-Fc and a fourth polypeptide chain has a structure represented by the formula: VH1-CH1-VH3-Fc wherein: VL is an immunoglobulin light chain variable domain that specifically binds a tumor-associated antigen; VH1 is an immunoglobulin heavy chain variable domain that specifically binds a tumor-associated antigen; CL is an immunoglobulin light chain constant domain that specifically binds a tumor-associated antigen; CH1 is an immunoglobulin CH1 heavy chain constant domain that specifically binds a tumor-associated antigen; VH2 is a heavy chain variable domain that specifically binds a T cell receptor; VH3 is a heavy chain variable domain that specifically binds T cell co-stimulatory molecule; and Fc is CH2 and CH3 immunoglobulin heavy chain constant domains.

---

2. claims: 11 (completely); 14-33 (partially)

A binding protein comprising four polypeptide chains that form two tumor-associated antigen binding sites, a T cell receptor binding site, and a T cell co-stimulatory molecule binding site, wherein two polypeptide chains have a structure represented by the formula: VL-CL and two polypeptide chains have a structure represented by the formula: III1-VH1-CH1-VH2-Fc-III2 wherein: VL is an immunoglobulin light chain variable domain that specifically binds a tumor-associated antigen; VH1 is an immunoglobulin heavy chain variable domain that specifically binds a tumor-associated antigen; CL is an immunoglobulin light chain constant domain that specifically binds a tumor-associated antigen; CH1 is an immunoglobulin CH1 heavy chain constant domain that specifically binds a tumor-associated antigen; VH2 is a heavy chain variable domain that specifically binds a T cell receptor; Fc is CH2 and CH3 immunoglobulin heavy chain constant domains; III1 and III2 are each independently a heavy chain variable domain that specifically binds a T cell co-stimulatory molecule or are absent; wherein at least one of III1 and III2 is a heavy chain variable domain that specifically binds a T cell co-stimulatory molecule.

---

3. claims: 12 (completely); 14-33 (partially)

10

20

30

40

50

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A binding protein comprising four polypeptide chains that form two tumor-associated antigen binding sites, a T cell receptor binding site, and a T cell co-stimulatory molecule binding site, wherein two polypeptide chains have a structure represented by the formula: III1-VL-CL-II2 and two polypeptide chains have a structure represented by the formula: VH1-CH1-VH2-Fc wherein: VL is an immunoglobulin light chain variable domain that specifically binds a tumor-associated antigen; VH1 is an immunoglobulin heavy chain variable domain that specifically binds a tumor-associated antigen; CL is an immunoglobulin light chain constant domain that specifically binds a tumor-associated antigen; CH1 is an immunoglobulin CH1 heavy chain constant domain that specifically binds a tumor-associated antigen; VH2 is a heavy chain variable domain that specifically binds a T cell receptor; Fc is CH2 and CH3 immunoglobulin heavy chain constant domains; III1 and II2 are each independently a heavy chain variable domain that specifically binds a T cell co-stimulatory molecule or are absent; wherein at least one of III1 and II2 is a heavy chain variable domain that specifically binds a T cell co-stimulatory molecule.

10

20

## 4. claims: 13(completely); 14-33(partially)

A binding protein comprising three polypeptide chains that form two tumor-associated antigen binding sites, a T cell receptor binding site, and a T cell co-stimulatory molecule binding site, wherein the first polypeptide chain has a structure represented by the formula: VL-CL and a second polypeptide chain has a structure represented by the formula: VH1-CH1-VH2-Fc and a third polypeptide chain has a structure represented by the formula: VH1-VH3-Fc wherein: VL is an immunoglobulin light chain variable domain that specifically binds a tumor-associated antigen; VH1 is an immunoglobulin heavy chain variable domain that specifically binds a tumor-associated antigen; CL is an immunoglobulin light chain constant domain that specifically binds a tumor-associated antigen; CH1 is an immunoglobulin CH1 heavy chain constant domain that specifically binds a tumor-associated antigen; VH2 is a heavy chain variable domain that specifically binds a T cell receptor; VH3 is a heavy chain variable domain that specifically binds T cell co-stimulatory molecule; and Fc is CH2 and CH3 immunoglobulin heavy chain constant domains.

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

## テーマコード (参考)

<b>C 1 2 N</b>	<b>15/63</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b>	<b>15/63</b>	<b>Z</b>
<b>A 6 1 K</b>	<b>48/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>48/00</b>	
<b>A 6 1 K</b>	<b>47/64</b>	<b>(2017.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>47/64</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>29/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>29/00</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>35/00</b>	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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

マシューティカルズ・リミテッド・パートナーシップ

## (72)発明者

カヤット, コリンヌ

アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州ゲイザーズパーク、ワン・メディミュン・ウェイ、メディミュン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー

## (72)発明者

シーマン, ジョナサン クリストファー ジョエル

英国シービー 2 ・ 0 エイエイ、ケンブリッジ、フランシス・クリック・アベニュー 1、ケンブリッジ・バイオメディカル・キャンパス、アストラゼネカ・ユーケイ・リミテッド内

## F ターム (参考)

4C076 AA95 CC04 CC27 EE41 EE59  
 4C084 AA13 NA14 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA22 EA28 FA74