

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7453219号  
(P7453219)

(45)発行日 令和6年3月19日(2024.3.19)

(24)登録日 令和6年3月11日(2024.3.11)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z Z N A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
請求項の数 27 (全160頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-519705(P2021-519705)	(73)特許権者	518283218
(86)(22)出願日	令和1年10月11日(2019.10.11)		インヒブリックス, インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2022-512653(P2022-512653 A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7, ラ ホーヤ, エヌ. トーリー
(43)公表日	令和4年2月7日(2022.2.7)		パインズ ロード 1 1 0 2 5, スイート 2 0 0
(86)国際出願番号	PCT/US2019/055929	(74)代理人	100078282
(87)国際公開番号	WO2020/077257		弁理士 山本 秀策
(87)国際公開日	令和2年4月16日(2020.4.16)	(74)代理人	100113413
審査請求日	令和4年10月11日(2022.10.11)		弁理士 森下 夏樹
(31)優先権主張番号	62/744,615	(74)代理人	100181674
(32)優先日	平成30年10月11日(2018.10.11)		弁理士 飯田 貴敏
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181641
(31)優先権主張番号	62/791,152		弁理士 石川 大輔
(32)優先日	平成31年1月11日(2019.1.11)		
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 P D - 1 単一ドメイン抗体およびその治療用組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

P D - 1 に特異的に結合する少なくとも 1 つの重鎖のみの可変ドメイン ( P D - 1 V H H ドメイン ) を含む、 P D - 1 結合ポリペプチド構築物であって、前記 P D - 1 V H H ドメインが、

- a ) 配列番号 2 6 8 に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域 1 ( C D R 1 ) ;  
配列番号 2 7 8 に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域 2 ( C D R 2 ) ; および  
配列番号 2 8 3 に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域 3 ( C D R 3 ) ;
- b ) 配列番号 2 7 2 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1 ;  
配列番号 2 7 8 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 2 ; および  
配列番号 2 8 3 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 3 ;
- c ) 配列番号 2 7 3 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1 ;  
配列番号 2 7 8 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 2 ; および  
配列番号 2 8 3 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 3 ; または
- d ) 配列番号 3 1 3 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1 ;  
配列番号 3 1 4 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 2 ; および  
配列番号 3 1 5 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 3

を含む、 P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【請求項 2】

P D - 1 以外の標的に結合する 1 つ以上の追加の結合ドメインを含む、請求項 1 に記載

の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【請求項 3】

P D - 1 に特異的に結合する前記 P D - 1 V H H ドメインが、P D - 1 と P D - L 1 との相互作用を遮断する、請求項 1 または 2 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【請求項 4】

前記ポリペプチドが、免疫グロブリン F c 領域を含む、請求項 3 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【請求項 5】

前記 1 つ以上の追加の結合ドメインが、共刺激分子、T 細胞表面マーカー、P D 1 以外の免疫チェックポイント、免疫細胞上の活性化受容体、腫瘍関連抗原 ( T A A )、またはサイトカイン受容体に結合する、請求項 2 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

10

【請求項 6】

前記 1 つ以上の追加の結合ドメインが、T 細胞表面マーカーに結合し、前記 T 細胞表面マーカーが、C D 8、または C D 4 である、請求項 5 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【請求項 7】

前記ポリペプチドが、免疫グロブリン F c 領域を含む、請求項 5 または 6 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 1 ~ 2 6 7、2 8 4、もしくは 3 1 2 のいずれかに記載される配列、または配列番号 2 5 1 ~ 2 6 7、2 8 4、もしくは 3 1 2 のいずれかと少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

20

【請求項 9】

a) 配列番号 2 6 8 に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域 1 ( C D R 1 ) ;  
配列番号 2 7 8 に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域 2 ( C D R 2 ) ; および  
配列番号 2 8 3 に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域 3 ( C D R 3 ) ;  
b) 配列番号 2 7 2 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1 ;  
配列番号 2 7 8 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 2 ; および  
配列番号 2 8 3 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 3 ;  
c) 配列番号 2 7 3 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1 ;  
配列番号 2 7 8 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 2 ; および  
配列番号 2 8 3 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 3 ; または  
d) 配列番号 3 1 3 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1 ;  
配列番号 3 1 4 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 2 ; および  
配列番号 3 1 5 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 3  
を含む少なくとも 1 つの V H H ドメインを含む、P D - 1 に結合する単離された単ドメイン抗体。

30

40

【請求項 10】

配列番号 2 5 1 ~ 2 6 7、2 8 4 もしくは 3 1 2 のいずれかに記載されるアミノ酸配列、または配列番号 2 5 1 ~ 2 6 7、2 8 4、もしくは 3 1 2 のいずれかと少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、請求項 9 に記載の単離された単ドメイン抗体。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の P D - 1 結合ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

50

## 【請求項 1 2】

請求項 9 または 1 0 に記載の単一ドメイン抗体をコードする、ポリヌクレオチド。

## 【請求項 1 3】

請求項 1 1 または 1 2 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチドを含む、細胞。

## 【請求項 1 5】

ポリペプチドを産生する方法であって、細胞に、請求項 1 1 に記載のポリヌクレオチドを導入することと、前記ポリペプチドを産生するための条件下で前記細胞を培養することと、を含む、方法。

10

## 【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物結合分子を含む結合分子を含む、操作された免疫細胞。

## 【請求項 1 7】

前記 P D - 1 結合ポリペプチド構築物結合分子が、前記細胞から分泌可能である、請求項 1 6 に記載の操作された免疫細胞。

## 【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物を含む、医薬組成物。

## 【請求項 1 9】

対象における免疫応答を刺激または誘発する方法において使用するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物を含む組成物であって、前記方法が、それを必要とする対象に、前記 P D - 1 結合ポリペプチドを投与することを含む、組成物。

20

## 【請求項 2 0】

対象における疾患または状態を治療する方法において使用するための、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物を含む組成物であって、前記方法が、それを必要とする対象に、治療有効量の前記 P D - 1 結合ポリペプチドを投与することを含む、組成物。

## 【請求項 2 1】

請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチドを含む、細胞。

30

## 【請求項 2 2】

単一ドメイン抗体を産生する方法であって、細胞に、請求項 1 2 に記載のポリヌクレオチドを導入することと、前記単一ドメイン抗体を産生するための条件下で前記細胞を培養することと、を含む、方法。

## 【請求項 2 3】

請求項 9 または 1 0 に記載の単一ドメイン抗体結合分子を含む結合分子を含む、操作された免疫細胞。

## 【請求項 2 4】

前記単一ドメイン抗体結合分子が、前記細胞から分泌可能である、請求項 2 3 に記載の操作された免疫細胞。

40

## 【請求項 2 5】

請求項 9 または 1 0 に記載の単一ドメイン抗体を含む、医薬組成物。

## 【請求項 2 6】

対象における免疫応答を刺激または誘発する方法において使用するための、請求項 9 または 1 0 に記載の単離された単一ドメイン抗体を含む組成物であって、前記方法が、それを必要とする対象に、前記単離された単一ドメイン抗体を投与することを含む、組成物。

## 【請求項 2 7】

対象における疾患または状態を治療する方法において使用するための、請求項 9 または 1 0 に記載の単離された単一ドメイン抗体を含む組成物であって、前記方法が、それを必

50

要とする対象に、治療有効量の前記単離された単ドメイン抗体を投与することを含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2018年10月11日に出願された米国仮特許出願第62/744,615号、および2019年1月11日に出願された米国仮特許出願第62/791,152号の利益を主張するものであり、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0002】

本開示は概して、PD-1に特異的に結合する結合ポリペプチドを提供する。より具体的には、本開示は、少なくともPD-1に結合する、多価ならびに/または多重特異性構築物およびキメラ分子を含む、融合タンパク質に関する。本開示はまた、ポリペプチドをコードする核酸分子およびそのベクターおよび細胞、ならびに癌などの疾患および状態を治療するための提供されたPD-1結合ポリペプチドの使用法および使用も提供する。

【背景技術】

【0003】

PD-1は、免疫細胞調節分子の免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。これは、活性化T細胞の表面上に発現される。活性化T細胞上のPD-1の発現は、腫瘍微小環境中の腫瘍細胞および間質細胞によるPD-L1によって標的化とされて、免疫応答を抑制し、それによってPD-1を遮断するかまたは標的とする薬剤を望ましい治療目標にする。PD-1を標的とする改善された治療用分子および薬剤が必要とされる。そのようなニーズを満たす実施形態が本明細書に提供される。

20

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1A】ヒトPD-1(図1A、図1D、図1E、図1F、図1G)、カニクイザルPD-1(図1B)、またはマウスPD-1(図1C)を発現するFreeStyle293細胞への、18H10およびそのヒト化バリエーションhz18H10または1-14の結合を示す。未トランスフェクト(293)細胞への結合も評価し、示す。

30

【図1B】同上。

【図1C】同上。

【図1D】同上。

【図1E】同上。

【図1F】同上。

【図1G】同上。

【図2】活性化ヒトT細胞への18H10およびそのヒト化バリエーションhz18H10v7の結合を示すグラフである。活性化T細胞への試験物質の結合を、フローサイトメトリーによって定量化した。

【図3A】Jurkatレポーターシフェラーゼアクセスシステムにおける、T細胞受容体(TCR)シグナル伝達のPD1/PDL1媒介性抑制を阻害する18H10、そのヒト化バリエーションhz18H10v7または1-14の能力を示すグラフである。図3Aが18H10およびhz18H10v7によるPD1遮断を示す一方で、図3Bは、1-14によるPD1遮断を示す。

40

【図3B】同上。

【発明を実施するための形態】

【0005】

PD-1に特異的に結合するポリペプチド(以下、PD-1結合ポリペプチドとも呼ばれる)が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、提供される結合ポリペプチドは、PD-1に結合する少なくとも1つのVHHドメインを含む。いくつかの実施形態で

50

は、本明細書に提供されるPD-1結合ポリペプチドは、各々がPD-1に個々に結合する1、2、3、4、5、6、7、または8個のVHHドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1結合ポリペプチドは、PD-1に結合する1、2、3、または4個のVHHドメインを含む。いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、単一特異性である。いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、多重特異性である。例えば、提供されるPD-1結合ポリペプチドは、PD-1に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、PD-1以外の1つ以上の標的タンパク質に結合する1つ以上の追加のVHHドメインなどの1つ以上の追加の結合ドメインとを含んでもよいポリペプチドを含む。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

10

(項目1)

PD-1に特異的に結合する少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン(PD-1 VHHドメイン)を含む、PD-1結合ポリペプチド構築物。

(項目2)

PD-1に特異的に結合する少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン(PD-1 VHHドメイン)と、PD-1以外の標的に結合する1つ以上の追加の結合ドメインと、を含む、PD-1結合ポリペプチド構築物。

(項目3)

前記少なくとも1つのVHHドメインが、配列番号268、272、273、および313からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号278または314に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号283または315に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、項目1に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

20

(項目4)

配列番号268、272、273、および313からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号278または314に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号283または315に記載される選択されたアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン(PD-1 VHHドメイン)を含む、PD-1結合構築物。

30

(項目5)

PD-1に特異的に結合する前記PD-1 VHHドメインが、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断する、項目1、2、3、または4のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

(項目6)

前記1つ以上の追加の結合ドメインが、共刺激分子に結合する、項目2に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

(項目7)

前記1つ以上の追加の結合ドメインが、T細胞表面マーカーに結合する、項目2に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

40

(項目8)

前記T細胞表面マーカーが、CD8である、項目7に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

(項目9)

前記T細胞表面マーカーが、CD4である、項目7に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

(項目10)

前記1つ以上の追加の結合ドメインが、PD1以外の免疫チェックポイントに結合する、項目2に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

(項目11)

50

前記1つ以上の追加の結合ドメインが、免疫細胞上の活性化受容体に結合する、項目2に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

(項目12)

前記1つ以上の追加のドメインが、腫瘍関連抗原(TAA)に結合する、項目2に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

(項目13)

前記1つ以上の追加の結合ドメインが、サイトカイン受容体に結合する、項目2に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

(項目14)

前記ポリペプチドが、免疫グロブリンFc領域を含む、項目1、2、3、または4のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

10

(項目15)

前記少なくとも1つのPD-1VHHドメインが、配列番号251~267、284、もしくは312のいずれかに記載される配列、または配列番号251~267、284、もしくは312のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、項目1、2、3、または4のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

(項目16)

前記少なくとも1つのPD-1VHHドメインが、それぞれ配列番号268、278、および283、それぞれ配列番号272、278、および283、またはそれぞれ配列番号273、278、および283に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、項目1または2に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

20

(項目17)

配列番号268、272、273、および313からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号278または314に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号283または315に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、PD-1に結合する単離された単ドメイン抗体。

(項目18)

配列番号251~267もしくは284のいずれかに記載されるアミノ酸配列、または配列番号251~267、284、もしくは312のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、項目17に記載の単離された単ドメイン抗体。

30

(項目19)

前記sdAbが、配列番号251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、284、または312に記載されるアミノ酸の配列を含む、項目18に記載の単離された単ドメイン抗体。

40

(項目20)

項目1~4のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド(複数可)。

(項目21)

項目17~19のいずれかに記載の単ドメイン抗体をコードする、ポリヌクレオチド(複数可)。

(項目22)

項目20または21に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

(項目23)

項目20もしくは21に記載のポリヌクレオチド(複数可)、または項目22に記載の

50

ベクターを含む、細胞。

(項目24)

ポリペプチドを産生する方法であって、細胞に、項目20もしくは21に記載のポリヌクレオチド(複数可)、または項目22に記載のベクターを導入することと、前記ポリペプチド構築物を産生するための条件下で前記細胞を培養することと、を含む、方法。

(項目25)

項目1~4のいずれかに記載の結合分子または項目17~19のいずれかに記載の単一ドメイン抗体を含む結合分子を含む、操作された免疫細胞であって、任意選択的に、前記結合分子が、前記細胞から分泌可能である、操作された免疫細胞。

(項目26)

項目1~4のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド、項目17~19のいずれかに記載の単一ドメイン抗体、または項目25に記載の操作された免疫細胞を含む、医薬組成物。

(項目27)

対象における免疫応答を刺激または誘発する方法であって、それを必要とする対象に、項目1~4のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド、項目17~19のいずれかに記載の単一ドメイン抗体、または項目25に記載の操作された免疫細胞、または項目26に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

(項目28)

対象における疾患または状態を治療する方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量の項目1~4のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド、項目17~19のいずれかに記載の単一ドメイン抗体、または項目25に記載の操作された免疫細胞、または項目26に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

**【0006】**

いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、PD-1に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、Fcドメインとを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1結合ポリペプチドは、PD-1に結合する1、2、3、または4個のVHHドメインと、Fcドメインとを含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、PD-1結合部位の数を2倍にする二量体が形成されるように、生理学的条件下でPD-1結合ポリペプチドの二量体化を媒介する。例えば、PD-1に結合する3つのVHHドメインと、Fc領域とを含むPD-1結合ポリペプチドは、単量体として三価であるが、生理学的条件下では、Fc領域は、二量体化を媒介してもよく、このため、PD-1結合ポリペプチドは、そのような条件下で六価二量体として存在する。

**【0007】**

プログラム細胞死タンパク質-1(PD-1)は、I型膜タンパク質であり、T細胞調節因子PD-1の拡張CD28/CTLA-4ファミリーのメンバーである(The EMBO Journal(1992), vol. 11, issue 11, p. 3887-3895)。末梢でのPD-1発現は、抗原受容体からの刺激によって活性化されたT細胞もしくはBリンパ球、または活性化マクロファージを含む骨髄細胞において観察されることが報告されている(International Immunology(1996), vol. 18, issue 5, p. 765-772)。細胞表面上のPD-1の発現はまた、IFN- $\gamma$ 刺激を介して上方制御されることも示されている。PD-1に対する2つの細胞表面糖タンパク質リガンド、PD-1およびPDL-2が同定されており、PD-1に結合すると、T細胞活性化およびサイトカイン分泌を下方制御することが示されている(Freeman et al.(2000) J. Exp. Med. 192: 1027-34、Latchman et al.(2001) Nat. Immunol. 2: 261-8、Carter et al.(2002) Eur. J. Immunol. 32: 634-43、Ohigashi et al.(2005) Clin. Cancer Res. 11: 2947-53)。PD-1(B7-H1)およびPDL2(B7-DC)の両方が、PD-1に結合するB7相同体である。PD-L1およびPD-L2は通

10

20

30

40

50

常、T細胞、B細胞、および骨髄細胞の表面上に発現される。PD-L1およびPD-L2は、免疫活性化の負の調節因子であり、PD-1受容体との相互作用を介して免疫応答を下方制御することが可能である。いくつかの態様では、PD-1は、CD4+およびCD8+T細胞を含むNK細胞およびT細胞上に発現され、それによってPD-1の関与は、活性化細胞活性化、増殖、および/または増加を阻害することができる。

【0008】

ヒトPD-1の例示的な配列は、以下のように記載される：

【化1】

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFS  
NTSEFVNLNWRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRAR  
RNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRAGQFQTLVVG  
VGGLLGLVLLVWVLAVICSRARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSDYDYGELDFQWR  
EKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFSPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

10

(配列番号286、シグナル配列は下線付き)

【0009】

場合によっては、提供されるPD-1結合ポリペプチドは、PD-L1/L2とPD-1との間の相互作用を直接遮断または阻害する。いくつかの実施形態では、PD-L1および/またはPD-L2とPD-1との間の相互作用を阻害または低減する、提供される分子は、免疫応答を調節する。阻害シグナルの伝達は、免疫細胞応答の下方調節（および結果として全体的な免疫応答の下方調節）をもたらし得るが、免疫細胞における阻害シグナルの遮断は、免疫細胞応答の上方調節（および結果として免疫応答の上方調節）をもたらす。場合によっては、免疫応答の強化による調節を使用して、癌などの免疫応答が抑制される特定の疾患または状態を治療することができる。いくつかの実施形態では、提供されるPD-1結合ポリペプチドは、腫瘍細胞の増殖または生存を阻害または低減するための治療薬として使用され得る。

20

【0010】

様々なPD-1ポリペプチド結合フォーマットが提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1ポリペプチドは、Fcタンパク質との融合などによって二価である。いくつかの実施例では、PD-1結合ポリペプチドは、PD-1VHH-Fcポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、Fcは、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)、抗体依存性細胞貪食(ADCP)、および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)などの1つ以上のエフェクター機能などの免疫エフェクター活性を示すFcである。他の実施形態では、PD-1ポリペプチドは、少なくとも1つの追加の分子を含有する多重特異性ポリペプチドであってもよい。いくつかの実施形態では、追加の分子は、腫瘍関連抗原または免疫細胞、例えばT細胞など、腫瘍関連微小環境中の別の分子に關与することが可能である。特定の实施形態では、提供されるPD-1ポリペプチド結合フォーマットは、PD-1とPD-L1および/またはPD-L2との間の相互作用を遮断し、かつ/またはT細胞などの細胞においてPD-1によって媒介される阻害シグナルを低減、阻害、もしくは抑制する。

30

【0011】

いくつかの実施形態では、提供されるPD-1結合ポリペプチドは、対象において免疫応答を刺激するために使用されてもよく、いくつかの態様では、対象において癌などの疾患または障害を治療する。いくつかの態様では、PD-1-Fcなどの本明細書に提供されるPD-1結合ポリペプチドは、PD-1発現細胞に結合し、免疫シナプス中の隣接する細胞、例えば、いくつかの態様において環境中で活性免疫応答を誘発することができる腫瘍細胞上のPD-L1および/またはPD-L2とのPD-1発現細胞の相互作用を遮断することができる。場合によっては、活性免疫応答は、癌性細胞の増殖を阻害（例えば、細胞周期の進行を遮断）することができる。

40

【0012】

他の態様では、多重特異性結合を示すVHH結合ポリペプチドも本明細書に提供され

50

る。場合によっては、結合ポリペプチドは、PD-1および腫瘍関連抗原(TAA)に対する二重親和性を示すポリペプチドを含む。代替的または追加的に、PD-1結合ポリペプチドは、PD-1およびCD3などのT細胞抗原に対する親和性を示すポリペプチドを含む。いくつかの態様では、そのような多重特異性分子は、腫瘍またはT細胞に結合すると腫瘍の部位でT細胞に関与するかまたはそれを活性化すると同時に、PD-1とPD-L1/PD-L2との相互作用を遮断して、T細胞における阻害シグナルを低減することができる。特に、本明細書に提供されるそのような分子の中には、抑制されたCD3結合を示す分子がある。また、キメラ抗原受容体を発現し、PD-1結合ポリペプチドを分泌することが可能である、操作されたT細胞などの操作された細胞が本明細書に提供される。

#### 【0013】

本出願において言及される特許文書、科学論文、およびデータベースを含むすべての刊行物は、各個々の刊行物が参照により個々に組み込まれた場合と同じ程度まで、すべての目的のために参照によりそれらの全体が組み込まれる。本明細書に記載される定義が、参照により本明細書に組み込まれる特許、出願、公開出願、および他の刊行物に記載される定義に反しているか、またはそうでなければ矛盾する場合、本明細書に記載される定義が、参照により本明細書に組み込まれる定義より優先する。

#### 【0014】

本明細書に記載または参照される技術および手順は、概して、当業者によって十分に理解され、例えば、以下に記載される広く利用される方法などの従来の方法を使用して一般的に採用されている： Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)), the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987)), Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984), Methods in Molecular Biology, Humana Press, Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press, Animal Cell Culture (R.I. Freshney), ed., 1987), Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press, Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons, Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.), Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987), PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994), Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991), Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999), Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997), Antibodies (P. Finch, 1997), Antibodies: A Practical Ap

10

20

30

40

50

proach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988 - 1989)、Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)、Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)、および Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J. B. Lippincott Company, 1993)、ならびにそれらの最新版。

10

## 【0015】

本明細書で使用されるセクション見出しは、構成的な目的のためだけであり、記載される主題を制限するものとして解釈されるべきではない。

## 【0016】

## I. 定義

別段の定義がない限り、本開示に関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈による別段の要求または別段の明示的な指示がない限り、単数形の用語は複数形を含むものとし、複数形の用語は単数形を含むものとする。様々な出典または参考文献間の定義におけるいかなる矛盾についても、本明細書に提供される定義が制御する。

20

## 【0017】

本明細書に記載される本発明の実施形態は、実施形態「からなる」および/または「から本質的にからなる」を含むことが理解される。本明細書で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、別段の指示がない限り、複数の参照を含む。本明細書における「または」という用語の使用は、代替案が相互に排他的であることを暗示することを意味していない。

## 【0018】

本出願では、「または」の使用は、当業者によって明示的に記載または理解されない限り、「および/または」を意味する。複数の従属請求項の文脈において、「または」の使用は、2つ以上の先行する独立請求項または従属請求項を指す。

30

## 【0019】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、本技術分野の当業者に容易に知られるそれぞれの値に対する通常の誤差範囲を指す。本明細書の「約」値またはパラメータに対する言及は、その値またはパラメータ自体に関する実施形態を含む（および記載する）。例えば、「約X」に言及する記載は、「X」の記載を含む。

## 【0020】

「核酸分子」、「核酸」、および「ポリヌクレオチド」という用語は、互換的に使用されてもよく、ヌクレオチドのポリマーを指す。ヌクレオチドのそのようなポリマーは、天然および/または非天然ヌクレオチドを含有してもよく、DNA、RNA、およびPNAが挙げられるが、これらに限定されない。「核酸配列」は、核酸分子またはポリヌクレオチド中に含まれるヌクレオチドの直鎖状配列を指す。

40

## 【0021】

本明細書で使用される場合、「単離ポリヌクレオチド」という用語は、ゲノム、cDNA、もしくは合成起源、またはそれらの何らかの組み合わせのポリヌクレオチドを意味するものとし、それは、その起源によって、(1)自然界に見られるポリヌクレオチドのすべてまたは一部分と関連していないか、(2)自然界で連結されていないポリヌクレオチドに作動可能に連結されているか、または(3)より大きい配列の一部として自然界に存在しない。

## 【0022】

50

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために互換的に使用され、最小の長さに限定されない。アミノ酸残基のそのようなポリマーは、天然または非天然のアミノ酸残基を含有してもよく、アミノ酸残基のペプチド、オリゴペプチド、二量体、三量体、および多量体が挙げられるが、これらに限定されない。完全長タンパク質およびその断片の両方が定義によって包含される。これらの用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアル化、アセチル化、リン酸化なども含む。さらに、本開示の目的のために、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然配列に対する欠失、付加、および置換（本質的には概して保存的）などの修飾を含むタンパク質を指す。これらの修飾は、部位特異的変異導入を介するように意図的であってもよいが、またはタンパク質を産生する宿主の変異もしくはPCR増幅によるエラーを介するように偶発的であり得る。

10

**【0023】**

本明細書で言及される「単離タンパク質」という用語は、対象タンパク質が、(1)典型的には自然界に見られるであろう少なくともいくつかの他のタンパク質を含まない、(2)同じ供給源、例えば同じ種からの他のタンパク質を本質的に含まない、(3)異なる種由来の細胞によって発現される、(4)それが自然界で関連しているポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、もしくは他の物質の少なくとも約50パーセントから分離されている、(5)「単離タンパク質」が自然界で関連しているタンパク質の部分と(共有結合性もしくは非共有結合性相互作用によって)関連していない、(6)それが自然界で関連していないポリペプチドと(共有結合性もしくは非共有結合性相互作用によって)作動可能に

20

**【0024】**

本明細書で使用される場合、「実質的に純粋」とは、目的種が、存在する優勢種であり(すなわち、モル基準で、組成物中の任意の他の個々の種よりも豊富である)、実質的に精製された画分が、その目的種が存在するすべての高分子種の(モル基準で)少なくとも約50%を構成する組成物であることを意味する。概して、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在するすべての高分子種の約80%超、例えば、いくつかの実施形態では、約85%、90%、95%、および99%超を構成する。いくつかの実施形態では、目的種は、本質的な均質性まで精製され(従来の検出方法によって組成物中で汚染種を検出することができない)、組成物は、単一の高分子種から本質的になる。

30

**【0025】**

本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、そのように記載される構成成分の位置が、それらが意図される様式で機能することを可能にする関係にあることを指す。コード配列に「作動可能に連結された」制御配列は、コード配列の発現が制御配列と適合する条件下で達成されるような方法でライゲーションされる。

40

**【0026】**

抗原またはエピトープに「特異的に結合する」という用語は、当該技術分野で十分に理解されている用語であり、そのような特異的結合を決定する方法も当該技術分野で周知である。分子は、それが代替の細胞または物質とよりも特定の細胞または物質とより頻繁に、より迅速に、より長時間、かつ/またはより大きい親和性で反応または関連する場合、「特異的結合」または「優先的結合」を示すと言われる。単一ドメイン抗体(s d A b)またはV H H含有ポリペプチドは、それが他の物質に結合するよりも大きい親和性、結合力で、より容易に、かつ/またはより長時間結合する場合、標的に「特異的に結合する」または「優先的に結合する」。例えば、PD-1エピトープに特異的または優先的に結合

50

する s d A b または V H H 含有ポリペプチドは、それが他の P D - 1 エピトープまたは非 P D - 1 エピトープに結合するよりも大きい親和性、結合力で、より容易に、かつ/またはより長時間このエピトープに結合する s d A b または V H H 含有ポリペプチドである。また、この定義を読むことによって、例えば、第 1 の標的に特異的または優先的に結合する s d A b または V H H 含有ポリペプチドが、第 2 の標的に特異的または優先的に結合する必要があるか、または結合しない場合があることも理解される。そのため、「特異的結合」または「優先的結合」は、必ずしも排他的結合を必要とするわけではない（それを含むことができるが）。概して、必ずしもではないが、結合への言及は、選択的結合を意味する。「特異性」は、抗原に選択的に結合する結合タンパク質の能力を指す。

#### 【 0 0 2 7 】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、抗原結合分子（例えば、s d A b または V H H 含有ポリペプチド）が結合する標的分子（例えば、タンパク質、核酸、炭水化物、または脂質などの抗原）上の部位を指す。エピトープは多くの場合、アミノ酸、ポリペプチド、または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面グループを含み、特定の三次元構造特性ならびに特定の電荷特性を有する。エピトープは、標的分子の連続残基および/または並列した非連続残基（例えば、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、脂質部分）の両方から形成され得る。連続残基（例えば、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、脂質部分）から形成されるエピトープが、典型的には、変性溶媒への曝露時に保持される一方で、三次折り畳みによって形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒を用いた処理時に失われる。エピトープは、少なくとも 3 個、少なくとも 5 個、または 8 ~ 1 0 個の残基（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド）を含み得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、エピトープは、長さが 2 0 個未満の残基（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド）、1 5 個未満の残基、または 1 2 個未満の残基である。2 つの抗体は、抗原に対して競合的結合を示す場合、抗原内の同じエピトープに結合し得る。いくつかの実施形態では、エピトープは、抗原結合分子上の C D R 残基に対する特定の最小距離によって同定され得る。いくつかの実施形態では、エピトープは、上記の距離によって同定されてもよく、抗原結合分子の残基と抗原残基との間の結合（例えば、水素結合）に関与する残基にさらに限定される。エピトープは、様々なスキャンによっても同定され得、例えば、アラニンまたはアルギニンのスキャンは、抗原結合分子が相互作用し得る 1 つ以上の残基を示すことができる。明示的に示されない限り、エピトープとしての残基のセットは、他の残基を特定の抗原結合分子のエピトープの一部であることから除外しない。むしろ、このようなセットの存在は、エピトープの最小シリーズ（または種のセット）を示す。したがって、いくつかの実施形態では、エピトープとして同定される残基のセットは、抗原上のエピトープの残基の排他的リストではなく、抗原にとって非常に適切である最小エピトープを示す。

#### 【 0 0 2 8 】

「非線形エピトープ」または「立体構造エピトープ」は、エピトープに特異的な抗原結合分子が結合する抗原性タンパク質内の非連続ポリペプチド、アミノ酸、および/または糖を含む。いくつかの実施形態では、残基の少なくとも 1 つは、エピトープの他の顕著な残基と非連続的である。しかしながら、残基の 1 つ以上は、他の残基と連続的であってもよい。

#### 【 0 0 2 9 】

「線形エピトープ」は、エピトープに特異的な抗原結合分子が結合する抗原性タンパク質内の連続ポリペプチド、アミノ酸、および/または糖を含む。いくつかの実施形態では、線形エピトープ内の残基のすべてが、抗原結合分子によって直接結合される（または結合に関与する）必要はないことに留意されたい。いくつかの実施形態では、線形エピトープは、線形エピトープの配列で効果的に構成されたペプチドを用いた免疫化、またはタンパク質の残りの部分から比較的単離されたタンパク質の構造セクション（抗原結合分子が少なくとも主に、その配列セクションとだけ相互作用することができるように）からのものであり得る。

10

20

30

40

50

## 【0030】

「抗体」および「抗原結合分子」という用語は、最も広い意味で互換的に使用され、抗体様抗原結合ドメインを含む様々なポリペプチドを包含し、所望の抗原結合活性を示す限り、従来の抗体（典型的には、少なくとも1つの重鎖および少なくとも1つの軽鎖を含む）、単ドメイン抗体（sdAb、1つの鎖のみを含み、それは典型的には重鎖と類似している）、VHH含有ポリペプチド（少なくとも1つの重鎖のみの抗体可変ドメインまたはVHHを含むポリペプチド）、ならびに前述の任意の断片が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、抗体は、二量体化ドメインを含む。そのような二量体化ドメインとしては、重鎖定常ドメイン（CH1、ヒンジ、CH2、およびCH3を含み、CH1が典型的には、軽鎖定常ドメイン、CLと対になる一方で、ヒンジは二量体化を媒介する）、およびFcドメイン（ヒンジ、CH2、およびCH3を含み、ヒンジは二量体化を媒介する）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

## 【0031】

抗体という用語はまた、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびラクダ科（ラマを含む）、サメ、マウス、ヒト、カニクイザルなどの様々な種の抗体を含むが、これらに限定されない。

## 【0032】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体を抗原に結合することに関する抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖（それぞれV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>）の可変領域は概して、類似の構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）および3つのCDRを含む。（例えば、Kindt et al. *Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照されたい）。単一のV<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>ドメインは、抗原結合特異性、例えば、VHHなどの単ドメイン抗体を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、抗原に結合する抗体からのV<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>ドメインを使用して単離されて、それぞれ相補的なV<sub>L</sub>またはV<sub>H</sub>ドメインのライブラリーをスクリーニングし得る。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150: 880 - 887 (1993)、Clarkson et al., *Nature* 352: 624 - 628 (1991)を参照されたい。

20

## 【0033】

「抗体断片」または「抗原結合断片」は、抗原に結合する少なくとも可変領域を含有する普通または無傷抗体の一部を含む、普通または無傷抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、単鎖Fv（scFv）、Fab、Fab'、Fab'-SH、(Fab')<sub>2</sub>、抗体、線形抗体、V<sub>H</sub>領域のみを含む単ドメイン抗体（VHH）が挙げられるが、これらに限定されない。

30

## 【0034】

本明細書で使用される場合、結合分子に関連する「一価」とは、標的抗原に特異的である単一抗原認識部位を有する結合分子を指す。一価結合分子の例としては、例えば、一価抗体断片、抗体様結合特性を有するタンパク質性結合分子、またはMHC分子が挙げられる。一価抗体断片の例としては、Fab断片、Fv断片、および単鎖Fv断片（scFv）が挙げられる。

40

## 【0035】

「単ドメイン抗体」、「sdAb」、「VHH」という用語は、本明細書において互換的に使用されて、単一単量体ドメイン抗原結合/認識ドメインを有する抗体を指す。そのような抗体は、ラクダ科抗体またはサメ抗体を含む。いくつかの実施形態では、VHHは、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4と指定された、3つのCDRおよび4つのフレームワーク領域を含む。いくつかの実施形態では、VHHは、VHHが抗原結合および特異性を実質的に維持する限り、部分的なFR1および/またはFR4のみを含むか、またはそれらのフレームワーク領域の一方もしくは両方を欠くように、N末端またはC末端で切断されてもよい。

## 【0036】

50

「VHH含有ポリペプチド」という用語は、少なくとも1つのVHHドメインを含むポリペプチドを指す。いくつかの実施形態では、VHHポリペプチドは、2、3、または4個以上のVHHドメインを含み、各VHHドメインは、同一であってもよいか、または異なってもよい。いくつかの実施形態では、VHH含有ポリペプチドは、Fcドメインを含む。いくつかのそのような実施形態では、VHHポリペプチドは、二量体を形成してもよい。VHH含有ポリペプチドの非限定的な構造としては、 $VHH_1 - Fc$ 、 $VHH_1 - VHH_2 - Fc$ 、および $VHH_1 - VHH_2 - VHH_3 - Fc$ が挙げられ、式中、 $VHH_1$ 、 $VHH_2$ 、および $VHH_3$ は同一であってもよいか、または異なってもよい。そのような構造のいくつかの実施形態では、1つのVHHがリンカーによって別のVHHに接続されてもよいか、または1つのVHHがリンカーによってFcに接続されてもよい。いくつかのそのような実施形態では、リンカーは、1～20個のアミノ酸、好ましくは、グリシンおよび任意選択的にセリンから構成される1～20個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、VHH含有ポリペプチドがFcを含む場合、それは二量体を形成する。したがって、構造 $VHH_1 - VHH_2 - Fc$ が二量体を形成する場合、それは四価であるとみなされる（すなわち、二量体は4つのVHHドメインを有する）。同様に、構造 $VHH_1 - VHH_2 - VHH_3 - Fc$ が二量体を形成する場合、それは六価であるとみなされる（すなわち、二量体は6つのVHHドメインを有する）。

#### 【0037】

本明細書で使用される場合、PD-1結合ポリペプチドは、PD-1に特異的に結合するポリペプチドまたはタンパク質である。典型的には、本明細書のPD-1結合ポリペプチドは、PD-1に結合する少なくとも1つのVHHドメインを含有するVHH含有ポリペプチドである。PD-1結合ポリペプチドは、融合タンパク質を含むコンジュゲートを含む。PD-1結合ポリペプチドは、Fcドメインを含有するものを含む融合タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、各々がPD-1に特異的に結合する2、3、または4個以上のVHHドメインを含有し、各VHHドメインは、同一であってもよいか、または異なってもよい。いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、多価である。いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、多重特異性である。場合によっては、PD-1結合ポリペプチドは、PD-1以外の1つ以上のさらなるまたは追加の抗原に結合する、1つ以上の追加のドメインを含有してもよい。

#### 【0038】

「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体集団の抗体（s d A bまたはVHH含有ポリペプチドを含む）を指し、すなわち、集団を含む個々の抗体は、微量で存在し得る自然発生的な変異の可能性を除いて同一である。モノクローナル抗体は、特異性が高く、単一抗原部位に向けられる。さらに、典型的には異なる決定基（エピトープ）に向けられる異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に向けられる。したがって、モノクローナル抗体の試料は、抗原上の同じエピトープに結合することができる。修飾語句「モノクローナル」は、実質的に均質な抗体集団から得られたものとしての抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, 1975, Nature 256: 495によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作製されてもよいか、または米国特許第4,816,567号に記載されるような組み換えDNA方法によって作製されてもよい。モノクローナル抗体はまた、例えば、McCafferty et al., 1990, Nature 348: 552-554に記載される技術を使用して生成されたファージライブラリーから単離されてもよい。

#### 【0039】

「CDR」という用語は、当業者に対する少なくとも1つの同定様式によって定義される相補性決定領域を示す。所与のCDRまたはFRの正確なアミノ酸配列境界は、以下によって記載されるものを含む、多数の周知のスキームのいずれかを使用して容易に決定さ

10

20

30

40

50

れ得る: Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD ("Kabat" numbering scheme)、Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 ("Chothia" numbering scheme)、MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745". ("Contact" numbering scheme)、Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, 2003 Jan; 27(1): 55-77 ("IMGT" numbering scheme)、Honegger A and Pluckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun 8; 309(3): 657-70, ("Aho" numbering scheme)、および Martin et al., "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm," PNAS, 1989, 86(23): 9268-9272, ("AbM" numbering scheme)。

#### 【0040】

所与のCDRまたはFRの境界は、同定に使用されるスキームに応じて異なり得る。例えば、Kabatスキームは、構造アラインメントに基づくが、Chothiaスキームは、構造情報に基づく。KabatおよびChothiaスキームの両方のナンバリングは、最も一般的な抗体領域配列長に基づいており、挿入は、挿入文字、例えば「30a」によって対応し、一部の抗体には欠失が現れる。2つのスキームは、特定の挿入および欠失(インデル)を異なる位置に配置し、異なるナンバリングをもたらす。Contactスキームは、複雑な結晶構造の分析に基づいており、多くの点で、Chothiaナンバリングスキームと類似している。AbMスキームは、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用されるものに基づく、KabatとChothiaの定義間の妥協策である。

#### 【0041】

いくつかの実施形態では、CDRは、Chothiaナンバリングスキーム、Kabatナンバリングスキーム、KabatとChothiaとの組み合わせ、AbM定義、および/またはcontact定義のいずれかに従って定義され得る。VHHは、CDR1、CDR2、およびCDR3と指定された3つのCDRを含む。以下の表1は、それぞれKabat、Chothia、AbM、およびContactスキームによって同定されるCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3の例示的な位置境界を列挙する。CDR-H1については、残基ナンバリングは、KabatおよびChothiaナンバリングスキームの両方を使用して列挙される。FRは、CDRの間に位置し、例えば、FR-H1はCDR-H1の前に位置し、FR-H2はCDR-H1とCDR-H2との間に位置し、FR-H3はCDR-H2とCDR-H3との間に位置するなどである。示されるKabatナンバリングスキームは、挿入をH35AおよびH35Bに配置するため、示されるKabatナンバリング規則を使用してナンバリングされたときのChothia CDR-H1ループの末端は、ループの長さに応じてH32とH34との間で異なることに留意されたい。

【表 1】

表 1. 様々なナンバリングスキームに従った CDR の境界。				
CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-H1 (Kabat ナンバリング <sup>1)</sup> )	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia ナンバリング <sup>2)</sup> )	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H10

1-Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th

Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

2-Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948

10

## 【 0 0 4 2 】

したがって、別段の指定がない限り、所与の抗体またはその領域、例えば、その可変領域の「CDR」、または「相補性決定領域」、または個々の指定のCDR（例えば、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3）は、前述のスキームのいずれかによって定義されるような相補性決定領域（または特定の相補性決定領域）を包含すると理解されるべきである。例えば、特定のCDR（例えば、CDR-H3）が、所与のVHHアミノ酸配列中に対応するCDRのアミノ酸配列を含有すると記載される場合、そのようなCDRが、前述のスキームのいずれかによって定義されるように、VHH内の対応するCDR（例えば、CDR-H3）の配列を有することが理解される。いくつかの実施形態では、特定のCDR配列が指定される。提供される抗体の例示的なCDR配列は、様々なナンバリングスキームを使用して記載されるが（例えば、表1を参照）、提供される抗体が、他の前述のナンバリングスキームまたは当業者に既知の他のナンバリングスキームのいずれかに従って、記載されるようなCDRを含むことができることが理解される。

20

## 【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される場合、「コンジュゲート」、「コンジュゲーション」、またはその文法上の変化形は、当該技術分野で既知の任意の結合または連結方法による、別の化合物の形成をもたらす2つ以上の化合物の結合または連結を指す。また、2つ以上の化合物を結合または連結することによって生成される化合物を指すこともできる。例えば、1つ以上の化学部分またはポリペプチドに直接または間接的に連結されたVHHドメインは、例示的なコンジュゲートである。そのようなコンジュゲートには、融合タンパク質、化学コンジュゲートによって産生されるもの、および任意の他の方法によって産生されるものが含まれる。

30

## 【 0 0 4 4 】

VHH-Fcなどの免疫グロブリンFc融合体（Fc融合体）は、免疫グロブリンのFc領域に作動可能に連結された1つ以上のVHHドメインを含む分子である。免疫グロブリンFc領域は、1つ以上のVHHドメインに間接的にまたは直接連結されてもよい。様々なリンカーが当該技術分野で既知であり、任意選択的に、Fcを融合パートナーに連結してFc融合体を生成するために使用され得る。いくつかのそのような実施形態では、リンカーは、1~20個のアミノ酸、好ましくは、グリシンおよび任意選択的にセリンから構成される1~20個のアミノ酸を含む。同一種のFc融合体は、二量体化されてFc融合ホモ二量体を形成することができるか、または非同種を使用してFc融合ヘテロ二量体を形成することができる。いくつかの実施形態では、Fcは、ヒトFcなどの哺乳動物Fcである。

40

## 【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される場合、「重鎖定常領域」という用語は、少なくとも3つの重鎖定常ドメイン、CH1、ヒンジ、CH2、およびCH3を含む領域を指す。当然のことながら

50

、ドメイン内の非機能改変欠失および改変は、別段の指定がない限り、「重鎖定常領域」という用語の範囲内に包含される。非限定的な例示的な重鎖定常領域としては、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、および $\epsilon$ が挙げられる。非限定的な例示的な重鎖定常領域としては、 $\mu$ および $\nu$ も挙げられる。各重鎖定常領域は、抗体アイソタイプに対応する。例えば、 $\gamma$ 定常領域を含む抗体は、I g G抗体であり、 $\delta$ 定常領域を含む抗体は、I g D抗体であり、 $\epsilon$ 定常領域を含む抗体は、I g A抗体である。さらに、 $\mu$ 定常領域を含む抗体は、I g M抗体であり、 $\nu$ 定常領域を含む抗体は、I g E抗体である。特定のアイソタイプは、サブクラスにさらに細分され得る。例えば、I g G抗体としては、I g G 1 ( $\gamma$  1定常領域を含む)、I g G 2 ( $\gamma$  2定常領域を含む)、I g G 3 ( $\gamma$  3定常領域を含む)、およびI g G 4 ( $\gamma$  4定常領域を含む)抗体が挙げられるが、これらに限定されず、I g A抗体としては、I g A 1 ( $\alpha$  1定常領域を含む)およびI g A 2 ( $\alpha$  2定常領域を含む)が挙げられるが、これらに限定されず、I g Mとしては、I g M 1およびI g M 2が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0046】

本明細書で使用される場合、「Fc領域」は、C H 2およびC H 3を含む重鎖定常領域の一部を指す。いくつかの実施形態では、Fc領域は、ヒンジ、C H 2、およびC H 3を含む。様々な実施形態では、Fc領域がヒンジを含む場合、ヒンジは、2つのFc含有ポリペプチド間の二量体化を媒介する。Fc領域は、本明細書に記載される任意の抗体重鎖定常領域アイソタイプのものであってもよい。いくつかの実施形態では、Fc領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4である。

20

#### 【0047】

「機能的Fc領域」は、天然配列Fc領域の「エフェクター機能」を有する。例示的な「エフェクター機能」としては、Fc受容体結合、C 1 q結合ならびに補体依存性細胞傷害性(C D C)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(A D C C)、貪食、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)の下方制御、およびB細胞活性化などが挙げられる。そのようなエフェクター機能は、概して、Fc領域が結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と組み合わせられることを必要とし、様々なアッセイを使用して評価され得る。

#### 【0048】

「天然配列Fc領域」は、自然界に見られるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然配列ヒトFc領域としては、天然配列ヒトI g G 1 Fc領域(非AおよびAアロタイプ)、天然配列ヒトI g G 2 Fc領域、天然配列ヒトI g G 3 Fc領域、ならびに天然配列ヒトI g G 4 Fc領域、ならびにその自然発生的なバリエーションが挙げられる。

30

#### 【0049】

「バリエーションFc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾により天然配列Fc領域とは異なるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、「バリエーションFc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾により天然配列Fc領域とは異なるが、それでもなおその天然配列Fc領域の少なくとも1つのエフェクター機能を保持するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、バリエーションFc領域は、天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域における約1~約10個のアミノ酸置換、好ましくは、約1~約5個のアミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、本明細書のバリエーションFc領域は、天然配列Fc領域および/または親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の配列同一性、それと少なくとも約90%の配列同一性、それと少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有する。

40

#### 【0050】

概して、Fc領域などの免疫グロブリン重鎖またはその一部分の残基のナンバリングは、K a b a t e t a l . , S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m

50

unological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)にあるようなEUインデックスのものである。「KabataにあるようなEUインデックス」は、ヒトIgG1 EU抗体の残基ナンバリングを指す。

【0051】

「Fc受容体」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を説明する。いくつかの実施形態では、FcRは、天然ヒトFcRである。いくつかの実施形態では、FcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）に結合するものであり、対立遺伝子バリエーションおよびそれらの受容体のオルタナティブスプライシング型を含む、FcRI、FcRII、およびFcRIIIサブクラスの受容体を含む。FcRII受容体は、FcRIIA（「活性化受容体」）およびFcRIIB（「阻害受容体」）を含み、これらは、主にその細胞質ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化受容体FcRIIAは、その細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）を含有する。阻害受容体FcRIIBは、その細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ITIM）を含有する。（例えば、Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203 - 234 (1997)を参照されたい）。FcRは、例えば、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457 - 92 (1991)、Capel et al., Immunomethods 4: 25 - 34 (1994)、およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126: 330 - 41 (1995)で考察されている。将来同定されるものを含む他のFcRは、本明細書の「FcR」という用語によって包含される。例えば、「Fc受容体」または「FcR」という用語はまた、新生児受容体、FcRnも含み、これは、胎児への母体IgGの輸送（Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976)およびKim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994)）、ならびに免疫グロブリンの恒常性の制御に関与する。FcRnへの結合を測定する方法は既知である（例えば、Ghetie and Ward, Immunol. Today 18(12): 592 - 598 (1997)、Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7): 637 - 640 (1997)、Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8): 6213 - 6216 (2004)、WO2004/92219 (Hinton et al.)を参照されたい）。

【0052】

本明細書で使用される場合、「受容体ヒトフレームワーク」は、本明細書で考察されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク由来の重鎖可変ドメイン（V<sub>H</sub>）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク由来の受容体ヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含むことができるか、またはアミノ酸配列変化を含むことができる。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化の数は、V<sub>H</sub>Hなどの単一抗原結合ドメイン中のヒトフレームワークのすべてにわたって、10未満、または9未満、または8未満、または7未満、または6未満、または5未満、または4未満、または3未満である。

【0053】

本明細書で使用される場合、「キメラ抗原受容体」または「CAR」は、抗原結合ドメインを介して、それが操作される細胞（例えば、ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、またはそれらの組み合わせなどのT細胞）上に抗原特異性を導入し、したがって、抗原結合ドメインの抗原結合特性をT細胞活性（例えば、溶解能力および自己再生）と組み合わせる、操作された受容体を指す。CARは典型的には、細胞外抗原結合ドメイン（エクストドメイン）、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。細胞内シグナル伝達ドメインは概して、例えばCD3ゼータ由来

10

20

30

40

50

の、少なくとも1つのITAMシグナル伝達ドメイン、および任意選択的に、例えばCD28または4-1BB由来の、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインを含有する。

【0054】

「親和性」は、分子（例えば、抗体またはVHH含有ポリペプチド）の単一結合部位と、その結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合性相互作用の合計の強度を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性または見かけの親和性は、それぞれ解離定数（ $K_D$ ）または $K_{D\text{-apparent}}$ によって表され得る。親和性は、本明細書に記載されるものを含む、当該技術分野で既知の共通の方法（例えば、ELISA  $K_D$ 、KinExA、フローサイトメトリー、および/または表面プラズモン共鳴デバイスなど）によって測定され得る。そのような方法としては、BIAcore（登録商標）、Octet（登録商標）、またはフローサイトメトリーを伴う方法が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0055】

本明細書において使用される場合、「 $K_D$ 」という用語は、抗原結合分子/抗原相互作用の平衡解離定数を指す。「 $K_D$ 」という用語が本明細書で使用される場合、それは $K_D$ および $K_{D\text{-apparent}}$ を含む。

【0056】

いくつかの実施形態では、抗原結合分子の $K_D$ は、抗原発現細胞株を使用してフローサイトメトリーによって測定され、各抗体濃度で測定された平均蛍光を非線形1部位結合方程式にフィッティングする（Prism Software graphpad）。いくつかのそのような実施形態では、 $K_D$ は、 $K_{D\text{-apparent}}$ である。

20

【0057】

「生物学的活性」という用語は、分子の任意の1つ以上の生物学的特性を指す（インビボで見られるように天然に存在するか、または組み換え手段によって提供もしくは可能となるかを問わず）。生物学的特性としては、リガンドへの結合、細胞増殖の誘発または増加（T細胞増殖など）、およびサイトカインの発現の誘発または増加が挙げられるが、これらに限定されない。

【0058】

「親和性成熟」VHH含有ポリペプチドは、そのような改変を有しない親VHH含有ポリペプチドと比較して、1つ以上のCDRにおける1つ以上の改変を有するVHH含有ポリペプチドを指し、そのような改変は、抗原に対するVHH含有ポリペプチドの親和性の改善をもたらす。

30

【0059】

本明細書で使用される場合、「ヒト化VHH」は、1つ以上のフレームワーク領域がヒトフレームワーク領域と実質的に置き換えられているVHHを指す。場合によっては、ヒト免疫グロブリンの特定のフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化VHHは、元のVHHにもヒトフレームワーク配列にも存在しないが、VHHまたはVHH含有ポリペプチドの性能をさらに改善および最適化するために含まれる残基を含むことができる。いくつかの実施形態では、ヒト化VHH含有ポリペプチドは、ヒトFc領域を含む。理解されるように、ヒト化配列は、その一次配列によって同定され得、抗体が作られたプロセスを必ずしも示すものではない。

40

【0060】

本明細書で使用される場合、「実質的に類似している」または「実質的に同じ」という用語は、当業者が、2つ以上の値の間の差を、当該値によって測定された生物学的特徴の文脈内で生物学的および/または統計的有意性がほとんどまたは全くないとみなすような、2つ以上の数値の間の十分に高度な類似性を示す。いくつかの実施形態では、2つ以上の実質的に類似した値は、約5%、10%、15%、20%、25%、または50%のいずれか1つ以下異なる。

【0061】

ポリペプチド「バリエーション」は、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮せ

50

ず、最大の配列同一性パーセントを達成するために、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入した後に、天然配列ポリペプチドと少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する生物学的に活性なポリペプチドを意味する。そのようなバリエーションには、例えば、ポリペプチドのN末端またはC末端に、1つ以上のアミノ酸残基が付加または欠失されるポリペプチドが含まれる。いくつかの実施形態では、バリエーションは、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションは、少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、バリエーションは、天然配列ポリペプチドと少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

#### 【0062】

本明細書で使用される場合、ペプチド、ポリペプチド、または抗体配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」および「相同性」は、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮せず、最大の配列同一性パーセントを達成するために、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入した後に、特定のペプチドまたはポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基の百分率として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的でのアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、またはMEGALIGN(商標)(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当該技術の範囲内である様々な方法で達成され得る。当業者は、比較されている配列の完全長にわたって最大アラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。

#### 【0063】

アミノ酸置換は、ポリペプチド中の1つのアミノ酸を別のアミノ酸と置き換えることを含み得るが、これに限定されない。例示的な置換を表2に示す。アミノ酸置換は、目的の抗体に導入されてもよく、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の減少、またはADCCもしくはCDCの改善について、生成物がスクリーニングされてもよい。

【表2】

元の残基	例示的な置換
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn
Asn (N)	Gln ; His ; Asp, Lys ; Arg
Asp (D)	Glu ; Asn
Cys (C)	Ser ; Ala
Gln (Q)	Asn ; Glu
Glu (E)	Asp ; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; ノルロイシン
Leu (L)	ノルロイシン ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val ; Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; ノルロイシン

#### 【0064】

アミノ酸は、共通の側鎖特性に従ってグループ化され得る。

(1) 疎水性：N o r l o y s i n、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、

(2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n、

(3) 酸性：A s p、G l u、

(4) 塩基性：H i s、L y s、A r g、

(5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：G l y、P r o、

(6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【0065】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。

【0066】

「ベクター」という用語は、宿主細胞中で繁殖し得るクローニングされたポリヌクレオチド(複数可)を含有するように操作され得るポリヌクレオチドを説明するために使用される。ベクターは、以下の要素のうちの1つ以上を含むことができる：複製の起源、目的のポリペプチドの発現を制御する1つ以上の制御配列(例えば、プロモータおよび/もしくはエンハンサーなど)、ならびに/または1つ以上の選択可能なマーカー遺伝子(例えば、抗生物質耐性遺伝子、および比色アッセイ、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなどで使用され得る遺伝子など)。「発現ベクター」という用語は、宿主細胞中に目的のポリペプチドを発現するために使用されるベクターを指す。

【0067】

「宿主細胞」は、ベクターまたは単離ポリヌクレオチドのレシピエントであり得るか、またはそうであった細胞を指す。宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。例示的な真核細胞としては、霊長類または非霊長類動物細胞などの哺乳動物細胞、酵母などの真菌細胞、植物細胞、および昆虫細胞が挙げられる。非限定的な例示的な哺乳動物細胞としては、N S O細胞、P E R . C 6 (登録商標)細胞(C r u c e l l)、ならびに293およびC H O細胞、ならびに293 - 6 E、C H O - D G 4 4、C H O - K 1、C H O - S、およびC H O - D S細胞などのそれらの誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。宿主細胞は、単一の宿主細胞の子孫を含み、子孫は、自然変異、偶発的変異、または意図的な変異のため、元の親細胞と(形態またはゲノムD N A補体において)必ずしも完全に同一ではない場合がある。宿主細胞は、本明細書に提供されるポリヌクレオチド(複数可)を用いてインピボでトランスフェクトされた細胞を含む。

【0068】

本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、典型的には自然界に見られるか、または産生される構成成分のうちの少なくとも一部から分離された分子を指す。例えば、ポリペプチドは、それが産生された細胞の構成成分のうちの少なくとも一部から分離されたとき、「単離された」と称される。ポリペプチドが発現後に細胞によって分泌される場合、産生した細胞からポリペプチドを含有する上清を物理的に分離することは、ポリペプチドを「単離する」とみなされる。同様に、ポリヌクレオチドは、それが典型的には自然界に見られるより大きいポリヌクレオチドの一部(例えば、D N Aポリヌクレオチドの場合、ゲノムD N AもしくはミトコンドリアD N Aなど)ではない場合、または例えば、R N Aポリヌクレオチドの場合、それが産生された細胞の構成成分のうちの少なくとも一部から分離されている場合、「単離された」と称される。したがって、宿主細胞内のベクターに含有されるD N Aポリヌクレオチドは、「単離された」と称され得る。

【0069】

「個体」および「対象」という用語は、本明細書において互換的に使用されて、動物、例えば哺乳動物を指す。患者という用語は、ヒトおよび獣医学の対象を含む。いくつかの実施形態では、ヒト、齧歯類、サル、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、哺乳類実験動物、哺乳類家畜、哺乳類スポーツ動物、および哺乳類ペットを含む哺乳動物を治療する方法が提供される。対象は、男性または女性であってもよく、幼児、若年、青年、成人、および高齢者の対象を含む任意の好適な年齢であってもよい。いくつかの実施例

10

20

30

40

50

では、「個体」または「対象」は、疾患または障害の治療を必要とする個体または対象を指す。いくつかの実施形態では、治療を受ける対象は、対象が治療に関連性がある障害を有するか、または障害に罹患する十分なリスクがあるという事実を示す患者であり得る。特定の実施形態では、対象は、ヒト患者などのヒトである。

【0070】

本明細書で使用される場合、「疾患」または「障害」は、治療が必要とされる、かつ/または望ましい状態を指す。

【0071】

別段の指定がない限り、「腫瘍細胞」、「癌細胞」、「癌」、「腫瘍」、および/または「新生物」という用語は、本明細書において互換的に使用され、制御されない増殖、および/または細胞生存の異常な増加、および/または身体の器官および系の正常な機能を妨げるアポトーシスの阻害を示す細胞（複数可）を指す。この定義には、良性および悪性の癌、ポリープ、過形成、ならびに休眠腫瘍または微小転移が含まれる。

【0072】

「癌」および「腫瘍」という用語は、固形癌および血液癌/リンパ腺癌を包含し、また異形成などの悪性、前悪性、および良性の増殖も包含する。また、この定義には、免疫系（例えば、ウイルス感染細胞）によって妨げられない異常な増殖（例えば、免疫回避および免疫逃避機構）を有する細胞も含まれる。例示的な癌としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：基底細胞癌、胆道癌；膀胱癌；骨肉腫；脳ならびに中枢神経系癌；乳癌；腹膜癌；子宮頸癌；絨毛癌；結腸直腸癌；結合組織癌；消化器系癌；子宮内膜癌；食道癌；眼の癌；頭頸部癌；胃癌（gastric cancer）（消化管癌を含む）；膠芽腫；肝臓癌（hepatic carcinoma）；肝癌（hepatoma）；上皮内新生物；腎臓癌または腎癌；喉頭癌；白血病；肝臓癌（liver cancer）；肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、ならびに肺扁平上皮癌）；黒色腫；骨髄腫；神経芽腫；口腔癌（唇、舌、口、ならびに咽頭）；卵巣癌；膵臓癌；前立腺癌；網膜芽腫；横紋筋肉腫；直腸癌；呼吸器系癌；唾液腺癌；肉腫；皮膚癌；扁平上皮癌；胃癌（stomach cancer）；精巣癌；甲状腺癌；子宮癌もしくは子宮内膜癌；泌尿器系癌；外陰部癌；ホジキンリンパ腫ならびに非ホジキンリンパ腫、およびB細胞リンパ腫（低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む）を含むリンパ腫；小リンパ球性リンパ腫（SL）NHL；中悪性度/濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL；巨大腫瘤性病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；およびワルデンストレームマクログロブリン血症；慢性リンパ性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；有毛細胞性白血病；慢性骨髄芽球性白血病；および他の癌腫ならびに肉腫；および移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症に関連する異常な血管増殖、浮腫（脳腫瘍に関連するものなど）、およびメーグス症候群。

【0073】

本明細書で使用される場合、「非腫瘍細胞」という用語は、正常な細胞または組織を指す。例示的な非腫瘍細胞としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、樹状細胞、単球、マクロファージ、上皮細胞、線維芽細胞、肝細胞、間質性腎臓細胞、線維芽細胞様滑膜細胞、骨芽細胞、ならびに乳房、骨格筋、膵臓、胃、卵巣、小腸、胎盤、子宮、精巣、腎臓、肺、心臓、脳、肝臓、前立腺、結腸、リンパ器官、骨、および骨由来間葉系幹細胞に位置する細胞。本明細書で使用される場合、「末梢に位置する細胞または組織」という用語は、腫瘍細胞の近くおよび/または腫瘍微小環境内に位置しない非腫瘍細胞を指す。

【0074】

本明細書で使用される場合、「腫瘍微小環境内の細胞または組織」という用語は、腫瘍細胞を囲む、および/または腫瘍細胞に供給する細胞、分子、細胞外マトリックス、および/または血管を指す。腫瘍微小環境内の例示的な細胞または組織としては、以下が挙げ

られるが、これらに限定されない：腫瘍脈管構造；腫瘍浸潤リンパ球；線維芽細胞；血管内皮前駆細胞（EPC）；癌関連線維芽細胞；周皮細胞；他の間質細胞；細胞外マトリックス（ECM）の構成成分；樹状細胞；抗原提示細胞；T細胞；制御性T細胞（Treg細胞）；マクロファージ；好中球；骨髄由来抑制細胞（MDSC）、および腫瘍の近位に位置する他の免疫細胞。腫瘍細胞、および/または腫瘍微小環境内に位置する細胞/組織を特定する方法は、本明細書で以下に記載されるように、当該技術分野で周知である。

【0075】

いくつかの実施形態では、「増加」または「減少」はそれぞれ、統計的に有意な増加または減少を意味する。当業者に明らかになるように、「調節すること」は、同じ条件であるが試験薬が存在しないものと比較して、標的または抗原のそのリガンド、結合パートナー、ホモ多量体もしくはヘテロ多量体形態への会合のためのパートナー、または基質のうちの1つ以上に対する親和性、結合力、特性、および/または選択性の変化（増加または減少のいずれかであり得る）をもたらすこと、標的または抗原が存在する培地または環境における1つ以上の条件（pH、イオン強度、補因子の存在など）に対する標的または抗原の感受性の変化（増加または減少のいずれかであり得る）をもたらすこと、ならびに/または細胞増殖またはサイトカイン産生をもたらすことも伴い得る。これは、関与する標的に応じて、それ自体が既知の、もしくは本明細書に記載される、任意の好適な様式で、かつ/または任意の好適なアッセイを使用して決定され得る。

10

【0076】

本明細書で使用される場合、「免疫応答」とは、疾患（例えば、癌または癌転移）を阻害する、またはその発症を予防する、またはその症状を改善するのに充分である細胞性および/または液性免疫応答を包含することが意図される。「免疫応答」は、自然免疫系および適応免疫系の両方の態様を包含し得る。

20

【0077】

本明細書で使用される場合、疾患、障害、または状態の「治療すること」、「治療」、または「療法」という用語は、有益なまたは所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本明細書で使用される場合、「治療」は、ヒトを含む哺乳動物における疾患のための治療薬の任意の投与または適用を包含する。本開示の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果としては、以下のいずれか1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない：1つ以上の症状の軽減、疾患の程度の減少、疾患の広がり（例えば、転移、例えば、肺またはリンパ節への転移）の予防または遅延、疾患の再発の予防または遅延、疾患進行の遅延または減速、病態の改善、疾患または疾患の進行の阻害、疾患またはその進行の阻害または減速、その発症の停止、および寛解（部分が完全かを問わず）。また、増殖性疾患の病理学的結果の低減も「治療」に包含される。本明細書に提供される方法は、治療のこれらの態様のいずれか1つ以上を企図する。上記に従って、治療という用語は、障害のすべての態様の100パーセントの除去を必要としない。

30

【0078】

癌の文脈において本明細書で使用される場合、癌の「治療」、または「阻害する」、「阻害すること」、もしくは「阻害」という用語は、以下のうちの少なくとも1つを指す：固形腫瘍の反応評価基準（RECIST）、または無増悪生存期間（PFS）もしくは全生存期間（OS）の統計的に有意な延長などが挙げられるが、これらに限定されない標準的な基準によって測定される、腫瘍増殖速度の統計的に有意な減少、腫瘍増殖の停止、または腫瘍のサイズ、質量、代謝活性、もしくは体積の低減。

40

【0079】

「改善すること」とは、治療薬を投与しない場合と比較して、1つ以上の症状の低下または改善を意味する。「改善すること」はまた、症状の期間の短縮または低減を含む。

【0080】

疾患または障害の「予防すること」、「予防（prophylaxis）」、または「予防（prevention）」は、疾患もしくは障害または疾患もしくは障害の症状の一部もしくはすべての発生もしくは発症を予防するため、または疾患もしくは障害の発症

50

の可能性を低下させるために、単独または別の化合物との組み合わせのいずれかでの医薬組成物の投与を指す。

【0081】

「阻害」または「阻害する」という用語は、任意の表現型特性の減少もしくは停止、またはその特性の発生率、程度、もしくは可能性の減少もしくは停止を指す。「低減」または「阻害」することは、参照と比較して活性、機能、および/または量を減少させる、低減する、または停止することである。いくつかの実施形態では、「低減する」または「阻害する」とは、10%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。いくつかの実施形態では、「低減する」または「阻害する」とは、50%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。いくつかの実施形態では、「低減する」または「阻害する」とは、75%、85%、90%、95%、またはそれ以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。いくつかの実施形態では、上述の量は、ある期間にわたって、同じ期間にわたる対照と比較して阻害されるか、または減少する。

10

【0082】

本明細書で使用される場合、「疾患の発症の遅延」は、疾患（癌など）の発症を延ばす、妨げる、減速する、遅らせる、安定化する、抑制する、かつ/または延期することを意味する。この遅延は、治療されている疾患および/または個体の病歴に応じて、異なる長さの時間であり得る。当業者に明らかであるように、十分または有意な遅延は、個体が疾患を発症しないという点で、実質的に予防を包含し得る。例えば、転移の発症などの末期癌が遅延され得る。

20

【0083】

本明細書で使用される場合、「予防すること (Preventing)」は、疾患にかかりやすい可能性があるが、疾患とまだ診断されていない対象における疾患の発生または再発に関する予防 (prophylaxis) を提供することを含む。別段の定めがない限り、「低減する」、「阻害する」、または「予防する」という用語は、すべての時間にわたる完全な予防を意味または要求するものではなく、測定されている期間のみにわたる。

【0084】

「抗癌剤」という用語は、1つ以上の癌の治療で使用される薬剤を指すために、本明細書においてその最も広い意味で使用される。そのような薬剤の例示的なクラスとしては、化学療法薬、抗癌生物製剤（サイトカイン、受容体細胞外ドメイン - Fc 融合体、および抗体など）、放射線療法、CAR-T療法、治療用オリゴヌクレオチド（アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび siRNA など）、ならびに腫瘍溶解性ウイルスが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0085】

「生物学的試料」という用語は、生きているものまたは以前に生きていたものに由来するある量の物質を意味する。そのような物質としては、血液（例えば、全血）、血漿、血清、尿、羊水、滑液、内皮細胞、白血球、単球、他の細胞、器官、組織、骨髄、リンパ節、および脾臓が挙げられるが、これらに限定されない。

【0086】

「対照」または「参照」という用語は、分析物を含有しない（「陰性対照」）、または分析物を含有する（「陽性対照」）ことが知られている組成物を指す。陽性対照は、既知の濃度の分析物を含み得る。

40

【0087】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、単独で（すなわち、単剤療法として）、または追加の治療薬と組み合わせてのいずれかで患者に投与された場合、例えば、疾患の症状および/または原因の改善または排除によって、疾患進行の統計的に有意な減少をもたらす、活性成分（例えば、s d A b または V H H 含有ポリペプチド）を含有する組成物の量および/または濃度を指す。有効量は、疾患もしくは障害に関連する少なくとも1つの症状または生物学的応答もしくは効果を緩和する、低下させる、もしくは軽減する、または疾患もしくは障害の進行を予防する、または患者の身体機能を改善する量であり得

50

る。活性薬剤を含有する組成物の治療有効量は、個体の病態、年齢、性別、および体重、ならびに個体において所望の応答を誘発する活性薬剤の能力などの要因に応じて異なり得る。治療有効量はまた、治療上有益な効果が活性薬剤の任意の毒作用または有害作用を上回るものでもある。治療有効量は、1つ以上の投与で送達されてもよい。治療有効量は、望ましい治療結果および/または予防結果を達成するために必要な投与量および期間での有効な量を指す。

【0088】

本明細書で使用される場合、組成物は、細胞を含む2つ以上の生成物、物質、または化合物の任意の混合物を指す。それは、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。

10

【0089】

「医薬製剤」および「医薬組成物」という用語は、活性成分（複数可）の生物学的活性が有効であることを可能にするような形態であり、製剤が投与される対象に対して許容できないほど有毒である追加の構成成分を含有しない、調製物を指す。したがって、それは、哺乳動物対象、しばしばヒトにおける医薬用途に好適な組成物である。医薬組成物は典型的には、有効量の活性剤（例えば、s d A bまたはV H H含有ポリペプチド）、および担体、賦形剤、または希釈剤を含む。担体、賦形剤、または希釈剤は典型的には、それぞれ薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤である。そのような製剤は、滅菌されていてもよい。

【0090】

20

「薬学的に許容される担体」は、対象への投与のための「医薬組成物」を一緒に含む治療薬と併用するための、当該技術分野で従来の非毒性の固体、半固体、または液体の充填剤、希釈剤、封入材料、製剤補助剤、または担体を指す。薬学的に許容される担体は、採用される投与量および濃度でレシピエントに非毒性であり、製剤の他の成分と適合性がある。薬学的に許容される担体は、採用される製剤に適している。

【0091】

1つ以上のさらなる治療薬「と組み合わせた」投与は、任意の順序での同時（併用）および連続投与を含む。

【0092】

「同時に」という用語は、本明細書において、投与の少なくとも一部が時間において重複する、または1つの治療薬の投与が、他の治療薬の投与に対して短い期間内にある、または両方の薬剤の治療効果が少なくともある期間にわたって重複する、2つ以上の治療薬の投与を指すために使用される。

30

【0093】

「連続的に」という用語は、本明細書において、時間において重複しない、または薬剤の治療効果が重複しない、2つ以上の治療薬の投与を指すために使用される。

【0094】

本明細書で使用される場合、「と併せて」とは、別の治療モダリティに加えた1つの治療モダリティの投与を指す。したがって、「と併せて」とは、個体への他の治療モダリティの投与の前、最中、または後の1つの治療モダリティの投与を意味する。

40

【0095】

「添付文書」という用語は、適応症、用法、投与量、投与、併用療法に関する情報を含む治療用製品の市販パッケージに通常含まれる説明書を指し、そのような治療用製品の使用に関するジカチオンおよび/または警告を含むために使用される。

【0096】

「製品」は、少なくとも1つの試薬、例えば、疾患もしくは障害（例えば、癌）の治療のための薬剤、または本明細書に記載されるバイオマーカーを特異的に検出するためのプローブを含む任意の製造物（例えば、パッケージもしくは容器）またはキットである。いくつかの実施形態では、製造物またはキットは、本明細書に記載される方法を実施するためのユニットとして促進、流通、または販売される。

50

## 【0097】

「標識」および「検出可能な標識」という用語は、例えば、抗体または抗原に結合されて、特異的結合対のメンバー間の反応（例えば、結合）を検出可能な状態にする部分を意味する。特異的結合対の標識されたメンバーは、「検出可能に標識された」と称される。したがって、「標識された結合タンパク質」という用語は、結合タンパク質の同定を提供する標識が組み込まれたタンパク質を指す。いくつかの実施形態では、標識は、視覚的手段または機器による手段、例えば、放射性標識アミノ酸の組み込み、またはマークされたアビジン（例えば、光学的方法または比色法によって検出され得る蛍光マーカ—もしくは酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出され得るピオチニル部分のポリペプチドへの結合によって検出可能であるシグナルを発生させることができる、検出可能なマーカ—である。ポリペプチドの標的の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：放射性同位体または放射性核種（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、または $^{153}\text{Sm}$ ）；色原体、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド発光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）；化学発光マーカ—；ピオチニル基；二次レポ—ターによって認識される所定のポリペプチドエピト—プ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピト—プタグ）；およびガドリニウムキレートなどの磁性剤。免疫測定法に一般的に採用される標識の代表例としては、光を発生させる部分、例えば、アクリジニウム化合物、および蛍光を発生させる部分、例えば、フルオレセインが挙げられる。この点に関して、部分自体は、検出可能に標識されていないが、さらに別の部分と反応すると検出可能になり得る。

10

20

## 【0098】

## II . PD - 1 に結合する VHH ドメイン

PD - 1 に特異的に結合する少なくとも1つのVHHドメインを含有するVHH含有ポリペプチドである、PD - 1 結合ポリペプチドが本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、VHHドメインは、ヒトPD - 1 に結合する。いくつかの実施形態では、VHHドメインは、カニクイザルPD - 1 に結合する。いくつかの実施形態では、VHHドメインは、マウスPD - 1 に結合する。いくつかの実施形態では、VHH含有ポリペプチドは、本明細書に提供されるVHHドメインの複数のコピーを組み込む。そのような実施形態では、VHH含有ポリペプチドは、同じVHHドメインの複数のコピーを組み込んでよい。いくつかの実施形態では、VHH含有ポリペプチドは、異なっているが、同じPD - 1 上の同じエピト—プを認識するVHHドメインの複数のコピーを組み込んでよい。VHH含有ポリペプチドは、以下のセクションIII に記載される任意のものを含む、様々なフォーマットでフォーマットされ得る。

30

## 【0099】

VHHドメインは、特定の抗原に選択的に結合することが可能である単一単量体可変抗体ドメインである抗体断片である。分子量がわずかに12 ~ 15 kDaで、VHHドメイン（単ドメイン抗体とも呼ばれる）は、2つの重タンパク質鎖および2つの軽鎖から構成される共通抗体（150 ~ 160 kDa）よりもはるかに小さく、Fab断片（約50 kDa、1つの軽鎖および半分の重鎖）ならびに単鎖可変断片（約25 kDa、2つの可変ドメイン、軽鎖からの1つおよび重鎖からの1つ）よりもさらに小さい。

40

## 【0100】

単ドメイン抗体は、その相補性決定領域が単ドメインポリペプチドの一部である抗体である。例としては、重鎖抗体、軽鎖を天然に欠く抗体、従来の4鎖抗体に由来する単ドメイン抗体、操作された抗体、および抗体由来のもの以外の単ドメイン足場が挙げられるが、これらに限定されない。単ドメイン抗体は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、アルパカ、ビクーナ、グアナコ、サメ、ヤギ、ウサギ、および/またはウシが挙げられるが、これらに限定されない任意の種に由来し得る。いくつかの実施形態では、本明細書で使用される単ドメイン抗体は、軽鎖を欠く重鎖抗体として既知の自然発生的な単ドメ

50

イン抗体である。明確にするために、軽鎖を天然に欠く重鎖抗体由来のこの可変ドメインは、VHHとして本明細書において既知であり、それを4鎖免疫グロブリンの従来のVHと区別する。そのようなVHH分子は、ラクダ科種、例えば、ラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ、ビクーナ、およびグアナコにおいて作られた抗体に由来し得る。ラクダ科以外の他の種は、軽鎖を天然に欠く重鎖抗体を産生し得る。そのようなVHHは、本開示の範囲内である。

【0101】

PD-1に対する所望の特異性を有するVHH結合ポリペプチドを含むVHHドメインのスクリーニング方法としては、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、酵素アッセイ、フローサイトメトリー、および当該技術分野内で既知の他の免疫学的媒介技術が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0102】

本明細書に提供される提供されたVHHドメインの中は、以下に記載されるいずれかのような、PD-1 VHH(ラマまたはアルパカ由来)およびヒト化配列がある。

【0103】

いくつかの実施形態では、PD-1に結合するVHHドメインは、ヒト化されてもよい。ヒト化抗体(VHH含有ポリペプチドなど)は、非ヒト抗体に対するヒトの免疫応答を低減または排除するため、ヒト化抗体は、治療用分子として有用であり、これは、抗体治療薬に対する免疫応答、および治療薬の有効性の減少をもたらす得る。概して、ヒト化抗体は、CDR(またはその一部分)が非ヒト抗体に由来し、FR(またはその一部分)がヒト抗体配列に由来している、1つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、任意選択的に、ヒト定常領域の少なくとも一部分を含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体中の一部のFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を回復または改善するために、非ヒト抗体(例えば、CDR残基が由来する抗体)からの対応する残基で置換される。

20

【0104】

ヒト化抗体およびその作製方法は、例えば、Almagro and Fransson, (2008) Front. Biosci. 13: 1619-1633で考察され、例えば、Riechmann et al., (1988) Nature 332: 323-329、Queen et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033、米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号、および同第7,087,409号、Kashmiri et al., (2005) Methods 36: 25-34、Padlan, (1991) Mol. Immunol. 28: 489-498(「再表面化」について記載)、Dall'Acqua et al., (2005) Methods 36: 43-60(「FRシャッフリング」について記載)、ならびにOsbourne et al., (2005) Methods 36: 61-68、およびKlimka et al., (2000) Br. J. Cancer, 83: 252-260(FRシャッフリングに対する「誘導選択」アプローチについて記載)にさらに記載されている。

30

【0105】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:「ベストフィット」法を使用して選択されるフレームワーク領域(例えば、Sims et al. (1993) J. Immunol. 151: 2296を参照)、重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域(例えば、Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285、およびPresta et al. (1993) J. Immunol, 151: 2623を参照)、ヒト成熟(体細胞変異した)フレームワーク領域またはヒト生殖系列フレームワーク領域(例えば、Almagro and Fransson, (2008) Front. Biosci. 13: 1619-1633を参照)、ならびにFRライブラリーのスクリーニングに由来するフレームワーク領域(例えば、Baca et al., (1997) J. Biol. Chem. 272: 1067

40

50

8 - 10684、およびRosok et al., (1996) J. Biol. Chem. 271:22611-22618を参照)。典型的には、VHHのFR領域は、ヒトFR領域で置き換えられて、ヒト化VHHを作製する。いくつかの実施形態では、ヒト化VHHの1つ以上の特性を改善するために、ヒトFRの特定のFR残基が置き換えられる。そのような置き換えられた残基を有するVHHドメインは、本明細書では依然として「ヒト化」と称される。

【0106】

配列番号251~267もしくは284のいずれかから選択されるVHHアミノ酸配列、または配列番号251~267もしくは284のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列中に含有されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、PD-1に結合するVHHドメインが本明細書に提供される。

10

【0107】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1 VHHドメインは、配列番号284に記載されるVHHドメイン、または配列番号284に記載される選択されたVHH領域アミノ酸と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列中に含有されるCDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの実施形態では、PD-1 VHHドメインは、配列番号284に記載されるアミノ酸配列、または配列番号284に記載される選択されたアミノ酸と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、PD-1 VHHドメインは、配列番号284に記載されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

20

【0108】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1 VHHドメインは、配列番号312に記載されるVHHドメイン、または配列番号312に記載される選択されたVHH領域アミノ酸と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列中に含有されるCDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの実施形態では、PD-1 VHHドメインは、配列番号312に記載されるアミノ酸配列、または配列番号312に記載される選択されたアミノ酸と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、PD-1 VHHドメインは、配列番号312に記載されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

30

【0109】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1 VHHドメインは、配列番号268、272、273、または313のいずれか1つに記載されるCDR1、配列番号278または314に記載されるCDR2、および配列番号283または315に記載されるCDR3を含有する。

40

【0110】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1 VHHドメインは、それぞれ配列番号272、278、および283に記載されるCDR1、CDR2およびCDR3を含有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1 VHHドメインは、それぞれ配列番号268、278、および283に記載されるCDR1、CDR2およびCDR3を含有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1 VHHドメインは、それぞれ配列番号272、278、および283に記載されるCDR1、CDR2およびCDR3を含有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1 VHHドメインは、それぞれ配列番号273、278、および283に記載されるCDR1、CDR2およびCDR3を含有する。いくつかの実施形態では、本明細

50

書に提供される PD - 1 VHHドメインは、それぞれ配列番号 313、314、および 315 に記載される CDR1、CDR2 および CDR3 を含有する。

【0111】

いくつかの態様では、PD - 1 に結合する VHHドメインは、配列番号 251 ~ 267 のいずれかから選択される VHHアミノ酸配列、または配列番号 251 ~ 267 のいずれか 1 つから選択される VHH領域アミノ酸と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列中に含有される CDR1、CDR2、および CDR3 を含む。

【0112】

場合によっては、提供される PD - 1 VHHドメインは、配列番号 251 ~ 267 のいずれかに記載されるアミノ酸配列、または配列番号 251 ~ 267 のいずれか 1 つから選択される VHH領域アミノ酸と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、ヒト化バリエーションである。いくつかの実施形態では、PD - 1 ヒト化 VHHドメインは、配列番号 251 ~ 267 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸の配列を有する。

10

【0113】

配列番号 287、288、289、もしくは 290 のいずれかから選択される VHHアミノ酸配列、または配列番号 296、297、298、もしくは 299 のいずれか 1 つから選択される VHH領域アミノ酸と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列中に含有される CDR1、CDR2、および CDR3 を含む、PD - 1 に結合する VHHドメインが本明細書に提供される。

20

【0114】

いくつかの実施形態では、PD - 1 VHHドメインは、配列番号 296、297、298、または 299 に記載されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

【0115】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される PD - 1 VHHドメインは、配列番号 300、303、306、または 309 のいずれか 1 つに記載される CDR1、配列番号 301、304、307、または 310 に記載される CDR2、配列番号 302、305、308、または 311 に記載される CDR3 を含有する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される PD - 1 VHHドメインは、配列番号 300 に記載される CDR1、配列番号 301 に記載される CDR2、および配列番号 302 に記載される CDR3 を含有するか、本明細書に提供される PD - 1 VHHドメインは、配列番号 303 に記載される CDR1、配列番号 304 に記載される CDR2、および配列番号 305 に記載される CDR3 を含有するか、本明細書に提供される PD - 1 VHHドメインは、配列番号 306 に記載される CDR1、配列番号 307 に記載される CDR2、および配列番号 308 に記載される CDR3 を含有するか、または本明細書に提供される PD - 1 VHHドメインは、配列番号 309 に記載される CDR1、配列番号 310 に記載される CDR2、および配列番号 311 に記載される CDR3 を含有する。

30

【0116】

III. PD - 1 結合ポリペプチドを含有する融合タンパク質およびコンジュゲート

本明細書において、1 つ以上の追加のドメインまたは部分に直接または間接的に連結された PD - 1 に特異的に結合する少なくとも 1 つの VHHドメインを含有する PD - 1 結合ポリペプチドを含有する、融合タンパク質およびコンジュゲートが提供される。いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質またはコンジュゲートは、単一ポリペプチドから構成される。いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質またはコンジュゲートは、2 つ以上のポリペプチドから構成される。いくつかの実施形態では、本開示の PD - 1 結合ポリペプチドは、PD - 1 に特異的に結合する少なくとも 1 つの VHHドメインを組み込む。いくつかの態様では、PD - 1 結合ポリペプチドは、多価である。いくつかの実施形態では、PD - 1 結合ポリペプチドは、PD - 1 に特異的に結合する VHHドメ

40

50

インの2つ以上のコピー、例えば、PD-1に特異的に結合するVHHドメインの3つ以上、4つ以上、5つ以上、または6つ以上のコピーを含む。特定の態様では、PD-1結合ポリペプチドは、多重特異性である。例えば、場合によっては、1つ以上の追加のドメインは、1つ以上のさらなる抗原またはタンパク質に結合する1つ以上の追加の結合ドメインであってもよい。

#### 【0117】

いくつかの実施形態では、本開示のPD-1結合ポリペプチドは、アミノ酸リンカーを介して作動可能に連結された2つ以上のポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、これらのリンカーは、本明細書においてGSリンカーとして示される、アミノ酸グリシンおよびセリンから主に構成される。本開示の融合タンパク質のGSリンカーは、様々な長さ、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20アミノ酸長であり得る。いくつかの実施形態では、GSリンカーは、GGSGGS、すなわち、(GGS)<sub>2</sub>(配列番号1)、GGSGGSGGS、すなわち、(GGS)<sub>3</sub>(配列番号2)、GGSGGSGGSGGS、すなわち、(GGS)<sub>4</sub>(配列番号3)、およびGGSGGSGGSGGSGGS、すなわち、(GGS)<sub>5</sub>(配列番号4)からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、非限定的な例として、GG、GGG、GGGG(配列番号5)、GGGGG(配列番号6)、およびGGGGGG(配列番号7)などのグリシン残基を含む可動性リンカーである。いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、GSリンカーとグリシンリンカーとの組み合わせを含む。

#### 【0118】

##### A. Fc融合体

本明細書に提供されるPD-1に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、Fcドメインとを含有する融合タンパク質である、PD-1結合ポリペプチドが本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1結合ポリペプチドは、PD-1に結合する1、2、3、または4個のVHHドメインと、Fcドメインと、を含む。

#### 【0119】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質への免疫グロブリンFc領域の組み込みは、いくつかの態様では、一緒に二量体を形成する2つのポリペプチドから構成され得る。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、PD-1結合部位の数を2倍にする二量体が形成されるように、細胞から発現される場合などの生理学的条件下でPD-1結合ポリペプチドの二量体化を媒介する。例えば、PD-1に結合する3つのVHHドメインと、Fc領域と、を含むPD-1結合ポリペプチドは、単量体として三価であるが、Fc領域は、二量体化を媒介してもよく、このため、PD-1結合ポリペプチドは、そのような条件下で六価二量体として存在する。いくつかの実施形態では、PD-1 VHHドメインは、IgG Fc領域に融合され、これらの実施形態では、融合タンパク質は、分子当たり2つのPD-1 VHHドメインを有する二価である。いくつかの実施形態では、2つのPD-1結合ドメイン(2x)は、IgG Fc領域に融合され、これらの実施形態では、融合タンパク質は、分子当たり4つのPD-1 VHHドメインを有する四価である。いくつかの実施形態では、3つのPD-1 VHHドメイン(3x)は、IgG Fc領域に融合され、これらの実施形態では、融合タンパク質は、分子当たり6つのPD-1 VHHドメインを有する六価である。

#### 【0120】

いくつかの実施形態では、多価PD-1結合ポリペプチドは、二価である。いくつかの実施形態では、本開示の二価PD-1結合ポリペプチドは、以下の構造を有するPD-1結合ポリペプチドの2つのコピーを含む：(PD-1 VHH)-リンカー-Fc。いくつかの実施形態では、多価PD-1結合ポリペプチドは、四価である。いくつかの実施形態では、本開示の四価PD-1結合ポリペプチドは、以下の構造を有するPD-1-ポリペプチドの2つのコピーを含む：(PD-1 VHH)-リンカー-(PD-1 VHH)

- リンカー - F c。いくつかの実施形態では、多価 P D - 1 結合ポリペプチドは、六価である。いくつかの実施形態では、本開示の六価 P D - 1 結合ポリペプチドは、以下の構造を有する P D - 1 結合ポリペプチドの 2 つのコピーを含む：( P D - 1 V H H ) - リンカー - ( P D - 1 V H H ) - リンカー - ( P D - 1 V H H ) - リンカー - F c。

【 0 1 2 1 】

場合によっては、F c 領域の C H 3 ドメインがホモ二量体化ドメインとして使用され得、このため、結果として得られる融合タンパク質は、2 つの同一のポリペプチドから形成される。他の場合では、F c 領域の C H 3 二量体界面領域は、ヘテロ二量体化を可能にするように変異され得る。例えば、ヘテロ二量体化ドメインは、構築物が非対称融合タンパク質であるように、融合タンパク質に組み込まれ得る。

10

【 0 1 2 2 】

提供される実施形態のいずれかにおいて、P D - 1 V H H ドメインは、上記のいずれかであり得る。いくつかの実施形態では、P D - 1 V H H ドメインは、P D - 1 に結合するヒト化 V H H ドメインである。

【 0 1 2 3 】

様々な実施形態では、P D - 1 結合ポリペプチド中に含まれる F c ドメインは、ヒト F c ドメインであるか、またはヒト F c ドメインに由来する。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、免疫グロブリン F c 領域を含有する。いくつかの実施形態では、免疫グロブリン F c 領域は、I g G 1 アイソタイプ、I g G 2 アイソタイプ、I g G 3 アイソタイプ、および I g G 4 サブクラスからなる群から選択される I g G アイソタイプである。

20

【 0 1 2 4 】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン F c 領域またはその免疫学的に活性な断片は、I g G アイソタイプである。例えば、融合タンパク質の免疫グロブリン F c 領域は、以下のアミノ酸配列を有するヒト I g G 1 アイソタイプである：

P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S  
H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S  
V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G  
Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V  
E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W  
Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K ( 配列番号 8 )

30

【 0 1 2 5 】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン F c 領域またはその免疫学的に活性な断片は、配列番号 8 のアミノ酸配列と少なくとも 5 0 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一であるヒト I g G 1 ポリペプチド配列を含む。

【 0 1 2 6 】

本開示の融合タンパク質が F c ポリペプチドを含むいくつかの実施形態では、F c ポリペプチドは、変異または修飾される。場合によっては、変異は、F c ポリペプチドのエフェクター機能を低減するための 1 つ以上のアミノ酸置換を含む。以下に記載されるいずれかを含む、エフェクター機能を改変する、例えば、低減するための F c ポリペプチドに対する変異の様々な例が既知である。いくつかの実施形態では、F c 領域内のアミノ酸置換への言及は、特定の配列番号を参照して記載されない限り、K a b a t による E U ナンバリング ( K a b a t ナンバリングとも呼ばれる ) によるものである。E U ナンバリングは既知であり、最新の I M G T S c i e n t i f i c C h a r t ( I M G T ( 登録商標 )、the international Immunogenetics information system ( 登録商標 )、[http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu\\_IGHGnber.html](http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html) ( 作成：2001年5月17日、最終更新：2013年1月10日 )、および K a b a t, E. A. et al. Sequences of Proteins of Immunological interest. 5th ed. US Departmen

40

50

t of Health and Human Services, NIH公開番号91-3242(1991)で報告されているEUIンデックスに従っている。

【0127】

いくつかの実施形態では、低減されたエフェクター機能を示すFc領域は、PD-1またはCD3結合が望ましいが、特定のエフェクター機能(CDCおよびADCCなど)が不要または有害である用途のための望ましい候補であり得る。CDCおよび/またはADCC活性の低減/減少を確認するために、インビトロおよび/またはインビボ細胞傷害性アッセイが実施され得る。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイは、多重特異性ポリペプチド構築物および/またはその切断された構成成分が、FcR結合を欠く(したがってADCC活性を欠く可能性が高い)が、FcRn結合能力を保持することを確実にするために、実施され得る。ADCC、NK細胞を媒介するための初代細胞がFcRIIのみを発現する一方で、単球は、FcRI、FcRII、およびFcRIIIを発現する。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号(例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063(1986)を参照)、およびHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502(1985)、米国特許第5,821,337号(Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361(1987)を参照)に記載されている。代替的に、非放射性アッセイ方法が採用されてもよい(例えば、フローサイトメトリーのためのACTI(商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Cell Technology, Inc. Mountain View, Calif., およびCytotoxic 96(商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega, Madison, Wis.)を参照)。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。代替的または追加的に、目的の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656(1998)に開示されるような動物モデルにおいて評価され得る。C1q結合アッセイも、多重特異性ポリペプチド構築物またはその切断された構成成分がC1qに結合することができず、したがってCDC活性を欠くことを確認するために実施され得る。例えば、WO2006/029879およびWO2005/100402のC1qおよびC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイが実施され得る(例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163(1996)、Cragg, M. S. et al., Blood 101:1045-1052(2003)、およびCragg, M. S. and M. J. Glennie, Blood 103:2738-2743(2004)を参照)。FcRn結合およびインビボクリアランス/半減期の決定も、当該技術分野で既知の方法を使用して実施され得る(例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006)を参照)。

【0128】

いくつかの実施形態では、ヒトIgG Fc領域は、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害性(CDC)を改変するために修飾され、例えば、Natsume et al., 2008 Cancer Res, 68(10):3863-72、Idusogie et al., 2001 J Immunol, 166(4):2571-5、Moore et al., 2010 mAbs, 2(2):181-189、Lazar et al., 2006 PNAS, 103(11):4005-4010、Shields et al., 2001 JBC, 276(9):6591-6604、Stavenhagen et al., 2007 Cancer Res, 67(18):8882-8890、Stavenhagen et al., 2008 Advan. Enzyme Regul., 48:152-164、Alegre et al.

10

20

30

40

50

, 1992 J Immunol, 148:3461-3468、Reviewed in Kaneko and Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1):1-11に記載されているアミノ酸修飾である。

【0129】

A D C Cを強化する変異の例としては、Ser 239およびIle 332での修飾、例えば、Ser 239 AspおよびIle 332 Glu (S 239 D、I 332 E)が挙げられる。C D Cを強化する変異の例としては、Lys 326およびGlu 333での修飾が挙げられる。いくつかの実施形態では、Fc領域は、これらの位置、例えば、Lys 326 Alaおよび/またはGlu 333 Ala (K 326 AおよびE 333 A)の一方または両方で、Kabatナンバリングシステムを使用して修飾される。

10

【0130】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、以下の位置のうちの一つ以上で改変されて、Fc受容体結合を低減する：Leu 234 (L 234)、Leu 235 (L 235)、Asp 265 (D 265)、Asp 270 (D 270)、Ser 298 (S 298)、Asn 297 (N 297)、Asn 325 (N 325)、またはAla 327 (A 327)、またはPro 329 (P 329)。例えば、Leu 234 Ala (L 234 A)、Leu 235 Ala (L 235 A)、Leu 235 Glu (L 235 E)、Asp 265 Asn (D 265 N)、Asp 265 Ala (D 265 A)、Asp 270 Asn (D 270 N)、Ser 298 Asn (S 298 N)、Asn 297 Ala (N 297 A)、Pro 329 Ala (P 329 A)、またはPro 239 Gly (P 329 G)、Asn 325 Glu (N 325 E)、またはAla 327 Ser (A 327 S)。好ましい実施形態では、Fc領域内の修飾は、Fc受容体 - ガンマ受容体への結合を低減する一方で、新生児Fc受容体 (FcRn) への結合への影響は最小限である。

20

【0131】

いくつかの実施形態では、ヒトIgG1 Fc領域は、アミノ酸Asn 297 (Kabatナンバリング)で修飾されて、融合タンパク質のグリコシル化、例えば、Asn 297 Ala (N 297 A)またはAsn 297 Asp (N 297 D)を防止する。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、アミノ酸Leu 235 (Kabatナンバリング)で修飾されて、Fc受容体相互作用を改変する(例えば、Leu 235 Glu (L 235 E)またはLeu 235 Ala (L 235 A))。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、アミノ酸Leu 234 (Kabatナンバリング)で修飾されて、Fc受容体相互作用を改変する(例えば、Leu 234 Ala (L 234 A))。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、アミノ酸Leu 234 (Kabatナンバリング)で修飾されて、Fc受容体相互作用を改変する(例えば、Leu 235 Glu (L 235 E))。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、アミノ酸234および235の両方で改変される(例えば、Leu 234 AlaおよびLeu 235 Ala (L 234 A / L 235 A)またはLeu 234 ValおよびLeu 235 Ala (L 234 V / L 235 A))。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、234、235、および297のアミノ酸で改変される(例えば、Leu 234 Ala、Leu 235 Ala、Asn 297 Ala (L 234 A / L 235 A / N 297 A))。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、234、235、および329のアミノ酸で改変される(例えば、Leu 234 Ala、Leu 235 Ala、Pro 239 Ala (L 234 A / L 235 A / P 329 A))。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、アミノ酸Asp 265 (Kabatナンバリング)で修飾されて、Fc受容体相互作用を改変する(例えば、Asp 265 Ala (D 265 A))。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、アミノ酸Pro 329 (Kabatナンバリング)で修飾されて、Fc受容体相互作用を改変する(例えば、Pro 329 Ala (P 329 A)またはPro 329 Gly (P 329 G))。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、アミノ酸265および329の両方で改変される(例えば、Asp 265 AlaおよびPro 329 Ala (D 265 A / P 3

30

40

50

29A) または Asp265Ala および Pro329Gly (D265A/P329G) )。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、234、235、および265のアミノ酸で改変される(例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Asp265Ala (L234A/L235A/D265A))。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、234、235、および329のアミノ酸で改変される(例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Pro329Gly (L234A/L235A/P329G))。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、234、235、265、および329のアミノ酸で改変される(例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Asp265Ala、Pro329Gly (L234A/L235A/D265A/P329G))。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、Gly235で改変されて、Fc受容体結合を低減する。例えば、Gly235は、融合タンパク質から欠失している。いくつかの実施形態では、ヒトIgG1 Fc領域は、アミノ酸Gly236で修飾されて、CD32Aとの相互作用を強化する(例えば、Gly236Ala (G236A))。いくつかの実施形態では、ヒトIgG1 Fc領域は、Lys447を欠く(Kabat et al 1991 Sequence s of Proteins of Immunological InterestのE Uインデックス)。

10

## 【0132】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、以下の位置の1つ以上でアミノ酸を欠いて、Fc受容体結合を低減する：Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、またはLeu235 (L235)。いくつかの実施形態では、融合タンパク質のFc領域は、以下の位置：Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、またはLeu235 (L235)の1つ以上でアミノ酸を欠いており、Asp265 (D265)、Asn297 (N297)、またはPro329 (P329)の1つ以上で修飾されて、Fc受容体結合を低減する。例えば、PD-1結合ポリペプチド中に含まれるFc領域は、ヒトFcドメインに由来し、IgG1 E233、L234、およびL235に対応する下部ヒンジの3つのアミノ酸欠失を含む。いくつかの態様では、そのようなFcポリペプチドは、FcRnに参与しないため、「エフェクターサイレント」または「エフェクターヌル」と称される。例えば、これらの3つのアミノ酸のFc欠失は、補体タンパク質C1q結合を低減する。いくつかの実施形態では、これらの3つのアミノ酸のFc欠失を有するFc領域を有するポリペプチドは、FcRnへの結合を保持し、したがって、FcRn媒介性再循環に関連する半減期およびトランスサイトーシスを増大させている。そのような修飾Fc領域は、「Fc xELL」または「Fc欠失」と称され、以下のアミノ酸配列を有する：

20

PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHED  
PE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLT  
VLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PR  
EPQVYTL P PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE  
SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQG  
NV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL S LSPGK (配列番号9)

30

40

## 【0133】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリンFc領域またはその免疫学的に活性な断片は、配列番号9のアミノ酸配列と少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヒトIgG1ポリペプチド配列を含む。

## 【0134】

いくつかの実施形態では、ヒトIgG Fc領域は、FcRn結合を強化するように修飾される。FcRnへの結合を強化するFc変異の例は、Met252Tyr、Ser254Thr、Thr256Glu(それぞれM252Y、S254T、T256E)(Kabatナンバリング、Dall'Acqua et al 2006, J. Biol Ch

50

em Vol. 281 (33) 23514 - 23524)、Met 428 LeuおよびAsn 434 Ser (M428L、N434S) (Zalovsky et al 2010 Nature Biotech, Vol. 28 (2) 157 - 159)、またはMet 252 Ile、Thr 256 Asp、Met 428 Leu (それぞれM252I、T256D、M428L) (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス)である。

【0135】

いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチド中に含まれるFcドメインは、ヒトFcドメインに由来し、本明細書において「Fc-YV」と称される変異M252YおよびM428Vを含む。いくつかの実施形態では、変異または修飾Fcポリペプチドは、Kabatナンバリングシステムを使用した以下の変異を含む：M252YおよびM428L。いくつかの実施形態では、そのような変異は、エンドソームの酸性pH (ほぼ6.5)でFcRnへの結合を強化する一方で、中性pH (約7.2)で検出可能な結合を失い、FcRn媒介性再循環の強化および半減期の延長を可能にする。

10

【0136】

いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチド中に含まれるFcドメインは、ヒトFcドメインに由来し、ヘテロ二量体化を誘発する変異を含む。いくつかの実施形態では、そのような変異は、「ノブ：および「ホール」変異と称されるものを含む。例えば、Thr 366でCH3ドメイン内にアミノ酸修飾を有することは、よりかさ高いアミノ酸、例えば、Try (T366W)で置き換えられた場合、位置Thr 366、Leu 368、およびTyr 407におけるあまりかさ高くないアミノ酸、例えば、それぞれSer、Ala、およびVal (T366S/L368A/Y407V)へのアミノ酸修飾を有する第2のCH3ドメインと優先的に対になることが可能である。いくつかの実施形態では、「ノブ」Fcドメインは、変異T366Wを含む。いくつかの実施形態では、「ホール」Fcドメインは、変異T366S、L368A、およびY407Vを含む。CH3修飾を介したヘテロ二量体化は、ジスルフィド結合の導入によって、例えば、反対側のCH3ドメイン上でSer 354をCys (S354C)およびY349をCys (Y349C)に変化させることによって、さらに安定化され得る (Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7 - 15で考察されている)。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体化に使用されるFcドメインは、ヘテロ二量体Fc対の第1のメンバー上の変異S354Cなどの追加の変異を含み、これは、ヘテロ二量体Fc対の第2のメンバー上の対応する変異Y349Cを有する非対称ジスルフィドを形成する。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体Fc対の1つのメンバーは、FcRn結合を維持しながら、プロテインA結合を防止するための修飾H435RまたはH435Kを含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体Fc対の1つのメンバーが修飾H435RまたはH435Kを含む一方で、ヘテロ二量体Fc対の第2のメンバーは、H435で修飾されない。様々な実施形態では、ホールFcドメインは、修飾H435RまたはH435Kを含む (修飾がH435Rである場合、「ホール-R」と称される)が、ノブFcドメインは含まない。場合によっては、ホール-R変異は、存在し得るホモ二量体ホールFcドメインよりもヘテロ二量体の精製を改善する。

20

30

40

【0137】

いくつかの実施形態では、ヒトIgG Fc領域は、二量体化を防止するように修飾される。これらの実施形態では、本開示の融合タンパク質は、単量体である。例えば、残基Thr 366での荷電残基への修飾、例えば、Thr 366 Lys、Thr 366 Arg、Thr 366 Asp、またはThr 366 Glu (それぞれT366K、T366R、T366D、またはT366E)は、CH3-CH3二量体化を防止する。

【0138】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質の免疫グロブリンFc領域または免疫学的に活性な断片は、以下のアミノ酸配列を有するヒトIgG2アイソタイプである：

50

P A P P V A G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H  
 E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V  
 L T V V H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q  
 P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I S V E  
 W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q  
 Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K ( 配列番号 1 0 )

【 0 1 3 9 】

いくつかの実施形態では、融合体またはその免疫学的に活性な断片は、配列番号 1 0 のアミノ酸配列と少なくとも 5 0 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一であるヒト I g G 2 ポリペプチド配列を含む。

10

【 0 1 4 0 】

いくつかの実施形態では、ヒト I g G 2 F c 領域は、アミノ酸 A s n 2 9 7 で修飾される ( 例えば、抗体のグリコシル化を防止するため、例えば、A s n 2 9 7 A l a ( N 2 9 7 A ) または A s n 2 9 7 A s p ( N 2 9 7 D ) ) 。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 2 F c 領域は、L y s 4 4 7 を欠く ( K a b a t e t a l 1 9 9 1 S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t の E U インデックス ) 。

【 0 1 4 1 】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質の免疫グロブリン F c 領域または免疫学的に活性な断片は、以下のアミノ酸配列を有するヒト I g G 3 アイソタイプである :

20

P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S  
 H E D P E V Q F K W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T F R V V S  
 V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G  
 Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V  
 E W E S S G Q P E N N Y N T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W  
 Q Q G N I F S C S V M H E A L H N R F T Q K S L S L S P G K ( 配列番号 1 1 )

【 0 1 4 2 】

いくつかの実施形態では、抗体またはその免疫学的に活性な断片は、配列番号 1 1 のアミノ酸配列と少なくとも 5 0 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一であるヒト I g G 3 ポリペプチド配列を含む。

30

【 0 1 4 3 】

いくつかの実施形態では、ヒト I g G 3 F c 領域は、アミノ酸 A s n 2 9 7 ( K a b a t ナンバリング ) で修飾されて、抗体のグリコシル化、例えば、A s n 2 9 7 A l a ( N 2 9 7 A ) または A s n 2 9 7 A s p ( N 2 9 7 D ) を防止する。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 3 F c 領域は、アミノ酸 4 3 5 で修飾されて、半減期を延長させる ( 例えば、A r g 4 3 5 H i s ( R 4 3 5 H ) ) 。いくつかの実施形態では、ヒト I g G 3 F c 領域は、L y s 4 4 7 を欠く ( K a b a t e t a l 1 9 9 1 S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t の E U インデックス ) 。

40

【 0 1 4 4 】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質の免疫グロブリン F c 領域または免疫学的に活性な断片は、以下のアミノ酸配列を有するヒト I g G 4 アイソタイプである :

P A P E F L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S  
 Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S  
 V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G  
 Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V  
 E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W  
 Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K ( 配列番号 1 2 )

50

## 【0145】

いくつかの実施形態では、抗体またはその免疫学的に活性な断片は、配列番号12のアミノ酸配列と少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヒトIgG4ポリペプチド配列を含む。

## 【0146】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質の免疫グロブリンFc領域または免疫学的に活性な断片は、以下のアミノ酸配列を有するヒトIgG4アイソタイプである：

P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S  
Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S  
V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G  
Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V  
E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W  
Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K (配列番号13)

10

## 【0147】

いくつかの実施形態では、抗体またはその免疫学的に活性な断片は、配列番号13のアミノ酸配列と少なくとも50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるヒトIgG4ポリペプチド配列を含む。

## 【0148】

いくつかの実施形態では、ヒトIgG4 Fc領域は、アミノ酸235で修飾されて、Fc受容体相互作用を改変する(例えば、Leu235Glu(L235E))。いくつかの実施形態では、ヒトIgG4 Fc領域は、アミノ酸Asn297(Kabatナンバリング)で修飾されて、抗体のグリコシル化、例えば、Asn297Ala(N297A)またはAsn297Asp(N297D)を防止する。いくつかの実施形態では、ヒトIgG4 Fc領域は、Lys447を欠く(Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス)。

20

## 【0149】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、免疫グロブリンヒンジ領域由来のポリペプチドを含有する。ヒンジ領域は、ヒトIgGサブクラスのいずれかから選択され得る。例えば、融合タンパク質は、EPKSSDKTHTCPPC(配列番号14)の配列を有する修飾IgG1ヒンジを含有してもよく、ここで、軽鎖のC末端システインとジスルフィドを形成するCys220中では、セリンに変異される(例えば、Cys220Ser(C220S))。他の実施形態では、融合タンパク質は、配列DKTHTCPPC(配列番号15)を有する切断ヒンジを含有する。

30

## 【0150】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、例えば、配列ESKYGPPCPPC(配列番号16)を有する鎖交換、例えば、Ser228Pro(S228P)を防止または低減するように修飾される、IgG4由来の修飾ヒンジを有する。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、リンカーポリペプチドを含有する。他の実施形態では、融合タンパク質は、リンカーポリペプチドおよびヒンジポリペプチドを含有する。

40

## 【0151】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、N297でN連結グリカン鎖に結合されたフコースを欠くか、またはそれを低減している。フコシル化を防止する方法は多数あり、FUT8欠損細胞株における産生、哺乳動物細胞培養培地への添加阻害剤、例えば、カスタノスペルミン、および産生細胞株の代謝工学が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0152】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、ヒトに見られる既存の抗体による認識を排除するように操作される。いくつかの実施形態では、本開示のVHH含有ポリペプチドは、位

50

置 Leu 11 の変異、例えば、Leu 11 Glu (L 11 E) または Leu 11 Lys (L 11 K) によって修飾される。他の実施形態では、本開示の単一ドメイン抗体は、カルボキシ末端領域の変化によって修飾され、例えば、末端配列は、配列 G Q G T L V T V K P G G (配列番号 17) もしくは G Q G T L V T V E P G G (配列番号 18)、またはその修飾を有する。いくつかの実施形態では、本開示の V H H 含有ポリペプチドは、11 位の変異およびカルボキシ末端領域の変化によって修飾される。

#### 【0153】

いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質の 1 つ以上のポリペプチドは、アミノ酸リンカーを介して作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、これらのリンカーは、本明細書において G S リンカーとして示される、アミノ酸グリシンおよびセリンから主に構成される。本開示の融合タンパク質の G S リンカーは、様々な長さ、例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 アミノ酸長であり得る。

10

#### 【0154】

いくつかの実施形態では、G S リンカーは、G G S G G S、すなわち、(G G S)<sub>2</sub> (配列番号 1)、G G S G G S G G S、すなわち、(G G S)<sub>3</sub> (配列番号 2)、G G S G G S G G S G G S、すなわち、(G G S)<sub>4</sub> (配列番号 3)、および G G S G G S G G S G G S G G S、すなわち、(G G S)<sub>5</sub> (配列番号 4) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、非限定的な例として、G G、G G G、G G G G (配列番号 5)、G G G G G (配列番号 6)、および G G G G G G (配列番号 7) などのグリシン残基を含む可動性リンカーである。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、G S リンカーとグリシンリンカーとの組み合わせを含むことができる。

20

#### 【0155】

##### B. コンジュゲート

本明細書に提供される P D - 1 に特異的に結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインと、1 つ以上のさらなる部分とを含有するコンジュゲートが、本明細書に提供される。さらなる部分は、細胞傷害性薬剤などの治療薬であってもよいが、または検出剤であってもよい。いくつかの実施形態では、部分は、標的化部分、小分子薬剤 (500 ダルトン未満のモル質量の非ポリペプチド薬剤)、毒素、細胞増殖抑制剤、細胞傷害性薬剤、免疫抑制剤、診断目的に好適な放射性薬剤、治療目的のための放射性金属イオン、プロドラッグ活性化酵素、生物学的半減期を延長させる薬剤、または診断用もしくは検出可能な薬剤であり得る。

30

#### 【0156】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、細胞傷害性、細胞増殖抑制性であるか、または別の方法で何らかの治療的利益を提供する治療薬にコンジュゲートされた、本明細書に提供される 1 つ以上の P D - 1 V H H ドメインを含有する、抗体薬剤コンジュゲート (A D C、イムノコンジュゲートとも呼ばれる) である。いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬剤は、化学療法薬、薬物、増殖阻害剤、毒素 (例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素、またはその断片)、または放射性同位体 (すなわち、放射性コンジュゲート) である。いくつかの実施形態では、本開示の提供される抗体薬剤コンジュゲートは、腫瘍への薬剤部分の標的化送達を可能にする。場合によっては、これは、腫瘍細胞の標的化死滅をもたらし得る。

40

#### 【0157】

いくつかの実施形態では、治療薬とコンジュゲートされた本明細書に提供される少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインを含む、P D - 1 結合コンジュゲートが提供される。いくつかの実施形態では、治療薬としては、例えば、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサート、およびビンデシンが挙げられる (Rowland et al., Cancer Immunol. Immunother. 21: 183 - 187, 1986)。いくつかの実施形態では、治療薬は、細胞内活性を有する。いくつかの実施形態では、P D - 1 結合コンジュゲートは内在化され、治療薬は、細胞のタンパク質合成を遮断し

50

、その中で細胞死をもたらす細胞毒素である。いくつかの実施形態では、治療薬は、例えば、ゲロニン、ボウガニン、サポリン、リシン、リシンA鎖、プリオジン、ジフテリア毒素、レストリクトシン、Pseudomonas外毒素A、およびそれらのバリエーションを含む、リボソーム不活性化活性を有するポリペプチドを含む細胞毒素である。いくつかの実施形態では、治療薬がリボソーム不活性化活性を有するポリペプチドを含む細胞毒素である場合、PD-1結合コンジュゲートは、タンパク質が細胞にとって細胞傷害性であるために、標的細胞への結合時に内在化されなければならない。

【0158】

いくつかの実施形態では、毒素とコンジュゲートされた本明細書に提供される少なくとも1つのPD-1 VHHドメインを含む、PD-1結合コンジュゲートが提供される。いくつかの実施形態では、毒素としては、例えば、ジフテリア毒素などの細菌毒素、リシンなどの植物毒素、ゲルダナマイシンなどの小分子毒素(Mandler et al., J. Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581(2000)、Mandler et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028(2000)、Mandler et al., Bioconjugate Chem. 13:786-791(2002))、メイタンシノイド(EP 1391213、Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623(1996))、およびカリケアマイシン(Lode et al., Cancer Res. 58:2928(1998)、Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342(1993))が挙げられる。毒素は、チューブリン結合、DNA結合、またはトポイソメラーゼ阻害を含む機構によって、その細胞傷害効果および細胞増殖抑制効果を発揮し得る。

【0159】

いくつかの実施形態では、検出可能なシグナルを間接的にまたは直接発生させることができる標識とコンジュゲートされた、本明細書に提供される少なくとも1つのPD-1 VHHドメインを含む、PD-1結合コンジュゲートが提供される。これらのIgSFコンジュゲートは、癌のインビボ検出などの研究または診断用途に使用され得る。標識は好ましくは、直接または間接的にいずれかで検出可能なシグナルを発生させることが可能である。例えば、標識は、放射線不透過性、もしくは<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>Iなどの放射性同位体；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリンなどの蛍光(フルオロフォア)もしくは化学発光(発色団)化合物；アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素；造影剤；または金属イオンであり得る。いくつかの実施形態では、標識は、シンチグラフィ研究のための放射性原子、例えば、<sup>99</sup>Tcもしくは<sup>123</sup>I、またはジルコニウム-89、ヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、もしくは鉄などの核磁気共鳴(NMR)画像法(磁気共鳴画像法、MRIとしても既知)のためのスピン標識である。ジルコニウム-89は、例えば、PET画像法のために、様々な金属キレート剤に複合体化され、抗体にコンジュゲートされてもよい(WO2011/056983)。

【0160】

PD-1結合コンジュゲートは、当該技術分野で既知の任意の方法を使用して調製され得る。例えば、WO2009/067800、WO2011/133886、および米国特許出願公開第2014322129号(参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

【0161】

いくつかの実施形態では、結合は、共有結合性または非共有結合性であり得、例えば、ピオチン-ストレプトアビジン非共有結合性相互作用を介してもよい。いくつかの実施形態では、同一であってもよいが、または異なってもよい1、2、3、4、5個、またはそれ以上の部分が、PD-1 VHHドメインにコンジュゲート、連結、または融合さ

10

20

30

40

50

れて、PD-1結合コンジュゲートを形成する。いくつかの実施形態では、そのような部分は、当該技術分野で既知であり、以下に記載される様々な分子生物学的または化学的なコンジュゲーションおよび連結方法を使用して、VHHドメインに結合され得る。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカー、切断可能なリンカー、切断不可能なリンカー、またはコンジュゲーション反応を補助するリンカーなどのリンカーを使用して、エフェクター部分をバリエーションポリペプチドまたは免疫調節タンパク質に連結またはコンジュゲートすることができる。

#### 【0162】

いくつかの実施形態では、PD-1 VHHドメインは、リンカー(L)を介して、1つ以上の部分、例えば、VHH当たり約1~約20個の薬剤部分とコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、PD-1結合コンジュゲートは、以下の構成成分：(VHHドメイン)、(L)<sub>q</sub>、および(部分)<sub>m</sub>を含み、ここで、VHHドメインは、記載されるPD-1に特異的に結合することが可能な記載されるVHHドメインのいずれかであり、Lは、タンパク質またはポリペプチドをその部分に連結するためのリンカーであり、mは少なくとも1であり、qは0以上であり、得られるPD-1結合コンジュゲートは、PD-1に結合する。特定の実施形態では、mは1~4であり、qは0~8である。

10

#### 【0163】

リンカーは、1つ以上のリンカー構成成分から構成されてもよい。抗体および薬剤部分の共有結合については、リンカーは典型的には、2つの反応性官能基、すなわち、反応性の意味で二価性を有する。ペプチド、核酸、薬剤、毒素、抗体、ハプテン、およびレポーター基などの2つ以上の機能的または生物学的に活性な部分を結合するのに有用である二価リンカー試薬は既知であり、方法が、それらの結果として生じるコンジュゲートについて記載されている(Hermanson, G. T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p 234-242)。

20

#### 【0164】

例示的なリンカー構成成分としては、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-Iカルボキシレート(「SMCC」)、およびN-スクシンイミジル(4-ヨード-アセチル)アミノベンゾエート(「SIAB」)が挙げられる。

30

#### 【0165】

いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸残基を含んでもよい。例示的なアミノ酸リンカー構成成分としては、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、またはペンタペプチドが挙げられる。例示的なジペプチドとしては、バリン-シトルリン(vcまたはval-cit)、アラニン-フェニルアラニン(afまたはala-phe)が挙げられる。例示的なトリペプチドとしては、グリシン-バリン-シトルリン(gly-val-cit)、およびグリシン-グリシン-グリシン(gly-gly-gly)が挙げられる。アミノ酸リンカー構成成分を含むアミノ酸残基としては、天然のもの、ならびに微量アミノ酸および非天然アミノ酸類似体、例えば、シトルリンが挙げられる。アミノ酸リンカー構成成分は、プラスミンプロテアーゼでの特定の酵素、例えば、腫瘍関連プロテアーゼであるカテプシンB、C、およびDによる酵素切断に対する選択性において設計および最適化され得る。

40

#### 【0166】

VHHドメインと細胞傷害性薬剤とのコンジュゲートは、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(アジプイミド酸ジメチルHClなど)、活性エステル(ジスクシンイミジル基質など)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド

50

化合物（ビス（*p*-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミンなど）、ビス-ジアソニウム誘導体（ビス-（*p*-ジアソニウムベンゾイル）-エチレンジアミンなど）、ジイソシアネート（トルエン2,6-ジイソシアネートなど）、およびビス-活性フッ素化合物（例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）などの様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製され得る。

#### 【0167】

抗体薬剤コンジュゲートは、当業者に既知の有機化学反応、条件、および試薬などの様々な方法によって調製され得る。一実施形態では、方法は、(1)共有結合を介した、VHH-Lを形成するための二価リンカー試薬とのVHHドメインの求核基の反応、続く薬剤部分Dとの反応、および(2)共有結合を介した、D-Lを形成するための二価リンカー試薬との薬剤部分の求核基の反応、続くVHHドメインの求核基との反応を含む。

10

#### 【0168】

VHHドメインを含む抗体上の求核基としては、(i)N末端アミン基、(ii)側鎖アミン基、例えば、リジン、(iii)側鎖チオール基、例えば、システイン、および(iv)抗体がグリコシル化される糖ヒドロキシル基またはアミノ基が挙げられるが、これらに限定されない。アミン、チオール、およびヒドロキシル基は、求核性であり、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基((i)NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、および酸ハロゲン化物などの活性エステル、(ii)ハロアセトアミドなどのアルキルおよびベンジルハロゲン化物、(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基を含む)と共有結合を形成するように反応することが可能である。追加の求核基は、アミンのチオールへの変換をもたらす2-イミノチオラン(Trautの試薬)とリジンとの反応を介して、抗体に導入され得る。反応性チオール基は、1、2、3、4個、またはそれ以上のシステイン残基を導入することによって(例えば、1つ以上の非天然システインアミノ酸残基を含む変異抗体を調製することによって)、抗体(またはその断片)に導入されてもよい。

20

#### 【0169】

抗体薬剤コンジュゲートなどのコンジュゲートはまた、VHHドメインなどの抗体の修飾によって産生されて、求電子部分を導入してもよく、これは、リンカー試薬または薬剤上で求核置換基と反応し得る。グリコシル化抗体の糖は、例えば、過ヨウ素酸酸化試薬で酸化されて、アルデヒドまたはケトン基を形成してもよく、これは、リンカー試薬または薬剤部分のアミン基と反応し得る。結果として得られるイミンシッフ塩基は、安定した連結を形成し得るか、または例えば、ホウ化水素試薬によって還元されて、安定したアミン連結を形成し得る。一実施形態では、ガラクトースオキシダーゼ(galactose oxidase)または(メタ)過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかと、グリコシル化抗体の炭水化物部分との反応は、薬剤上の適切な基と反応することができるタンパク質中のカルボニル(アルデヒドおよびケトン)基を生じさせ得る(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。別の実施形態では、N末端セリンまたはトレオニン残基を含有するタンパク質は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応し、第1のアミノ酸の代わりにアルデヒドの産生をもたらすことができる。そのようなアルデヒドは、薬剤部分またはリンカー求核試薬と反応することができる。

30

40

#### 【0170】

同様に、薬剤部分上の求核基としては、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基((i)NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、および酸ハロゲン化物などの活性エステル、(ii)ハロアセトアミドなどのアルキルおよびベンジルハロゲン化物、(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシル、およびマレイミド基を含む)と共有結合を形成するように反応することが可能な、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリアルヒドラジド基が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0171】

代替的に、VHHドメインと細胞傷害性薬剤とを含有する融合タンパク質は、例えば、

50

組み換え技術またはペプチド合成によって作製され得る。DNAの長さは、互いに隣接しているか、またはコンジュゲートの所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって分離された、コンジュゲートの2つの部分をコードするそれぞれの領域を含んでもよい。

【0172】

#### C. 多重特異性フォーマット

PD-1に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、1つ以上の追加の結合ドメインとを含有する多重特異性である、PD-1結合ポリペプチドが本明細書に提供される。典型的には、1つ以上の追加のドメインは、PD-1以外の第2の抗原またはタンパク質に結合する。いくつかの態様では、さらなる抗原またはタンパク質は、腫瘍上に発現される抗原、またはT細胞、例えばCD3などの免疫細胞上に発現される分子もしくは受容体、または追加の阻害受容体（例えば、CTLA-4、LAG3、TIM3、VISTA、TIGIT、SIRP、NKG2A、B7H3、B7H4）、または活性化受容体（例えば、OX40、GITR、41BB、CD40、CD27、CD28、もしくはICOS）であり得るか、または標的細胞（例えば、CD8またはCD4）に追加の特異性を付与するためのものであり得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加のドメインは、第2の抗原またはタンパク質に特異的な抗体または抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、追加のドメインは、VHHドメインである。

10

【0173】

いくつかの実施形態では、多重特異性PD-1結合ポリペプチドは、PD-1に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、第2の抗原またはタンパク質に結合する少なくとも1つの追加の結合ドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、この第2の抗原は、腫瘍関連抗原（TAA）または腫瘍微小環境関連抗原（TMEA）である。いくつかの実施形態では、この第2の抗原は、免疫調節抗原であり、当該抗原は、免疫細胞におけるシグナル伝達経路の強化または減衰に關与する。

20

【0174】

場合によっては、多重特異性PD-1結合ポリペプチドは、上記のいずれかなどのFcドメインをさらに含有することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される多重特異性PD-1結合ポリペプチドは、PD-1に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、第2の抗原またはタンパク質に結合する少なくとも1つの追加の結合ドメインと、Fcドメインと、を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、PD-1および追加の抗原またはタンパク質に対する結合部位の数を2倍にする二量体が形成されるように、生理学的条件下で多重特異性PD-1結合ポリペプチドの二量体化を媒介する。

30

【0175】

非限定的な例示的な多重特異性PD-1結合ポリペプチドが以下に記載される。

【0176】

#### 1. 二重特異性T細胞エンゲージャー

いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、本明細書に提供される少なくとも1つのPD-1 VHHドメイン、およびT細胞上に発現される表面分子に結合することが可能な少なくとも1つの追加の結合分子であるか、またはこれらを含む、二重特異性構築物である。いくつかの実施形態では、表面分子は、T細胞受容体複合体の構成成分などのT細胞の活性化構成成分である。特定の態様では、表面分子は、T細胞上に発現され、抗原結合分子との相互作用時にT細胞活性化を誘発することが可能である、活性化T細胞抗原である。例えば、いくつかの態様では、抗原結合分子と活性化T細胞抗原との相互作用は、T細胞受容体複合体のシグナル伝達カスケードを引き起こすことによってT細胞活性化を誘発し得る。T細胞活性化を測定するための好適なアッセイは既知であり、増殖、分化、サイトカイン分泌、細胞傷害活性、および/または1つ以上の活性化マーカーの発現を測定または評価するための任意のアッセイを含む。いくつかの実施形態では、そのようなPD-1結合ポリペプチドの、その標的である標的細胞上に発現されるPD-1、およびT細胞上に発現されるT細胞分子、例えば、活性化T細胞抗原の両方への同時ま

40

50

たはほぼ同時の結合は、標的細胞とT細胞との間の一時的な相互作用をもたらし、それによって、T細胞の活性化、例えば、細胞傷害活性、およびその後の標的細胞の溶解をもたらす得る。

【0177】

いくつかの実施形態では、活性化T細胞抗原などのT表面分子は、CD3であるか、またはCD2である。具体的には、提供される二重特異性PD-1結合ポリペプチドは、ヒトCD3またはヒトCD3などのヒトT細胞上に発現される活性化T細胞抗原に特異的に結合することが可能である。特定の態様では、活性化T細胞抗原（例えば、CD3またはCD2）に特異的である追加の結合ドメインは、抗体または抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、PD-1に特異的に結合する少なくとも1つのPD-1 VHHドメインと、T細胞の活性化構成成分（例えば、T細胞表面分子、例えば、CD3またはCD2）に特異的な抗体または抗原結合断片である追加の結合分子とを含有する、二重特異性抗体T細胞エンゲージャーであり得る。

10

【0178】

二重特異性抗体T細胞エンゲージャーは、可動性リンカーによって融合されるタンデムscFv分子を含有する二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）分子（例えば、Nagorsen and Bauerle, Exp Cell Res 317, 1255-1260 (2011)を参照）、例えば、可動性リンカーによって互いに融合され、安定した会合が可能な第1および第2のサブユニットから構成されるFcドメインをさらに含有する、タンデムscFv分子（WO2013/026837）、タンデムダイアボディを含むダイアボディおよびその誘導體（Holliger et al, Prot Eng 9, 299-305 (1996)、Kipriyanov et al, J Mol Biol 293, 41-66 (1999)）、C末端ジスルフィド架橋を有するダイアボディフォーマットを含み得る二重親和性再標的化（DART）分子、または全ハイブリッドマウス/ラットIgG分子を含むトリオマブ（Seimetz et al, Cancer Treat Rev 36, 458-467 (2010)）である。本明細書に提供されるPD-1 VHHドメインのいずれかを使用して、上記の分子のいずれかの類似のフォーマットが生成され得る。

20

【0179】

いくつかの実施形態では、活性化T細胞抗原に特異的な追加の結合ドメインは、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fv断片、scFv、ジスルフィド安定化Fv断片（dsFv）、scAb、dAb、単ドメイン重鎖抗体（VHH）、または単ドメイン軽鎖抗体から選択される抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、追加の結合ドメインは、CD2またはCD3などの活性化T細胞抗原に結合することに対して一価である。

30

【0180】

いくつかの実施形態では、追加の結合ドメインは、CD3またはCD3複合体に結合することが可能である。CD3複合体は、互いおよびT細胞受容体に非共有結合的に会合している、成熟Tリンパ球中の少なくとも5つの膜結合ポリペプチドの複合体である。CD3複合体には、ガンマ鎖、デルタ鎖、イプシロン鎖、ゼータ鎖、およびエータ鎖（サブユニットとも称される）が含まれる。いくつかの実施形態では、追加の結合分子は、CD3結合ドメインとも呼ばれる、CD3またはCD3複合体に特異的に結合することが可能な抗体または抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、CD3またはCD3複合体に結合することが可能なCD3結合ドメインは、抗CD3 Fab断片、抗CD3 F(ab')<sub>2</sub>断片、抗CD3 Fv断片、抗CD3 scFv、抗CD3 dsFv、抗CD3 scAb、抗CD3 dAb、抗CD3単ドメイン重鎖抗体（VHH）、および抗CD3単ドメイン軽鎖抗体の1つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗CD3結合ドメインは、CD3に結合することに対して一価である。

40

【0181】

場合によっては、CD3結合ドメインは、CD3鎖を認識する。いくつかの実施形態では、抗CD3結合ドメインは、抗CD3 Fab断片、抗CD3 F(ab')<sub>2</sub>

50

断片、抗CD3 Fv断片、抗CD3 scFv、抗CD3 dsFv、抗CD3 scAb、抗CD3 dAb、抗CD3 単ドメイン重鎖抗体(VHH)、および抗CD3 単ドメイン軽鎖抗体の1つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗CD3 結合ドメインは、CD3 に結合することに対して一価である。

#### 【0182】

CD3またはCD3複合体に対する例示的なモノクローナル抗体としては、OKT3、SP34、UCHT1、もしくは64.1、またはその抗原結合断片が挙げられるが、これらに限定されない(例えば、June, et al., J. Immunol. 136: 3945-3952 (1986)、Yang, et al., J. Immunol. 137: 1097-1100 (1986)、およびHayward, et al., Immunol. 64: 87-92 (1988)を参照)。いくつかの態様では、例えば、固定化または細胞局在化または連結された抗CD3抗体による、T細胞上のCD3のクラスターリングは、T細胞受容体の関与と類似したT細胞活性化をもたらすが、そのクローンの典型的な特異性とは独立している。一実施形態では、CD3結合ドメインは、CD3抗原に一価的かつ特異的に結合し、OKT3(ORTHOCLONE-OKT3(商標)(ムロモナブ-CD3)、ヒト化OKT3(米国特許第7,635,475号および公開国際出願第WO2005/040220号)、SP34(Pessano et al. The EMBO Journal. 4: 337-344, 1985)、SP34のヒト化バリエーション(WO2015/001085)、Tepilizumab(商標)(MGA031, Eli Lilly)、US2011/0275787に記載される抗CD3結合分子、UCHT1(Pollard et al. 1987 J Histochem Cytochem. 35(11): 1329-38、WO2000/041474)、NI0401(WO2007/033230)、ビジリズマブ(米国特許第5,834,597号)、BC-3(Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)、H2C(PCT公開第WO2008/119567号に記載)、V9(Rodrigues et al., Int J Cancer Suppl 7, 45-50 (1992)および米国特許第6,054,297号に記載)に由来する。他の抗CD3抗体も、本明細書に提供される構築物で使用され得、国際公開PCT出願第WO1994/04679号、同第WO2008/119567号、同第WO2015/095392号、同第WO2016/204966号、同第WO2019/133761号、公開特許出願第US2017/0369563号、同第US2018/0194842号、同第US2018/0355038号、米国特許第7,728,114号、同第7,381,803号、同第7,994,289号に記載されるいずれかを含む。

#### 【0183】

いくつかの実施形態では、CD3結合ドメインは、配列番号19に記載される可変重(VH)鎖、および/もしくは配列番号20に記載される可変軽鎖、またはこれらの配列と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を有するVH配列および/もしくはVL配列を含有し、CD3に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、CD3結合ドメインは、配列番号19に記載される可変重(VH)鎖のCDRH1、CDRH2、およびCDRH3と、配列番号20に記載されるCDRL1、CDRL2、およびCDRL3可変軽鎖とを含有する。場合によっては、CD3結合領域は、配列番号209に記載されるVH配列のヒト化バージョンと、配列番号210に記載されるVL配列のヒト化バージョンと、を含む。いくつかの実施形態では、CD3結合領域は、配列番号21、22、23のいずれか1つに記載されるヒト化OKT3由来VHドメイン配列、および/もしくは配列番号24、25、26のいずれか1つに記載されるVLドメイン配列、またはこれらの配列と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を有するVHおよび/もしくはVL配列を含有してもよく、CD3に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、CD3結合ドメインは、上記のVH配列とVL配列との任意の組み合わせ、特に配列番号21、22、23のいずれかに記載されるVH配列と配列番号24、25、26のいずれかに記載されるV

10

20

30

40

50

L配列との任意の組み合わせが含有される、Fab、scFv、Fv、またはdsFvである。

【0184】

いくつかの実施形態では、抗CD3結合ドメインは、少なくともアミノ酸配列TYAMN(配列番号29)を含むVH CDR1配列、少なくともアミノ酸配列RIRSKYNNYATYYADSVKD(配列番号30)を含むVH CD2配列、少なくともアミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY(配列番号31)を含むVH CDR3配列、少なくともアミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN(配列番号32)を含むVL CDR1配列、少なくともアミノ酸配列GTNKRAP(配列番号33)を含むVL CDR2配列、および少なくともアミノ酸配列ALWYSNLWV(配列番号34)を含むVL CDR3配列を含む。いくつかの実施形態では、抗CD3結合ドメインは、少なくともアミノ酸配列TYAMN(配列番号29)を含むVH CDR1配列、少なくともアミノ酸配列RIRSKYNNYATYYADSVKD(配列番号30)を含むVH CD2配列、少なくともアミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY(配列番号31)を含むVH CDR3配列、少なくともアミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN(配列番号32)を含むVL CDR1配列、少なくともアミノ酸配列GTNKRAP(配列番号33)を含むVL CDR2配列、および少なくともアミノ酸配列ALWYSNLWV(配列番号34)を含むVL CDR3配列が含有される、Fab、scFv、Fv、またはdsFvである。

10

【0185】

いくつかの実施形態では、CD3結合ドメインは、配列番号27に記載される可変重(VH)鎖、および/もしくは配列番号28に記載される可変軽鎖、またはこれらの配列と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を有するVH配列および/もしくはVL配列を含有し、CD3に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、CD3結合ドメインは、配列番号27に記載される可変重(VH)鎖のCDRH1、CDRH2、およびCDRH3と、配列番号28に記載されるCDRL1、CDRL2、およびCDRL3可変軽鎖とを含有する。いくつかの実施形態では、CD3結合ドメインは、それぞれ配列番号29、30、および31に記載されるCDRH1、CDRH2、およびCDRH3と、それぞれ配列番号32、33、および34に記載されるCDRL1、CDRL2、およびCDRL3可変軽鎖とを含有する。場合によっては、CD3結合領域は、配列番号27に記載されるVH配列のヒト化バージョンと、配列番号28に記載されるVL配列のヒト化バージョンと、を含む。いくつかの実施形態では、CD3結合領域は、配列番号35~65のいずれか1つに記載されるヒト化VHドメイン配列、および/もしくは配列番号66~84のいずれか1つに記載されるVLドメイン配列、またはこれらの配列と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を有するVHおよび/もしくはVL配列を含有してもよく、CD3に特異的に結合する。いくつかの実施形態では、その抗CD3結合ドメインは、配列番号47のアミノ酸配列を含む可変重鎖(Hv)と、配列番号75のアミノ酸配列を含む可変軽鎖(Lv)と、を含む。

20

30

【0186】

いくつかの実施形態では、CD3結合ドメインは、上記のVH配列とVL配列との任意の組み合わせ、特に配列番号35~65のいずれかに記載されるVH配列と配列番号66~84のいずれかに記載されるVL配列との任意の組み合わせが含有される、Fab、scFv、Fv、またはdsFvである。いくつかの実施形態では、抗CD3結合ドメインは、配列番号47のアミノ酸配列を含む可変重鎖(VH)、および配列番号75のアミノ酸配列を含む可変軽鎖(VL)が含有される、Fab、scFv、Fv、またはdsFvである。

40

【0187】

いくつかの実施形態では、CD3結合ドメインは、配列番号313、314、317、または318のいずれか1つに記載される可変重(VH)鎖を含有する。いくつかの実施

50

形態では、CD3結合ドメインは、配列番号315、316、319、または320のいずれか1つに記載される可変軽(VL)鎖を含有する。

【0188】

提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つのPD-1 VHHドメインと、CD3結合ドメインなどの活性化T細胞抗原に特異的な少なくとも1つの追加のドメインとを含有する、多数のフォーマットのいずれかでフォーマットされ得る。

【0189】

一実施形態では、二重特異性構築物は、例えば、抗CD3 Fabなどの、T細胞活性化抗原、例えばCD3に特異的なFab抗原結合断片に直接または間接的に連結された、記載される少なくとも1つのPD-1 VHHドメインを含有する、二重特異性単ドメイン抗体連結Fab(S-Fab)である。T細胞活性化抗原に対するFab、例えば、抗CD3 Fabは、記載されるVH配列およびVL配列のいずれかを含有し得る。いくつかの実施形態では、PD-1 VHHドメインは、抗CD3 FabのVH鎖またはVL鎖のC末端に連結される。いくつかの実施形態では、S-Fabは、ポリエチレングリコール(PEG)、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド(HPMA)コポリマー、タンパク質(アルブミンなど)、ポリグルタミン酸、またはPASylationとのコンジュゲーションなどによってさらに修飾され得る(Pan et al. (2018) International Journal of Nanomedicine, 2018: 3189-3201)。

【0190】

別の実施形態では、二重特異性構築物は、その構築物が、T細胞活性化抗原、例えば、CD3に特異的な抗原結合ドメインのVHおよびVLを含有するscFvに直接または間接的に連結された、記載される少なくとも1つのPD-1 VHHを含有する、scFv-単ドメイン抗体である。T細胞活性化抗原に対するscFv、例えば、抗CD3 scFvは、記載されるVH配列およびVL配列のいずれかを含有し得る。いくつかの実施形態では、VHHドメインおよびscFvは、ペプチドリンカーなどのリンカーによって接続される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、本明細書に記載されるペプチドリンカーであり得る。いくつかの実施形態では、VHHドメインおよびscFvは、それぞれ、任意選択的にヒンジ領域またはリンカー(例えば、ペプチドリンカー)を介して、Fc領域のN末端などのFc領域に接続される。Fc領域は、ヒトFc領域またはそのバリエーション、例えば、ヒトIgG1 Fc領域またはそのバリエーションなど、本明細書に記載されるいずれかであり得る。特定の実施例では、Fc領域は、異なるポリペプチドが二量体化されてヘテロ二量体をもたらすことができるヘテロ二量体化を促進するように変異または修飾される、バリエーションFcドメイン、例えば、バリエーションヒトIgG1ドメインによって形成される。

【0191】

さらなる実施形態では、CD3結合ドメインは、CD3に特異的に結合するVHHドメインなどの単ドメイン抗体である。CD3に結合するVHHドメインを含む単ドメイン抗体は既知であり、例えば、公開された米国特許出願第US2016/0280795号を参照されたい。いくつかの実施形態では、CD3結合ドメインは、配列番号85に記載される抗CD3 VHHであるか、または配列番号85と少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を示す配列であり、CD3に特異的に結合する。そのような態様では、本明細書に提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つのPD-1 VHHドメインと少なくとも1つのCD3 VHHドメインとを含み得る。構築物をフォーマットするために、場合によっては、各VHHドメインは、任意選択的にヒンジ領域またはリンカー(例えば、ペプチドリンカー)を介して、Fc領域のN末端などのFc領域に接続される。Fc領域は、ヒトFc領域またはそのバリエーション、例えば、ヒトIgG1 Fc領域またはそのバリエーションなど、本明細書に記載されるいずれかであり得る。特定の実施例では、Fc領域は、異なるポリペプチドが二量体化されてヘテロ二量体をもたらすことができるヘテロ二量体化を促進するように変異または修飾

10

20

30

40

50

される、バリエーションFcドメイン、例えば、バリエーションヒトIgG1ドメインによって形成される。

#### 【0192】

上記の実施形態では、ヘテロ二量体化を促進するためのFc領域の例示的な修飾は既知であり、例えば、以下の表3に記載されるいずれかを含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、配列番号103、107、115、または117のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの他方のFcポリペプチドは、配列番号104、108、111、113、119、または121のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、配列番号105、109、116、または118のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの他方のFcポリペプチドは、配列番号106、110、112、114、120、または122のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含む。

10

#### 【0193】

### 2. 拘束されたCD3多重特異性構築物

いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、拘束されたT細胞係合融合タンパク質である多重特異性ポリペプチド構築物である。特定の態様では、本明細書に提供される拘束された多重特異性構築物は、CD3およびPD-1などの活性化T細胞抗原に結合する。典型的には、提供される拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、腫瘍関連抗原(TAA)に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインも含有する。本明細書に提供される拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、免疫グロブリンFc領域を含む少なくとも第1の構成成分と、CD3に結合する少なくとも結合ドメイン(本明細書において互換的に使用される用語である、抗CD3結合ドメインまたはCD3結合ドメインと本明細書において称される)の1つ以上のコピーを含む第2の構成成分と、第1の構成成分および第2の構成成分を結合するポリペプチドリンカーなどのリンカーと、を含む。提供される多重特異性ポリペプチド構築物において、第1および第2の構成成分のうち的一方または両方は、PD-1に結合する少なくとも1つの提供されるVHHドメインを含有し、第1および第2の構成成分のうち的一方または両方は、少なくとも1つのTAA抗原結合ドメインを含有し、これは抗原に結合すると、拘束されたCD3結合領域を実質的にCD3に結合することが可能な状態にする。

20

30

#### 【0194】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3に結合し、その後T細胞を活性化する能力に関して、2つの状態で存在する：(1)PD-1に対する抗原結合ドメイン(複数可)のいずれかまたはすべての結合がない場合に、「不活性」状態が生じ、これにより、CD3結合が拘束され、T細胞相互作用が排除または低減される、および(2)抗原結合ドメイン(複数可)のいずれかまたはすべてによる抗原結合時に「活性」状態が生じ、これにより、CD3結合領域がCD3に結合することが可能となり、T細胞相互作用が可能になる。

#### 【0195】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、リンカー(複数可)を介してCD3結合ドメインに連結される。いくつかの実施形態では、Fc領域は、切断不可能なリンカー(複数可)を介してCD3結合領域に連結される。いくつかの実施形態では、Fc領域は、切断可能なリンカー、またはそうでなければ不安定性リンカー(複数可)を介してCD3結合領域に連結される。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、プロテアーゼの存在下で特異的に切断され得るリンカーである。いくつかの態様では、切断可能なリンカーの切断後にCD3結合が強化される。いくつかのそのような態様では、CD3結合領域およびFc領域を結合するリンカーの切断を含む、いくつかの機構を介して、「活性」状態は、さらに増幅され得る。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、プロテアーゼの基質認識部位を含有するリンカーである。Fc領域およびCD3結合領域が切断可能なリンカーによって連結されるいくつかの実施形態では、CD3結合の強化は、リンカー(

40

50

複数可)内の切断後に生じ得る。

【0196】

さらに、Fc領域およびCD3結合領域が切断可能なリンカーによって作動可能に連結される態様では、Fc領域とCD3結合領域との間のリンカー(複数可)の切断は、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物を第1の構成成分および第2の構成成分に分離し得る。拘束された多重特異性ポリペプチド構築物の組成に応じて、第1および第2の構成成分は、別個の機能性を有してもよい。いくつかの実施形態では、Fc領域は、ADCC、CDC、またはADCP機能などの1つ以上のエフェクター機能を示す領域である。そのような実施例では、本開示の拘束された多重特異性ポリペプチド構築物を使用して、自己増幅系を産生することができる。例えば、いくつかの態様では、FcとCD3結合ドメインの構成成分との間のプロテアーゼ切断可能なリンカーの組み込みは、CD3結合ドメインの完全な曝露を可能にすることによって、T細胞活性化能力の増幅を可能にする。含まれる特定のリンカーに応じて、増幅ステップは、腫瘍関連プロテアーゼによって、または抗原依存性T細胞活性化後に放出されるグランザイムによって媒介され得る。腫瘍プロテアーゼ切断可能なリンカーが含まれる場合、増幅は、腫瘍または腫瘍微小環境によって媒介される。一方で、グランザイムB切断可能なリンカーが含まれる場合、増幅は、抗原依存性活性化後にT細胞によって自己媒介され得る。さらに、エフェクターで可能となるFcが構築物に含まれる場合、増幅は、ADCC機構を介して生じるNK細胞から放出されたグランザイムによって媒介され得る。

10

【0197】

提供される拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域を含有する第1の構成成分がCD3結合領域を含有する第2の構成成分のN末端である配置を含む。そのような実施形態では、第1および第2の構成成分は、Fc領域のC末端であるリンカーを介して結合される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのPD-1VHHドメインは、多重特異性ポリペプチド構築物のアミノ末端(N末端)領域上に位置付けられる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのPD-1VHHドメインは、多重特異性ポリペプチド構築物のカルボキシ末端(C末端)領域上に位置付けられる。いくつかの実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端領域またはC末端領域のいずれかに位置付けられる1つのPD-1VHHドメインのみを含有する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのTAA抗原結合ドメインは、多重特異性ポリペプチド構築物のアミノ末端(N末端)領域上に位置付けられる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのTAA抗原結合ドメインは、多重特異性ポリペプチド構築物のカルボキシ末端(C末端)領域上に位置付けられる。いくつかの実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、多重特異性ポリペプチド構築物のN末端領域およびC末端領域の両方に位置付けられる、少なくとも2つのTAA抗原結合ドメインを含有する。

20

30

【0198】

いくつかの実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、二量体化が2つのポリペプチド鎖間の共有結合性または非共有結合性相互作用によって形成される、二量体である。いくつかの実施形態では、2つのポリペプチド鎖は、例えば、鎖間ジスルフィド結合によって互いに共有結合される。いくつかの実施形態では、Fc領域は、鎖間ジスルフィド結合を介して二量体化を媒介する。特定の実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、場合によっては、多重特異性ポリペプチド構築物のポリペプチド鎖が異なる(ヘテロ二量体)、ヘテロ二量体Fc領域を含有する。ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の特定の実施例では、CD3結合領域は、VHおよびVLを含有するFv抗体断片など、VHおよびVL鎖を含有する2つの鎖ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、Fv抗体断片は、ジスルフィド安定化抗CD3結合Fv断片(dsFv)を含む。

40

【0199】

いくつかの実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、ヘテロ二量体

50

Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー（例えば、切断可能または切断不可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）のVHドメインを含む第1のポリペプチドと、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー（例えば、切断可能または切断不可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）のVLドメインを含む第2のポリペプチドとを含む、2つのポリペプチドから形成されるか、またはそれらを含む。いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドは、PD-1に結合する1つまたは2つのVHHドメインを含有する。いくつかの実施形態では、第2のポリペプチドは、PD-1に結合する1つまたは2つのVHHドメインを含有する。いくつかの実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、1つのPD-1 VHHドメインのみを含有する。いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドは、1つまたは2つのTAA抗原結合ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、第2のポリペプチドは、1つまたは2つのTAA抗原結合ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも2つのTAA抗原結合ドメインを含有する。場合によっては、少なくとも1つのTAA抗原結合ドメインは、FcポリペプチドのN末端に位置し、少なくとも1つのTAA抗原結合ドメインは、CD3結合領域の鎖のC末端に位置する。特定の実施形態では、PD-1に結合する少なくとも1つのVHHドメインは、最後の少なくとも1つ、例えば、2つのTAA抗原結合ドメインを含有するポリペプチドとは別個のヘテロ二量体分子のポリペプチド上にある。

10

#### 【0200】

いくつかの実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも2つのTAA抗原結合ドメインと、PD-1に結合する少なくとも1つのVHHドメインとを含有する。いくつかの実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、（1）N末端からC末端への順序で、第1のTAA抗原結合ドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー（例えば、切断可能または切断不可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、FvまたはdsFv）の鎖（例えば、VHまたはVL）、および第2のTAA抗原結合ドメインを含む第1のポリペプチドと、（2）N末端からC末端への順序で、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、同じリンカー（例えば、同じ切断可能または切断不可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片の他方の鎖（VHまたはVLの他方）、およびPD-1に結合するVHHドメインを含む第2のポリペプチドとを含有する。いくつかの実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、（1）N末端からC末端への順序で、第1のTAA抗原結合ドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー（例えば、切断可能または切断不可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、FvまたはdsFv）の鎖（例えば、VHまたはVL）、および第2のTAA抗原結合ドメインを含む第1のポリペプチドと、（2）N末端からC末端への順序で、PD-1に結合するVHHドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、同じリンカー（例えば、同じ切断可能または切断不可能なリンカー）、および抗CD3抗体または抗原結合断片の他方の鎖（VHまたはVLの他方）を含む第2のポリペプチドとを含有する。

20

30

#### 【0201】

いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドもしくは第2のポリペプチド、または第1および第2のポリペプチドの両方は、共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1および/または第2のポリペプチドのCRBRは、FcポリペプチドのN末端、および/またはCD3結合領域の鎖のC末端に位置し得る。

40

#### 【0202】

いくつかの実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、TAAに結合する少なくとも2つの抗原結合ドメインと、共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）と、PD-1に結合するVHHドメインとを含有する。いくつかの実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、（1）N末端からC末端への順序で、第1のTAA抗原結合ドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、

50

リンカー（例えば、切断可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、FvまたはdsFv）の鎖（例えば、VHまたはVL）、および第2のTAA抗原結合ドメインを含む第1のポリペプチドと、（2）N末端からC末端への順序で、PD-1またはCRBRに結合するVHHドメインの一方、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、同じリンカー（例えば、同じ切断可能なリンカー）、抗CD3抗体または抗原結合断片の他方の鎖（VHまたはVLの他方）、およびPD-1またはCRBRに結合するVHHドメインの他方を含む第2のポリペプチドとを含有する。

【0203】

本開示の多重特異性ポリペプチド構築物の構成成分の各々は、以下により詳細に記載される。

10

【0204】

a. 抗原結合ドメイン

本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインなどの、少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。いくつかの態様では、抗原結合ドメイン、または抗原結合ドメインの各々は独立して、抗体もしくは抗原結合断片、天然(natural)（または天然(native)）同族結合パートナー、アンチカリン（操作されたリポカリン）、Darpin、Fynomer、Centyrin（操作されたフィブロネチシンIIIドメイン）、シスチン-ノットドメイン、Affilin、Affibody、または操作されたCH3ドメインから選択される。いくつかの実施形態では、天然同族結合パートナーは、TAAの天然同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、またはTAAへの結合活性を示すそのバリエーションを含む。

20

【0205】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメイン、または第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は独立して、抗体またはその抗原結合断片の1つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメイン、または第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は独立して、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、単一ドメイン重鎖抗体、および単一ドメイン軽鎖抗体からなる群から選択される、抗体またはその抗原結合断片の1つ以上のコピーを含む。

30

【0206】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメイン、または第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は独立して、単鎖抗体である。いくつかの実施例では、単鎖は、scFv、scAb、単一ドメイン重鎖抗体、または単一ドメイン軽鎖抗体である。

【0207】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメイン、または第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は独立して、1つ以上の単一ドメイン抗体(sdAb)断片、例えば、VHH、VNAR、操作されたVHまたはVKドメインを含む。VHHは、天然ラクダ科重鎖のみの抗体、重鎖のみの抗体を産生する遺伝子操作されたげっ歯類、またはナイーブ/合成のラクダ科もしくはヒト化ラクダ科の単一ドメイン抗体ライブラリーから生成され得る。VNARは、軟骨魚重鎖のみの抗体から生成され得る。界面工学および特定の生殖系列ファミリーの選択を含む様々な方法が、従来的にヘテロ二量体のVHおよびVKドメインから単量体sdAbを生成するために実装されてきた。

40

【0208】

いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメイン、または第1の抗原結合ドメインおよび/もしくは第2の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は独立して、TAAに結合する少なくとも1つのsdAbまたはscFvを含有する。いくつかの実施形態では、TAAに結合する少なくとも1つのscFvまたはsd

50

A b は、多重特異性ポリペプチド構築物の F c 領域に対してアミノ末端に、かつ/または C D 3 結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、T A A に結合する 1 つの s c F v または s d A b のみを含有し、これは、F c 領域に対してアミノ末端、および/または C D 3 結合領域に対してカルボキシ末端のいずれかに位置付けられ得る。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、F c 領域に対してアミノ末端に、かつ/または C D 3 結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる、T A A に結合する 2 つの s c F v または s d A b を含有する。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、3 つの s c F v または s d A b を含有し、そのうち 2 つは、F c 領域に対してアミノ末端に、または C D 3 結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられ、第 3 のものは、多重特異性ポリペ

10

**【0209】**

いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、ヘテロ二量体 F c 領域の第 1 の F c ポリペプチド、リンカー、抗 C D 3 抗体または抗原結合断片（例えば、F v ）の V H ドメイン、および腫瘍関連抗原に結合する s c F v または s d A b を含む第 1 のポリペプチドと、ヘテロ二量体 F c 領域の第 2 の F c ポリペプチド、リンカー、抗 C D 3 抗体または抗原結合断片（例えば、F v ）の V L ドメイン、および任意選択的に腫瘍関連抗原に結合する同じまたは異なる s c F v または s d A b を含む第 2 のポリペプチドと、を含む、2 つのポリペプチドから形成されるか、またはそれらを含む。T A A に結合する s c F v または s d A b は、ヘテロ二量体 F c の F c ポリペプチドに対してアミノ末端に、かつ/または C D 3 結合領域の V H 鎖もしくは V L 鎖に対してカルボキシ末端に位置付けられ得る。多重特異性ポリペプチド構築物の第 1 および/または第 2 のポリペプチドの少なくとも 1 つは、本開示に記載されるいずれかなどの、P D - 1 に結合する V H H ドメインも含む。いくつかの態様では、多重特異性ポリペプチド構築物の第 1 および/または第 2 のポリペプチドの少なくとも 1 つは、記載されるように共刺激性受容体またはその鎖に結合する C R B R も含み得る。

20

**【0210】**

いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメイン、または第 1 の抗原結合ドメインおよび/もしくは第 2 の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は独立して、単一ドメイン抗体（s d A b ）として結合ドメインを含有する。

30

**【0211】**

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメイン、または第 1 の抗原結合ドメインおよび第 2 の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は独立して、2 つ以上の鎖を含有する。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメイン、または第 1 の抗原結合ドメインおよび/もしくは第 2 の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は独立して、F A B として集合した V H および V L 配列を含有する。

**【0212】**

いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物の抗原結合ドメイン、または第 1 の抗原結合ドメインおよび/もしくは第 2 の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は独立して、T A A に結合する F a b 抗体の V H - C H 1 ( F d ) および V L - C L を含有する。いくつかの実施形態では、V H - C H 1 ( F d ) および V L - C L を含有する F a b 抗体は、多重特異性ポリペプチド構築物の F c 領域に対してアミノ末端に、かつ/または C D 3 結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、F c 領域に対してアミノ末端、および/または C D 3 結合領域に対してカルボキシ末端のいずれかに位置付けられ得る、T A A に結合する、V H - C H 1 ( F d ) および V L - C L を含有する 1 つの F a b 抗体のみを含有する。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、一方が F c 領域に対してアミノ末端に位置付けられ、他方が C D 3 結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる、T A A に結合する、各々が V H - C H 1 ( F d ) および V L - C L を含有する 2 つの F a b 抗体断片を含有する。

40

50

## 【0213】

いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、および腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片のVH-CH1(Fd)またはVL-CLを含む第1のポリペプチドと、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、および任意選択的に、腫瘍関連抗原に結合するFab抗体断片の同じVH-CH1(Fd)またはVL-CLを含む第2のポリペプチドと、TAAに結合するFab抗体断片のVH-CH1(Fd)またはVL-CLの他方を含む第3のポリペプチドと、を含む、3つ以上のポリペプチドから形成されるか、またはそれらを含む。

## 【0214】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメイン、または抗原結合ドメインの各々は独立して、TAAの天然(natural)(または天然(native))同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、またはTAAへの結合活性を示すそのバリエーションであるか、またはそれを含む。

## 【0215】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメイン、または第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は独立して、同じ抗原に結合する。いくつかの実施形態では、TAAに結合する2つ以上の抗原結合ドメインが存在し、第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は、異なる抗原に結合する。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は、同じ腫瘍関連抗原(TAA)に結合する。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は、異なるTAAに結合する。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は、同じTAA上の異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインなどの抗原結合ドメインの各々は、同じTAA上の同じエピトープに結合する。

## 【0216】

いくつかの実施形態では、TAAに結合する抗原結合ドメイン、または抗原結合ドメインの各々は独立して、TAAに対する一価、二価、三価、または四価結合をもたらす。

## 【0217】

いくつかの実施形態では、TAAは、1-92-LFA-3、5T4、アルファ-4インテグリン、アルファ-Vインテグリン、アルファ4ベータ1インテグリン、アルファ4ベータ7インテグリン、AGR2、抗Lewis-Y、アペリンJ受容体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5補体、C-242、CA9、CA19-9、(Lewis a)、炭酸脱水酵素9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132、(IL-2RG)、CD133、CD137、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5(CEA)、CEACAM6(NCA-90)、CLAUDIN-3、CLAUDIN-4、cMet、コラーゲン、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、エンドセリンB受容体(ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSVのFタンパク質、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、葉酸受容体アルファ(FR)、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、G

10

20

30

40

50

M - C S F、G M - C S F R、G P I I b / I I I a 受容体、G p 1 3 0、G P I I B / I I I A、G P N M B、G R P 7 8、H E R 2 / n e u、H E R 3、H E R 4、H G F、h G H、H V E M、ヒアルロニダーゼ、I C O S、I F N アルファ、I F N ベータ、I F N ガンマ、I g E、I g E 受容体 ( F c e R I )、I G F、I G F 1 R、I L 1 B、I L 1 R、I L 2、I L 1 1、I L 1 2、I L 1 2 p 4 0、I L - 1 2 R、I L - 1 2 R ベータ 1、I L 1 3、I L 1 3 R、I L 1 5、I L 1 7、I L 1 8、I L 2 1、I L 2 3、I L 2 3 R、I L 2 7 / I L 2 7 R ( w s x 1 )、I L 2 9、I L - 3 1 R、I L 3 1 / I L 3 1 R、I L 2 R、I L 4、I L 4 R、I L 6、I L 6 R、インスリン受容体、J a g g e d リガンド、J a g g e d 1、J a g g e d 2、K I S S 1 - R、L A G - 3、L I F - R、L e w i s X、L I G H T、L R P 4、L R R C 2 6、L y 6 G 6 D、L y P D 1、M C S P、メソテリン、M R P 4、M U C 1、ムチン - 1 6 ( M U C 1 6、C A - 1 2 5 )、N a / K A T P a s e、N G F、ニカストリン、N o t c h 受容体、N o t c h 1、N o t c h 2、N o t c h 3、N o t c h 4、N O V、O S M - R、O X - 4 0、P A R 2、P D G F - A A、P D G F - B B、P D G F R アルファ、P D G F R ベータ、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2、ホスファチジル - セリン、P 1 G F、P S C A、P S M A、P S G R、R A A G 1 2、R A G E、S L C 4 4 A 4、スフィンゴシン 1 リン酸、S T E A P 1、S T E A P 2、T A G - 7 2、T A P A 1、T E M - 8、T G F ベータ、T I G I T、T I M - 3、T L R 2、T L R 4、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、T M E M 3 1、T N F アルファ、T N F R、T N F R S 1 2 A、T R A I L - R 1、T R A I L - R 2、トランスフェリン、トランスフェリン受容体、T R K - A、T R K - B、u P A R、V A P 1、V C A M - 1、V E G F、V E G F - A、V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D、V E G F R 1、V E G F R 2、V E G F R 3、V I S T A、W I S P - 1、W I S P - 2、および W I S P - 3 からなる群から選択される。

#### 【0218】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原結合ドメイン、または独立して各抗原結合ドメインは、腫瘍関連抗原 ( T A A ) 葉酸受容体アルファ ( F R ) に結合する。例えば、抗原結合ドメインは、F R に結合する s d A b として結合ドメインを含有する。例示的な F R 結合 s d A b は、配列番号 8 6、8 7、または 8 8 に記載される。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中の抗原結合ドメイン、または独立して各抗原結合ドメインは、上記の配列番号のいずれかと少なくとも 8 5 %、8 5 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を有し、F R に結合することができる。

#### 【0219】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原結合ドメイン、または独立して各抗原結合ドメインは、腫瘍関連抗原 ( T A A ) c M E T に結合する。例えば、抗原結合ドメインは、c M E T に結合する s d A b として結合ドメインを含有する。例示的な c M E T 結合 s d A b は、配列番号 8 9 に記載される ( 米国特許第 9, 3 4 6, 8 8 4 号 )。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中の抗原結合ドメイン、または独立して各抗原結合ドメインは、上記の配列番号と少なくとも 8 5 %、8 5 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の配列同一性を有し、c M E T に結合することができる。

#### 【0220】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原結合ドメイン、または独立して各抗原結合ドメインは、腫瘍関連抗原 ( T A A ) B 7 H 3 に結合する。例えば、抗原結合ドメインは、B 7 H 3 に結合する s c F v として結合ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、V H - C H 1 ( F d ) および L C を含む F a b 抗体断片であるか、またはそれを含有する。例示的な B 7 H 3 F d は、P C T 公開第 W O 2 0 1 7 / 0 3 0 9 2 6 号に記載される。

#### 【0221】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原結合ドメイン、または独立して各抗原

10

20

30

40

50

結合ドメインは、腫瘍関連抗原（TAA）CD20に結合する。例えば、抗原結合ドメインは、CD20に結合するscFvとして結合ドメインを含有する。例示的なCD20結合scFvは、配列番号90に記載されるか、または配列番号91および92に記載されるVLおよびVHを含有する（米国公開第US2005/0123546号）。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中の抗原結合ドメイン、または独立して各抗原結合ドメインは、上記の配列番号のいずれかと少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、CD20に結合することができる。

#### 【0222】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原結合ドメイン、または独立して各抗原結合ドメインは、腫瘍関連抗原（TAA）DLL3に結合する。例えば、抗原結合ドメインは、DLL3に結合するscFvとして結合ドメインを含有する。例示的なDLL3結合scFvは、配列番号93および94に記載される（米国公開第US2017/0037130号）。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、DLL3に結合するFdおよびLCを含むFab抗体断片であるか、またはそれを含有する。例示的なDLL3Fdは、配列番号95に記載され、例示的なDLL3LCは、配列番号96に記載される（米国特許第US8,044,178号）。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中の抗原結合ドメイン、または独立して各抗原結合ドメインは、上記の配列番号のいずれかと少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、DLL3に結合することができる。

#### 【0223】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原結合ドメイン、または独立して各抗原結合ドメインは、腫瘍関連抗原（TAA）5T4に結合する。例示的な5T4Fdは、配列番号97に記載され、例示的な5T4LCは、配列番号98に記載される。いくつかの実施形態では、抗体結合ドメインは、配列番号99および100に記載されるVHおよびVLを含む（米国特許第US8,044,178号）。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中の抗原結合ドメイン、または独立して各抗原結合ドメインは、上記の配列番号のいずれかと少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、5T4に結合することができる。

#### 【0224】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗原結合ドメイン、または独立して各抗原結合ドメインは、腫瘍関連抗原（TAA）gpNMBに結合する。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、Fd鎖およびLC鎖を含むFab断片であるか、またはそれを含有する。例示的なgpNMBFdは、配列番号101に記載され、例示的なgpNMBLCは、配列番号102に記載される。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中の抗原結合ドメイン、または独立して各抗原結合ドメインは、上記の配列番号のいずれかと少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、gpNMBに結合することができる。

#### 【0225】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、直接またはリンカーを介して間接的に、Fc領域および/またはCD3結合領域に連結される。いくつかの実施形態では、連結は、リンカーを介している。いくつかの実施形態では、リンカーは、記載される任意の可動性または剛性リンカーを含み得る、連結ペプチド（LP）である。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGSGGS、すなわち、(GGGS)<sub>2</sub>（配列番号1）、GGSGGS GGGS、すなわち、(GGGS)<sub>3</sub>（配列番号2）、GGSGGS GGSGGS GGGS、すなわち、(GGGS)<sub>4</sub>（配列番号3）、およびGGSGGS GGSGGS GGSGGS GGGS、すなわち、(GGGS)<sub>5</sub>（配列番号4）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、リン

10

20

30

40

50

カーは、非限定的な例として、GG、GGG、GGGG（配列番号5）、GGGGG（配列番号6）、およびGGGGGG（配列番号7）などのグリシン残基を含む可動性リンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、GSリンカーとグリシンリンカーとの組み合わせを含む。

#### 【0226】

##### b. Fc領域

拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、免疫グロブリンFc領域を含む。概して、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、各々がFcを含有するポリペプチドによって形成される二量体である。Fcポリペプチドは、上記に記載されるいずれかであり得る。特定の実施形態では、Fc領域は、異なるポリペプチドが二量体化されてヘテロ二量体をもたらすことができるヘテロ二量体化を促進するように変異または修飾されるFcドメインによって形成される。したがって、いくつかの実施形態では、二量体は、多重特異性ポリペプチド構築物の2つのポリペプチド鎖が異なるヘテロ二量体である。

10

#### 【0227】

相補的Fcポリペプチドのヘテロ二量体化を促進するための様々な方法が、既知であり、例えば、Ridgway et al, Protein Eng. 9: 617 - 621 (1996)、Merchant et al, Nat. Biotechnol. 16(7): 677 - 81 (1998)、Moore et al. (2011) MAbs, 3: 546 - 57、Von Kreudenstein et al. MAbs, (2013) 5: 646 - 54、Gunasekaran et al. (2010) J. Biol. Chem., 285: 19637 - 46、Leaver-Fay et al. (2016) Structure, 24: 641 - 51、Ha et al. (2016) Frontier s in Immunology, 7: 1、Davis et al. (2010) Protein Eng Des Sel, 23: 195 - 202、公開国際PCT出願第WO1998/050431号、同第WO2009/089004号、同第WO2011/143545号、同第WO2014/067011号、同第WO2012/058768号、同第WO2018/027025号、公開された米国特許出願 第US2014/0363426号、同第US2015/0307628号、同第US2018/0016354号、同第US2015/0239991号、ならびに米国特許第US5731168号、同第US7183076号、同第US9701759号、同第US9605084号、および同第US9650446を参照されたい。Fc鎖のヘテロ二量体化を促進する方法は、「ノブイントゥホール」変異のセットを含むこと、またはFcの静電的ステアリングをもたらして、異なるポリペプチド鎖間の吸引相互作用に有利に働く変異を含むことなどによる、Fc領域の変異導入を含む。例えば、いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体のFcポリペプチドは、Fc二量体界面にわたって電荷極性を変化させる変異を含み、これにより、静電的に適合したFc鎖の共発現が好ましい吸引相互作用を支持し、それにより望ましいFcヘテロ二量体形成を促進する一方で、好ましくない反発電荷相互作用は、望ましくないFcホモ二量体形成を抑制する(Gunasekaran et al. (2010) JBC, 285: 19637 - 19646)。細胞内で共発現された場合、鎖間の会合は可能であるが、鎖は、電荷反発のため実質的には自己会合しない。ヘテロ二量体Fcを生成するための他の戦略には、ヒトIgGおよびIgA CH3ドメインセグメントを混合して、相補的CH3ヘテロ二量体を作ることを含み、これはSEED Fcと称される。

20

30

40

#### 【0228】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体化を促進するために、Fcヘテロ二量体の両方のポリペプチドが、対になった、または相補的なアミノ酸修飾を含有する。Fc融合体のポリペプチドの例示的な対になったアミノ酸修飾を表3に記載する。

50

【表 3】

表 3:ヘテロ二量体Fcの対になったアミノ酸	
第1のFcポリペプチド	第2のFcポリペプチド
T366W	T366S/L368W/Y407V
T366W/S354C	T366S/L368A/Y407V/Y349C
S364H/F405A	Y349T/Y349F
T350V/L351Y/F405A/Y407V	T350V/T366L/K392L/T394W
K360D/D399M/Y407A	E345R/Q347R/T366V/K409V
K409D/K392D	D399K/E356K
K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
L360E/K409W/Y349C	Q347R/399V/F405T/S354C
K370E/K409W	E357N/D399V/F405T

10

## 【0229】

いくつかの実施形態では、修飾は、第1のFcポリペプチドへの突起（ノブ）の導入と、第2のFcポリペプチドへの空洞（ホール）の導入とを含み、これにより、突起は、第1および第2のFc含有ポリペプチドの複合体化を促進するように空洞内に位置付け可能である。ポリペプチド中に突起または空洞を作るための置き換えおよび/または修飾の標的となるアミノ酸は、典型的には、第2のポリペプチドの界面において1つ以上のアミノ酸と相互作用または接触する界面アミノ酸である。

20

## 【0230】

いくつかの実施形態では、突起（ホール）アミノ酸を含有するように修飾される第1のFcポリペプチドは、第1のFcポリペプチドの界面から突出し、したがって、第2のポリペプチドの隣接する界面において代償的空洞（ホール）に位置付け可能である、少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸による、天然または元のアミノ酸の置き換えを含む。ほとんどの場合、置換アミノ酸は、元のアミノ酸残基よりも大きい側鎖体積を有するアミノ酸である。当業者は、アミノ酸残基の特性を決定および/または評価して、理想的な置換アミノ酸であるアミノ酸を同定して、突起を作る方法を認識している。いくつかの実施形態では、突起の形成のための置換残基は、天然アミノ酸残基であり、例えば、アルギニン（R）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、またはトリプトファン（W）を含む。いくつかの実施例では、置き換えのために同定される元の残基は、例えば、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、トレオニン、またはバリンなどの小さい側鎖を有するアミノ酸残基である。

30

## 【0231】

いくつかの実施形態では、空洞（ホール）を含有するように修飾される第2のFcポリペプチドは、第2のポリペプチドの界面からくぼんでおり、したがって、第1のポリペプチドの界面からの対応する突起を収容することが可能である、少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸による、天然または元のアミノ酸の置き換えを含む。ほとんどの場合、置換アミノ酸は、元のアミノ酸残基よりも小さい側鎖体積を有するアミノ酸である。当業者は、アミノ酸残基の特性を決定および/または評価して、空洞の形成のための理想的な置換残基である残基を同定する方法を認識している。概して、空洞の形成のための置換残基は、天然アミノ酸であり、例えば、アラニン（A）、セリン（S）、トレオニン（T）、およびバリン（V）を含む。いくつかの実施例では、置き換えのために同定される元のアミノ酸は、例えば、チロシン、アルギニン、フェニルアラニン、またはトリプトファンなどの大きい側鎖を有するアミノ酸である。

40

## 【0232】

ヒトIgG1のCH3界面は、例えば、各表面から1090 Åを埋める4つの逆平行鎖上に位置する各ドメイン上に16個の残基を含む（例えば、Deisenhofer et al. (1981) *Biochemistry*, 20:2361-2370、Miller et al., (1990) *J Mol. Biol.*, 216, 965-97

50

3、Ridgway et al., (1996) Prot. Engin., 9:617-621、米国特許第5,731,168号を参照)。突起または空洞を作るためのCH3ドメインの修飾は、例えば、米国特許第5,731,168号、国際特許出願第WO98/50431号および同第WO 2005/063816号、ならびにRidgway et al., (1996) Prot. Engin., 9:617-621に記載されている。いくつかの実施例では、突起または空洞を作るためのCH3ドメインの修飾は、典型的には、2つの逆平行鎖上に位置する残基に標的化される。目的は、作られる突起が、パートナーCH3ドメインの代償的空洞によって収容されるのではなく、周囲の溶媒中に突出することによって収容され得るリスクを最小限に抑えることである。

【0233】

例えば、いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、Thr366でCH3ドメイン内にアミノ酸修飾を有するポリペプチドを含み、これは、よりかさ高いアミノ酸、例えば、Try(T366W)で置き換えられた場合、位置Thr366、Leu368、およびTyr407におけるあまりかさ高くないアミノ酸、例えば、それぞれSer、Ala、およびVal(T366S/L368A/Y407V)へのアミノ酸修飾を有する第2のCH3ドメインと優先的に対になることが可能である。CH3修飾を介したヘテロ二量体化は、ジスルフィド結合の導入によって、例えば、反対側のCH3ドメイン上でSer354をCys(S354C)およびTyr349をCys(Y349C)に変化させることによって、さらに安定化され得る(Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248:7-15で考察されている)。

【0234】

得られる拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、例えば、プロテインAまたはプロテインGカラム上のアフィニティークロマトグラフィーなどの任意の好適な方法によって精製され得る。異なるポリペプチドをコードする2つの核酸分子が細胞に形質転換される場合、ホモ二量体およびヘテロ二量体の形成が生じる。発現の条件は、ヘテロ二量体形成がホモ二量体形成よりも有利であるように調整され得る。

【0235】

親和性試薬に対するヘテロ二量体の差次的親和性に基づくホモ二量体からのヘテロ二量体の回収技術は、既知である。いくつかの態様では、そのような技術には、Fcポリペプチド鎖の1つが親和性試薬プロテインAに結合しないようにヘテロ二量体を設計することが含まれる。場合によっては、ポリペプチド鎖の1つは、Fcヘテロ二量体のポリペプチドの1つにおいて、プロテインA試薬に対する親和性を排除または低減するための、1つ以上のアミノ酸置換を含有することができ、例えば、WO2017/134440、WO2010/151792、Jendeborg et al. (Jendeborg et al., (1997) J. Immunol. Methods, 201(1):25-34)を参照されたい。これらの実施形態のいくつかでは、Fc領域は、プロテインA結合を防止し、それによってヘテロ二量体融合タンパク質のより効率的な精製を可能にするように、ヘテロ二量体の1つのメンバー上のプロテインA結合部位で修飾されてもよい。この結合部位内の例示的な修飾は、Ile253、例えば、Ile253Arg(I253R)である。いくつかの実施形態では、修飾は、H435RまたはH435R/Y436Fであってよい。いくつかの実施形態では、Fcヘテロ二量体のFcポリペプチドは、タンパク質GではなくプロテインAに結合することが可能であるような修飾(pA+/pG-)を含有することができる。例示的なpA+/pG-アミノ酸修飾は、ヒトIgG1に関して428位にセリン、434位にセリン、および任意選択的に436位にヒスチジンを含有するか、またはヒトIgG2、3、もしくは4の対応する位置にこれらの残基を含む、Fcを含む。いくつかの態様では、428位、434位、および任意選択的に436位での1つのIgG-Fcポリペプチドにおけるそのようなアミノ酸修飾は、プロテインGの結合を低減または防止し、タンパク質の精製を強化する。

【0236】

いくつかの実施形態では、親和性試薬に差次的親和性を付与するような修飾のいずれか

10

20

30

40

50

は、上記の任意の1つ以上の他のアミノ酸修飾と組み合わせられ得る。例えば、I 2 5 3 R 修飾は、T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V 修飾またはT 3 6 6 W 修飾のいずれかと組み合わせられてもよい。T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V 修飾Fcは、T 3 3 6 W 修飾Fcの場合に存在するような二量体化界面の立体閉塞がないため、ホモ二量体を形成することが可能である。したがって、いくつかの実施形態では、I 2 5 3 R 修飾は、T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V 修飾Fcと組み合わせられて、形成された可能性がある任意のホモ二量体Fcの精製を不可能にする。T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V およびH 4 5 3 Rを組み合わせることによって、類似の修飾が採用され得る。

#### 【0237】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体分子のFc領域はさらに、上記のいずれかなどの、1つ以上の他のFc変異を含有することができる。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体分子は、エフェクター機能を低減する変異を有するFc領域を含有する。

10

#### 【0238】

いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、配列番号103、107、115、または117のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの他方のFcポリペプチドは、配列番号104、108、111、113、119、または121のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、配列番号105、109、116、または118のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの他方のFcポリペプチドは、配列番号106、110、112、114、120、または122のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含む。

20

#### 【0239】

いくつかの実施形態では、提供される多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域は、1つ以上のエフェクター機能を示す。場合によっては、Fc領域は、例えば、ADCC（例えば、NK細胞によるグランザイムBの放出）、ADCP、および/またはCDCなどのFc媒介性エフェクター機能を提供することが可能である。概して、Fc領域は、免疫グロブリンの主な機能である抗原結合能力に加えて、補体依存性細胞傷害性(CDC)および抗体依存性細胞傷害性(ADCC)などのエフェクター機能に参与している。追加的に、Fc領域中に存在するFcRn配列は、インビボFcRn受容体へのコンジュゲーションによってインビボ半減期を延長させることによって、血清中のIgGレベルを制御する役割を果たす。多重特異性ポリペプチド構築物が切断可能なリンカーを含有するいくつかの実施形態では、リンカーの切断は、各々が生物学的活性を有する2つの構成成分を産生することができる：T細胞上でCD3に結合および関与することが可能なCD3結合領域（これはいくつかの態様では、T細胞上の共刺激シグナルを誘発するためのCRBR、および/またはT細胞上の阻害シグナルを遮断するためのPD-1に結合するVHHドメインを含有することができる）、ならびに標的特異的エフェクター機能を示すことができるTAA抗原結合ドメインに連結されたFc領域。

30

#### 【0240】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、1つ以上のエフェクター機能を改変するように変異または修飾されるFcポリペプチドを含む。したがって、場合によっては、ADCC、ADCP、および/またはCDCの1つ以上などのエフェクター機能は、提供される拘束された多重特異性ポリペプチド構築物と使用するために、Fc中で改変、例えば、低減または強化され得る。エフェクター機能を低減するための例示的な変異としては、上記のいずれかが挙げられる。

40

#### 【0241】

##### c. CD3結合ドメイン

拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3結合ドメインを含む。本開示の抗CD3結合ドメインは、T細胞上のCD3またはCD3複合体のメンバーの関与を介して、T細胞を活性化する。好ましい実施形態では、本開示の抗CD3結合ドメインは、CD3としても既知のCD3のイプシロン鎖に特異的に結合する。本開示の抗CD3結合

50

ドメインは、T細胞上のCD3の関与を介して、T細胞を活性化する。本開示の抗CD3結合ドメインは、CD3媒介性T細胞活性化をアゴナイズ、刺激し、活性化、および/または別の方法で増強する。CD3の生物学的活性としては、例えば、T細胞活性化、およびCD3とT細胞受容体(TCR)の抗原結合サブユニットとの間の相互作用を介した他のシグナル伝達が挙げられる。例えば、本開示の抗CD3結合ドメインは、CD3媒介性T細胞活性化を部分的または完全に調節、例えば、アゴナイズ、刺激、活性化、または別の方法で増強することによって、T細胞上のCD3の関与を介して、T細胞を完全または部分的に活性化する。

【0242】

CD3結合ドメインは、上記のいずれかであり得る。特定の実施形態では、CD3結合ドメインは、CD3に結合するFv抗体断片(本明細書では、抗CD3 Fv断片と称される)である。いくつかの実施形態では、抗CD3 Fv抗体断片は、ジスルフィド安定化抗CD3結合Fv断片(dsFv)である。いくつかの実施形態では、抗CD3結合ドメインは、CD3に結合することに対して一価である。

10

【0243】

いくつかの実施形態では、CD3結合領域は、記載されるいずれかなどの、可変重鎖(Hv、VHとも呼ばれる)および可変軽鎖(Lv、VLとも呼ばれる)を含有するFv抗体断片である。そのような実施形態の態様では、免疫グロブリンFc領域は、記載されるいずれかなどの、Fcヘテロ二量体の両方のポリペプチド間のヘテロ二量体会合が可能な2つの異なるFcポリペプチドを含有する、ヘテロ二量体Fc領域である。そのような実施形態では、CD3結合領域の可変重鎖(VH)および可変軽鎖(VL)は、ヘテロ二量体Fcの反対側の鎖上で連結される。

20

【0244】

いくつかの実施形態では、CD3結合領域は、SP34のFvもしくはdsFv(Pessano et al. The EMBO Journal, 4:337-344, 1985)、またはSP34のヒト化バリエーション(WO2015/001085)である。

【0245】

いくつかの実施形態では、その抗CD3結合ドメインは、重鎖可変アミノ酸配列と軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む、FvまたはdsFv断片である。いくつかの実施形態では、抗CD3結合ドメインは、少なくともアミノ酸配列TYAMN(配列番号29)を含むVH CDR1配列、少なくともアミノ酸配列RIRSKYNNYATYYADSVKD(配列番号30)を含むVH CD2配列、少なくともアミノ酸配列HGNFGNSYVSWFAY(配列番号31)を含むVH CDR3配列、少なくともアミノ酸配列RSSTGAVTTSNYAN(配列番号32)を含むVL CDR1配列、少なくともアミノ酸配列GTNKRAP(配列番号33)を含むVL CDR2配列、および少なくともアミノ酸配列ALWYSNLWV(配列番号34)を含むVL CDR3配列が含有される、FvまたはdsFv断片である。いくつかの実施形態では、その抗CD3結合ドメインは、配列番号35~65の群から選択される重鎖可変アミノ酸配列と、配列番号66~84、285からなる群から選択される軽鎖可変アミノ酸配列と、を含む、FvまたはdsFv断片である。いくつかの実施形態では、その抗CD3結合ドメインは、配列番号35~65の群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%以上同一である重鎖可変アミノ酸配列と、配列番号66~84、285のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%以上同一であるアミノ酸配列と、を含む、FvまたはdsFv断片である。いくつかの実施形態では、抗CD3結合ドメインは、配列番号47のアミノ酸配列を含む可変重鎖(VH)、および配列番号285のアミノ酸配列を含む可変軽鎖(VL)が含有される、FvまたはdsFvである。

30

40

【0246】

d. リンカー

50

拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、免疫グロブリンFc領域を含有する第1の構成成分、およびCD3結合領域を含有する第2の構成成分を結合または連結するリンカーを含有する。いくつかの実施形態では、リンカーは、Fc領域がCD3結合領域のN末端にあるように、Fc領域のC末端領域の末端に位置付けられる。提供される拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、第1および第2の構成成分と一緒に形成する第1および第2のポリペプチドを含有する二量体などの多量体であるため、提供される構築物は、第1のポリペプチドのFc部分およびCD3結合領域を結合するリンカーと、第2のポリペプチドのFc部分およびCD3結合領域を結合するリンカーとを含むことが理解される。いくつかの実施形態では、第1のポリペプチドは、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、およびCD3結合領域の第1のドメイン(例えば、VH)を含み、第2のポリペプチドは、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、およびCD3結合領域の第2のドメイン(例えば、VL)を含む。典型的には、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物の第1および第2のポリペプチド中に存在するリンカーは、同一である。したがって、いくつかの実施形態では、CD3結合ドメインの各ドメインは、例えば、同じリンカーなどのリンカーを介して、ヘテロ二量体FcなどのFcの反対側のポリペプチドに連結される。

#### 【0247】

融合タンパク質で使用するための様々なポリペプチドリッカーが既知である(例えば、Chen et al. (2013) Adv. Drug. Deliv. 65: 1357-1369、および国際PCT公開第WO2014/099997号、同第WO2000/24884号、米国特許第5,258,498号、米国特許第5,525,491号、米国特許第5,525,491号、米国特許第6,132,992号を参照)。

#### 【0248】

いくつかの実施形態では、リンカーは、CD3結合領域が多重特異性ポリペプチドコンジュゲートのFc領域に結合される場合、細胞と多重特異性ポリペプチド構築物との接触時に、CD3結合領域が拘束され、例えば、T細胞などの細胞の表面上でCD3に結合または関与することができない、または実質的にできないように選択される。T細胞結合、レポーター系を使用したNFAT活性化、細胞溶解性T細胞活性、サイトカイン産生、および/またはT細胞活性化マーカーの発現を評価するためのアッセイを含む、多重特異性ポリペプチド構築物によるCD3の結合または関与を評価するための様々なアッセイが採用され得る。例示的なアッセイを、提供される実施例に示す。典型的には、リンカーはまた、ポリペプチド構築物の正しい折り畳みを確実にし、連結ポリペプチドの活性もしくは機能と矛盾する電荷を示さないか、または連結ポリペプチドの活性を妨げるかもしくは改変するドメインの1つ以上におけるアミノ酸残基との結合もしくは他の相互作用を形成しないものである。いくつかの実施形態では、リンカーは、ポリペプチドリッカーである。ポリペプチドリッカーは、可動性リンカーもしくは剛性リンカー、または両方の組み合わせであってもよい。いくつかの態様では、リンカーは、短いリンカー、中程度のリンカー、または長いリンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、最大40アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、リンカーは、最大25アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、リンカーは最小であるか、または少なくとも約2アミノ酸長である。いくつかの態様では、好適な長さは、例えば、少なくとも1、および典型的には2~25アミノ酸残基、5~20アミノ酸残基、5~15アミノ酸残基、8~12アミノ酸などの約40アミノ酸残基未満の長さである。いくつかの実施形態では、リンカーは、約2~24個のアミノ酸、2~20個のアミノ酸、2~18個のアミノ酸、2~14個のアミノ酸、2~12個のアミノ酸、2~10個のアミノ酸、2~8個のアミノ酸、2~6個のアミノ酸、6~24個のアミノ酸、6~20個のアミノ酸、6~18個のアミノ酸、6~14個のアミノ酸、6~12個のアミノ酸、6~10個のアミノ酸、6~8個のアミノ酸、8~24個のアミノ酸、8~20個のアミノ酸、8~18個のアミノ酸、8~14個のアミノ酸、8~12個のアミノ酸、8~10個のアミノ酸、10~24個のアミノ酸、10~20個のアミノ酸、10~18個のアミノ酸、10~14個のアミノ酸、10~12個のア

10

20

30

40

50

ミノ酸、12～24個のアミノ酸、12～20個のアミノ酸、12～18個のアミノ酸、12～14個のアミノ酸、14～24個のアミノ酸、14～20個のアミノ酸、14～18個のアミノ酸、18～24個のアミノ酸、18～20個のアミノ酸、または20～24個のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、リンカーの長さは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20アミノ酸長である。

【0249】

ある特定の態様では、リンカーの長さが長いほど、多重特異性ポリペプチドコンジュゲートが、その抗原、例えば、TAAに結合する場合のCD3結合は大きい。したがって、いくつかの態様では、リンカーは、13、14、15、16、17、または18アミノ酸長を超えるなど、12アミノ酸長を超える。いくつかの実施形態では、リンカーは、12～40アミノ酸長、12～30個のアミノ酸、12～24個のアミノ酸、12～18個のアミノ酸、12～15個のアミノ酸、15～40個のアミノ酸、15～30個のアミノ酸、15～24個のアミノ酸、15～18個のアミノ酸、18～40個のアミノ酸、18～30個のアミノ酸、18～24個のアミノ酸、24～40個のアミノ酸、24～30個のアミノ酸、または30～40個のアミノ酸である。

【0250】

リンカーは、自然発生的、合成、または両方の組み合わせであり得る。特に好適なリンカーポリペプチドは、グリシン(Gly)、セリン(Ser)、アラニン(Ala)、およびトレオニン(Thr)から選択されるアミノ酸残基を主に含む。例えば、リンカーは、Gly、Ser、Ala、およびThrから選択されるアミノ酸残基の少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%など、少なくとも75%(ペプチドリンカー中に存在する残基の総数に基づいて計算される)を含有してもよい。リンカーはまた、Gly、Ser、Ala、および/またはThr残基のみからなってもよい。いくつかの実施形態では、リンカーは、1～25個のグリシン残基、5～20個のグリシン残基、5～15個のグリシン残基、または8～12個のグリシン残基を含有する。いくつかの態様では、好適なペプチドリンカーは、典型的には、少なくとも75%のグリシン残基などの少なくとも50%のグリシン残基を含有する。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、グリシン残基のみを含む。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、グリシンおよびセリン残基のみを含む。

【0251】

いくつかの実施形態では、これらのリンカーは、本明細書においてGSリンカーとして示される、アミノ酸グリシンおよびセリンから主に構成される。いくつかの実施形態では、リンカーは、(GGS)<sub>n</sub>(式中、nは1～5、例えば1～3など、1～10である)、例えば、GGS(GGS)<sub>n</sub>(配列番号123)(式中、nは0～10である)を含有する。特定の態様では、リンカーは、配列(GGGGS)<sub>n</sub>(配列番号123)を含有し、式中、nは1～10であるか、またはnは1～3など、1～5である。さらなる実施形態では、リンカーは、(GGGGGS)<sub>n</sub>(配列番号124)を含有し、式中、nは1～3など、1～4である。リンカーは、上記のいずれかの組み合わせを含むことができ、例えば、2、3、4、または5つのGS、GGS、GGGS、および/またはGGGGGSリンカーの反復が組み合わされ得る。いくつかの実施形態では、そのようなリンカーは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または19アミノ酸長である。

【0252】

いくつかの実施形態では、リンカーは、(1文字アミノ酸コードで):GGS、GGGGGS(配列番号125)、またはGGGGGS(配列番号126)である。いくつかの実施形態では、GS-リンカーは、GSGGS、すなわち、(GS)<sub>2</sub>(配列番号1)、GSGSGSGGS、すなわち、(GS)<sub>3</sub>(配列番号2)、GSGSGSGSGGS、すなわち、(GS)<sub>4</sub>(配列番号3)、GSGSGSGSGSGSGGS、すなわち、(GS)<sub>5</sub>(配列番号4)、GGGGSGSGGGGGSGSGGGGS、すなわち

10

20

30

40

50

、(G 5 S)<sub>3</sub>(配列番号127)、G G S G G G S G G G S G G G S(配列番号129)、およびG G G S G G G S G G G S(配列番号128)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、G G G G(配列番号5)である。上記の実施例のいずれかのいくつかにおいて、セリンは、アラニンで置き換えられ得る(例えば、(G l y 4 A l a)または(G l y 3 A l a))

#### 【0253】

いくつかの実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列G l y<sub>x</sub>X a a - G l y<sub>y</sub> - X a a - G l y<sub>z</sub>(配列番号130)を有するペプチドリンカーを含み、式中、各X a aは独立して、アラニン(A l a)、バリン(V a l)、ロイシン(L e u)、イソロイシン(I l e)、メチオニン(M e t)、フェニルアラニン(P h e)、トリプトファン(T r p)、プロリン(P r o)、グリシン(G l y)、セリン(S e r)、トレオニン(T h r)、システイン(C y s)、チロシン(T y r)、アスパラギン(A s n)、グルタミン(G l n)、リジン(L y s)、アルギニン(A r g)、ヒスチジン(H i s)、アスパルテート(A s p)、およびグルタミン酸(G l u)から選択され、式中、x、y、およびzは各々、1~5の範囲内の整数である。いくつかの実施形態では、各X a aは独立して、S e r、A l a、およびT h rからなる群から選択される。特定の変化形では、x、y、およびzの各々は、3に等しく(それによって、アミノ酸配列G l y - G l y - G l y - X a a - G l y - G l y - G l y - X a a - G l y - G l y - G l y(配列番号131)を有するペプチドリンカーをもたらず)、式中、各X a aは、上記のとおりを選択される。

#### 【0254】

いくつかの実施形態では、リンカーは、(S S S S G)<sub>y</sub>(配列番号132)モチーフの反復に基づくセリンリッチリンカーであり、式中、yは少なくとも1であるが、yは2、3、4、5、6、7、8、および9であってもよい。

#### 【0255】

場合によっては、ペプチドリンカーにある程度の剛性を提供することが望ましい場合がある。これは、ペプチドリンカーのアミノ酸配列中にプロリン残基を含むことによって達成され得る。したがって、いくつかの実施形態では、リンカーは、ペプチドリンカーのアミノ酸配列中に少なくとも1つのプロリン残基を含む。例えば、ペプチドリンカーは、アミノ酸残基の少なくとも25%(例えば、少なくとも50%または少なくとも75%)がプロリン残基であるアミノ酸配列を有することができる。1つの特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、プロリン残基のみを含む。

#### 【0256】

いくつかの態様では、ペプチドリンカーは、1つのシステイン残基など、少なくとも1つのシステイン残基を含む。例えば、いくつかの実施形態では、リンカーは、少なくとも1つのシステイン残基と、G l y、S e r、A l a、およびT h rからなる群から選択されるおよびアミノ酸残基とを含む。いくつかのそのような実施形態では、リンカーは、グリシン残基およびシステイン残基のみなど、グリシン残基およびシステイン残基を含む。典型的には、1つのペプチドリンカー当たり1つのシステイン残基のみが含まれる。システイン残基を含む特定のリンカーの一例は、アミノ酸配列G l y<sub>m</sub> - C y s - G l y<sub>n</sub>を有するペプチドリンカーを含み、式中、nおよびmは各々、1~12、例えば3~9、4~8、または4~7の整数である。特定の変化形では、そのようなペプチドリンカーは、アミノ酸配列G G G G G - C - G G G G G(配列番号133)を有する。

#### 【0257】

いくつかの実施形態では、融合タンパク質のリンカーは、構造化または拘束されたリンカーである。特定の実施形態では、構造化リンカーは、配列(A P)<sub>n</sub>または(E A A A K)<sub>n</sub>(配列番号134)(式中、nは2~20、好ましくは4~10である)を含有し、A S - (A P)<sub>n</sub> - G T(配列番号135)またはA S - (E A A A K)<sub>n</sub> - G T(配列番号136)(式中、nは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15など、2~20である)が挙げられるが、これらに限定されない。

他の実施形態では、リンカーは、(GGGGA)<sub>n</sub> (配列番号137)、(PGGGS)<sub>n</sub> (配列番号138)、(AGGGS)<sub>n</sub> (配列番号139)、またはGGS-(EGKSSGSGSESKST)<sub>n</sub>-GGS (配列番号140)を含み、式中、nは2~20である。いくつかの実施形態では、リンカーは、SSSSASSSA (配列番号141)、GSPGSPG (配列番号142)、またはATTTGSSPGPT (配列番号143)である。いくつかの実施形態では、そのようなリンカーは、その構造により、タンパク質分解分解に対してより耐性があり、それによってインピボで注射されたときに利点を提供し得る。

#### 【0258】

いくつかの実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーではなく、切断不可能なリンカーとも呼ばれる。いくつかの実施形態では、リンカーは、プロテアーゼによって切断可能ではない。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーではないか、またはプロテアーゼによって切断可能ではないリンカーは、インピボ送達または組み換え産生に対して概して安定したリンカーである。いくつかの態様では、プロテアーゼによって切断可能ではないリンカーは、好ましくは、プロテアーゼの切断可能なペプチド配列または認識部位内にある、少なくとも1つのペプチド結合を含有しないリンカーを含む。特定の実施形態では、切断不可能なリンカーは、プロテアーゼの標的基質ではなく、これにより、リンカーは、同じプロテアーゼの基質認識部位を含有するリンカーと比較して、プロテアーゼによって優先的または特異的に切断されない。

#### 【0259】

いくつかの実施形態では、リンカーは、特定のプロテアーゼの基質認識部位または切断部位を含有せず、これは、プロテアーゼによって切断されるプロテアーゼの活性部位によって認識される配列である。典型的には、例えば、セリンプロテアーゼについて、切断配列は、基質中のP1-P4およびP1'-P4'アミノ酸で構成され、切断は、P1位置の後に生じる。典型的には、セリンプロテアーゼの切断配列は、多くのプロテアーゼの伸長した基質特異性に適合するように6残基の長さであるが、プロテアーゼに応じてより長くてもまたは短くてもよい。典型的には、リンカーは、プロテアーゼによって認識されるP1-P1'の切れやすい結合配列を含まない。いくつかの態様では、切断不可能なリンカー、またはプロテアーゼによる切断について特異的に認識される基質認識部位を含有しないリンカーは、プロテアーゼによる切断がプロテアーゼの標的基質の切断よりも実質的に少ないリンカーである。

#### 【0260】

いくつかの実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーである。いくつかの態様では、切断可能なリンカーは、生理学的条件下で破壊され得る少なくとも1つの結合の存在により、プロテアーゼの基質である配列をさらに含む、上記のいずれかなどのリンカーである。場合によっては、切断可能なリンカーは、インピボで細胞環境中に存在するものを含む、細胞外プロテアーゼへの曝露の後などにインピボで存在する特定の条件下で、切断の影響を受けやすいか、または切断に感受性である。場合によっては、プロテアーゼは、腫瘍微小環境などの特定の生理学的微小環境内に存在し、それによって、切断が生じ得る部位を制限し得る。

#### 【0261】

プロテアーゼは、典型的には、別の非標的基質と比較して、特定の標的基質の切断に対する特異性または選択性を示す。そのような特異性の程度は、プロテアーゼのその基質に対する選択性および酵素の効率の尺度である、配列、例えばリンカーの切断速度定数に基づいて決定され得る。様々な濃度の基質の存在下で経時的な切断の増加率を決定する任意の方法を使用して、特異性定数を計算することができる。例えば、基質は、プロテアーゼによる切断時に放出される蛍光発生部分に連結される。異なるプロテアーゼ濃度での切断速度を決定することによって、切断に対する特異性定数( $k_{cat}/K_m$ )が、特定のリンカーに対する特定のプロテアーゼについて決定され得る。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、少なくとも約 $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ 、または少なくとも $5 \times 10^4$

10

20

30

40

50

$M^{-1}S$ 、少なくとも  $10 \times 10^4 M^{-1}S$ 、少なくとも  $10 \times 10^5 M^{-1}S$  以上の速度で、プロテアーゼによって特異的に切断されることが可能であるリンカーである。

【0262】

いくつかの実施形態では、本開示の拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、第1および第2の構成成分を結合する切断可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、プロテアーゼ、通常は細胞外プロテアーゼの基質として機能することができるアミノ酸配列を含む。例えば、切断可能なリンカーは、好ましくはプロテアーゼの切断可能なペプチド配列内にある、少なくとも1つのペプチド結合を含有する切断配列を含んでもよい。好適なプロテアーゼとしては、例えば、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、システインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ、およびプラスミン活性化因子が挙げられ、これらは、関節リウマチまたは癌などの疾患において強化された形で形成または活性化されて、過剰な組織分解、炎症、および転移をもたらす。特定の実施形態では、プロテアーゼは、腫瘍、活性化免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞もしくはNK細胞)、または腫瘍微小環境中の細胞によって産生されるプロテアーゼである。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、グランザイムB、マトリプターゼ、またはMMP-2などのMMPである。

10

【0263】

切断可能なリンカーは、標的を発現する細胞に近接する腫瘍によって産生され、かつ/または多重特異性ポリペプチド構築物の所望の標的と組織中で共局在化される腫瘍によって産生される、プロテアーゼに基づいて選択されてもよい。多数の癌、例えば、固形腫瘍において既知の基質を有するプロテアーゼのレベルの上昇に関する文献の報告がある。例えば、La Rocca et al, (2004) British J. of Cancer 90(7): 1414-1421を参照されたい。

20

【0264】

いくつかの実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物の第1および第2の構成成分を結合する切断可能なリンカーは、構成成分の1つによって活性化される免疫エフェクター細胞によって産生されるプロテアーゼによって切断される。例えば、エフェクターで可能となるか、または増強されるIgG Fc領域を包含する多重特異性ポリペプチド構築物は、標的抗原と関与したときにADCCを引き起こすことが可能である。ADCCの中心は、エフェクター細胞、すなわちNK細胞および細胞傷害性T細胞からのグランザイムBおよびパーフォリンの放出である。グランザイムBは放出すると、パーフォリン依存的に標的細胞に入り、そこでアポトーシスを媒介する。重要なことに、グランザイムBは、エフェクター細胞と標的細胞との間の細胞外シナプス内で活性である。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物の第1および第2の構成成分を結合する切断可能なリンカーは、グランザイムBによって切断される。グランザイムBは、多重特異性ポリペプチド構築物の構成成分の1つによって媒介されるエフェクター細胞活性化中に放出される。いくつかの実施形態では、グランザイムBおよび他のプロテアーゼは、活性化T細胞またはNK細胞を含む免疫エフェクター細胞によって産生され得る。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物によるTAAの結合時のCD3関与によるT細胞の活性化は、そのようなプロテアーゼを放出し得、これは次いで、特定の切断可能なリンカーを切断し、それによってCD3結合分子の活性を増強するかまたは増加させて、CD3に関与し得る。いくつかの実施形態では、切断は、切断されていない状態でTAAに結合されたときに、多重特異性構築物によって達成される活性を増幅または増加させることができる。

30

40

【0265】

例示的な基質としては、以下の酵素またはプロテアーゼの1つ以上によって切断可能な基質が挙げられるが、これらに限定されない: ADAMS、ADAMTS、例えば、ADAM8; ADAM9; ADAM10; ADAM12; ADAM15; ADAM17/TACE; ADAMDEC1; ADAMTS1; ADAMTS4; ADAMTS5; アスパルテートプロテアーゼ、例えば、BACEまたはレニン; アスパラギン酸カテプシン、例え

50

ば、カテプシンDまたはカテプシンE；カスパーゼ、例えば、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、またはカスパーゼ14；システインカテプシン、例えば、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンK、カテプシンL、カテプシンS、カテプシンV/L2、カテプシンX/Z/P；システインプロテアーゼ、例えば、クルジパイン；レグマイン；オツパイン-2；K L K、例えば、K L K 4、K L K 5、K L K 6、K L K 7、K L K 8、K L K 10、K L K 11、K L K 13、またはK L K 14；メタロプロテアーゼ、例えば、メプリン；ネプリライシン；P S M A；B M P - 1；M M P、例えば、M M P 1、M M P 2、M M P 3、M M P 7、M M P 8、M M P 9、M M P 10、M M P 11、M M P 12、M M P 13、M M P 14、M M P 15、M M P 16、M M P 17、M M P 19、M M P 20、M M P 23、M M P 24、M M P 26、またはM M P 27、セリンプロテアーゼ、例えば、活性化プロテインC、カテプシンA、カテプシンG、キマーゼ、凝固因子プロテアーゼ（例えば、F V I I a、F I X a、F X a、F X I a、F X I I a）、エラスターゼ、グランザイムB、グアニジノベンゾエターゼ、H t r A 1、ヒト好中球エラスターゼ、ラクトフェリン、マラプシン、N S 3 / 4 A、P A C E 4、プラスミン、P S A、t P A、トロンピン、トリプターゼ、u P A；I I型膜貫通型セリンプロテアーゼ（T T S P）、例えば、D E S C 1、D P P - 4、F A P、ヘプシン、マトリプターゼ-2、マトリプターゼ、T M P R S S 2、T M P R S S 3、またはT M P R S S 4；およびそれらの任意の組み合わせ。

10

【0266】

20

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、例えば、2個以上のプロテアーゼ、3個以上のプロテアーゼ、4個以上のプロテアーゼなどの複数のプロテアーゼによって切断される。

【0267】

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、特定のプロテアーゼ、例えば、標的を発現する細胞に近接する腫瘍によって産生され、かつ/または多重特異性ポリペプチド構築物の標的と共局在化される腫瘍によって産生されることが既知である、プロテアーゼとの使用のために選択される。

【0268】

30

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、特定のプロテアーゼの基質認識部位または切断部位を含有し、これは、プロテアーゼによって切断されるプロテアーゼの活性部位によって認識される配列である。典型的には、例えば、セリンプロテアーゼについて、切断配列は、基質中のP1-P4およびP1'-P4'アミノ酸で構成され、切断は、P1位置の後に生じる。典型的には、セリンプロテアーゼの切断配列は、多くのプロテアーゼの伸長した基質特異性に適合するように6残基の長さであるが、プロテアーゼに応じてより長くてもまたは短くてもよい。典型的には、切断可能なリンカーは、プロテアーゼによって認識されるP1-P1'の切れやすい結合配列を含む。いくつかの態様では、切断可能なリンカーは、例えば、プロテアーゼの基質認識部位配列または切断配列を導入することによって、特定のプロテアーゼによって切断されることが可能なペプチド結合を導入するように操作される。

40

【0269】

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、2つ以上の基質配列の組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、各基質配列は、同じプロテアーゼによって切断される。いくつかの実施形態では、基質配列の少なくとも2つは、異なるプロテアーゼによって切断される。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、グランザイムBの基質であるアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、グランザイムB切断可能なリンカーは、一般式P4 P3 P2 P1 P1'（配列番号144）を有するアミノ酸配列を含有し、式中、P4はアミノ酸I、L、Y、M、F、V、またはAであり、P3はアミノ酸A、G、S、V、E、D、Q、N、またはYであり、P2はアミノ酸H、P、A、V、G、S、またはTであり、P1はアミノ酸DまたはEであり、P1'はアミノ酸I、L、Y、M、

50

F、V、T、S、G、またはAである。いくつかの実施形態では、グランザイムB切断可能なリンカーは、一般式  $P_4 - P_3 - P_2 - P_1 - P_1'$  (配列番号145) を有するアミノ酸配列を含有し、式中、 $P_4$  はアミノ酸IまたはLであり、 $P_3$  はアミノ酸Eであり、 $P_2$  はアミノ酸PまたはAであり、 $P_1$  はアミノ酸Dであり、 $P_1'$  はアミノ酸I、V、T、S、またはGである。

【0270】

いくつかの実施形態では、グランザイムBの基質は、アミノ酸配列LEAD (配列番号146)、LEPG (配列番号147)、またはLEAE (配列番号148) を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列を含有し、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列IEPDI (配列番号149)、LEPDG (配列番号150)、LEADT (配列番号151)、IEPDG (配列番号152)、IEPDV (配列番号153)、IEPDS (配列番号154)、IEPDT (配列番号155)、IEPDP (配列番号144)、LEPDG (配列番号152)、またはLEADG (配列番号153) を含む。

10

【0271】

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、マトリプターゼの基質であるアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、配列  $P_4QAR$  (A/V) (配列番号156) を含み、式中、 $P_4$  は任意のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、配列  $RQAR$  (A/V) (配列番号157) を含む。いくつかの実施形態では、マトリプターゼの基質は、アミノ酸配列  $RQAR$  (配列番号158) を含む。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列  $RQARV$  (配列番号159) を含む。

20

【0272】

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、1つ以上のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の基質であるアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、MMPはMMP-2である。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、一般式  $P_3 - P_2 - P_1 - P_1'$  (配列番号160) を含有し、式中、 $P_3$  はP、V、またはAであり、 $P_2$  はQまたはDであり、 $P_1$  はAまたはNであり、 $P_1'$  はL、I、またはMである。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、一般式  $P_3 - P_2 - P_1 - P_1'$  (配列番号161) を含有し、式中、 $P_3$  はPであり、 $P_2$  はQまたはDであり、 $P_1$  はAまたはNであり、 $P_1'$  はLまたはIである。いくつかの実施形態では、MMPの基質は、アミノ酸配列PAGL (配列番号162) を含む。

30

【0273】

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、グランザイムBの基質であるアミノ酸配列と、マトリプターゼの基質であるアミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列LEAD (配列番号146) と、アミノ酸配列  $RQAR$  (配列番号158) との組み合わせを含む。

【0274】

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、グランザイムBの基質であるアミノ酸配列と、MMPの基質であるアミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列LEAD (配列番号146) と、アミノ酸配列PAGL (配列番号162) との組み合わせを含む。

40

【0275】

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、マトリプターゼの基質であるアミノ酸配列と、MMPの基質であるアミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列  $RQAR$  (配列番号158) と、アミノ酸配列PAGL (配列番号162) との組み合わせを含む。

【0276】

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、グランザイムBの基質であるアミノ酸配列と、マトリプターゼの基質であるアミノ酸配列と、MMPの基質であるアミノ酸配

50

列との組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、グランザイムBの基質であるアミノ酸配列と、MMPの基質であるアミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列LEAD（配列番号146）と、アミノ酸配列RQAR（配列番号158）と、アミノ酸配列PAGL（配列番号162）との組み合わせを含む。

【0277】

切断可能なリンカーは、任意の既知のリンカーを含み得る。切断可能なリンカーの例は、Be'liveau et al. (2009) FEBS Journal, 276、米国公開出願第US2016/0194399号、同第US2015/0079088号、同第US2017/0204139号、同第US2016/0289324号、同第US2016/0122425号、同第US2015/0087810号、同第US2017/0081397号、米国特許第US9644016号に記載されている。

10

【0278】

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、TGLEADGSPAGLGRQARVG（配列番号163）、TGLEADGSRQARVGPAGLG（配列番号164）、TGSPAGLEADGSRQARVGS（配列番号162）、TGPAGLGLLEADGSRQARVG（配列番号166）、TGRQARVGLLEADGSPAGLG（配列番号167）、TGSRQARVGPAGLEADGS（配列番号168）、およびTGPAGLGSRQARVGLLEADGS（配列番号169）、GPAGLGLLEPDGSRQARVG（配列番号170）、GSGGGGIEPDIGGSGGS（配列番号171）、GSGGGGLEADTGGSGGS（配列番号172）、GSIEPDIGS（配列番号173）、GSLEADTGS（配列番号174）、GSGGGGIEPDGGGSGGS（配列番号175）、GSGGGGIEPDVGGSGGS（配列番号176）、GSGGGGIEPDSGGSGGS（配列番号177）、GSGGGGIEPDTGGSGGS（配列番号178）、GGGSLLEPDGSGGS（配列番号179）、およびGPAGLGLLEADGSRQARVG（配列番号180）、GSGGGSGSGSGGS（配列番号181）、GSSAGSEAGGSGQAGVGS（配列番号182）、GSGGGGLEAEGSGGGGS（配列番号183）、GSGGGGIEPDPGGSGGS（配列番号184）、TGGSGGGGIEPDIGGSGGS（配列番号185）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

30

【0279】

e. 抗PD-1 VHHドメイン

本開示の拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、本明細書に提供されるいずれかの中からの少なくとも1つのPD-1 VHHドメインを含む。いくつかの実施形態では、PD-1 VHHドメインは、配列番号245~287、294~299、および312~315のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含む。

【0280】

特定の実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、記載されるいずれかなど、少なくとも2つのPD-1 VHHドメインを含有する。場合によっては、少なくとも1つのPD-1 VHHドメインは、ヘテロ二量体FcのFcポリペプチドに対してアミノ末端に位置付けられ、少なくとも1つのPD-1 VHHドメインは、CD3結合領域のVH鎖またはVL鎖に対してカルボキシ末端に位置付けられる。いくつかの態様では、2つのPD-1 VHHドメインの各々は、同一である。

40

【0281】

特定の実施形態では、拘束された多重特異性ポリペプチド構築物は、PD-1ドメインのみを含有する。場合によっては、PD-1 VHHドメインは、ヘテロ二量体FcのFcポリペプチドに対してアミノ末端に位置付けられる。いくつかの実施形態では、PD-1 VHHドメインは、CD3結合領域のVH鎖またはVL鎖に対してカルボキシ末端に位置付けられる。

【0282】

50

いくつかの実施形態では、抗PD-1 VHHドメインは、直接またはリンカーを介して間接的に、Fc領域および/またはCD3結合領域に連結される。いくつかの実施形態では、連結は、リンカーを介している。いくつかの実施形態では、リンカーは、記載される任意の可動性または剛性リンカーを含み得る、連結ペプチド(LP)である。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGSGGS、すなわち、(GGG)<sub>2</sub>(配列番号244)、GGSGGSGGS、すなわち、(GGG)<sub>3</sub>(配列番号245)、GGSGGSGGSGGS、すなわち、(GGG)<sub>4</sub>(配列番号246)、およびGGSGGSGGSGGSGGS、すなわち、(GGG)<sub>5</sub>(配列番号247)からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、リンカーは、非限定的な例として、GG、GGG、GGGG(配列番号248)、GGGGG(配列番号249)、およびGGGGGG(配列番号7)などのグリシン残基を含む可動性リンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、GSリンカーとグリシンリンカーとの組み合わせを含む。

【0283】

#### f. 共刺激結合ドメイン

本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、共刺激受容体に結合する1つ以上の共刺激受容体結合領域(CRR)を含む。いくつかの実施形態では、提供される多重特異性ポリペプチド構築物の1つ以上のCRRは、T細胞上に発現される共刺激受容体に結合する。いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、活性化T細胞の表面上で上方制御、誘発、または発現される。いくつかの態様では、CRRは、共刺激受容体に結合し、共刺激受容体を刺激する。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチドのCRRへの共刺激受容体の作動性結合は、T細胞における下流シグナル伝達を誘発して、CD3の関与後にT細胞活性化または機能性を増強または強化する。いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、CRR、またはCRRの各々は独立して、抗体もしくは抗原結合断片、共刺激受容体の天然同族結合パートナー、アンチカリン(操作されたリポカリン)、DARPin、フィノマー、センチリン(操作されたフィブロネチンIIIドメイン)、シスチン-ノットドメイン、アフィリン、アフィボディ、または操作されたCH3ドメインである。

【0284】

いくつかの実施形態では、CRR、または第1のCRRおよび第2のCRRなどのCRRの各々は独立して、抗体またはその抗原結合断片の1つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、CRR、または第1の抗原結合ドメインおよび第2のCRRなどのCRRの各々は独立して、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、単ドメイン重鎖抗体、および単ドメイン軽鎖抗体からなる群から選択される、抗体またはその抗原結合断片の1つ以上のコピーを含む。

【0285】

いくつかの実施形態では、CRR、または第1のCRRおよび第2のCRRなどのCRRの各々は独立して、単鎖抗体である。いくつかの実施例では、単鎖は、scFv、scAb、単ドメイン重鎖抗体、または単ドメイン軽鎖抗体である。

【0286】

いくつかの実施形態では、CRR、または第1のCRRおよび第2のCRRなどのCRRの各々は独立して、1つ以上の単ドメイン抗体(sdAb)断片、例えば、VHH、VNAR、操作されたVHまたはVKドメインを含む。VHHは、天然ラクダ科重鎖のみの抗体、重鎖のみの抗体を産生する遺伝子操作されたげっ歯類、またはナイーブ/合成のラクダ科もしくはヒト化ラクダ科の単ドメイン抗体ライブラリーから生成され得る。VNARは、軟骨魚重鎖のみの抗体から生成され得る。界面工学および特定の生殖系列ファミリーの選択を含む様々な方法が、従来的にヘテロ二量体のVHおよびVKドメインから単量体sdAbを生成するために実装されてきた。

【0287】

いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物のCRR、または第1のCRRおよび/または第2のCRRなどのCRRの各々は独立して、共刺激性受容体

10

20

30

40

50

に結合する少なくとも1つのs d A bまたはs c F vを含有する。いくつかの実施形態では、共刺激受容体に結合する少なくとも1つのs c F vまたはs d A bは、多重特異性ポリペプチド構築物のF c領域に対してアミノ末端に、かつ/またはC D 3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、共刺激受容体に結合する1つのs c F vまたはs d A bのみを含有し、これは、F c領域に対してアミノ末端、および/またはC D 3結合領域に対してカルボキシ末端のいずれかに位置付けられ得る。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、F c領域に対してアミノ末端に、かつ/またはC D 3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる、共刺激受容体に結合する2つのs c F vまたはs d A bを含有する。

10

## 【0288】

いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、ヘテロ二量体F c領域の第1のF cポリペプチド、リンカー、抗C D 3抗体または抗原結合断片(例えば、F v)のV Hドメイン、および共刺激受容体に結合するs c F vまたはs d A bを含む第1のポリペプチドと、ヘテロ二量体F c領域の第2のF cポリペプチド、リンカー、抗C D 3抗体または抗原結合断片(例えば、F v)のV Lドメイン、および任意選択的に共刺激受容体に結合する別の、同じ、または異なるs c F vまたはs d A bを含む第2のポリペプチドと、を含む、2つのポリペプチドから形成されるか、またはそれらを含む。共刺激受容体に結合するs c F vまたはs d A bは、ヘテロ二量体F cのF cポリペプチドに対してアミノ末端に、かつ/またはC D 3結合領域のV H鎖もしくはV L鎖に対してカルボキシ末端に位置付けられ得る。多重特異性ポリペプチド構築物の第1および/または第2のポリペプチドの少なくとも1つは、セクションI I . 4に記載されるようにT A Aまたはその鎖に結合する抗原結合ドメインも含む。いくつかの実施形態では、T A Aに結合する抗原結合ドメインは、s c F vまたはs d A bであり、多重特異性ポリペプチド構築物の第1および/または第2のポリペプチドの一部として含まれる。いくつかの実施形態では、T A Aに結合する抗原結合ドメインは、F a bであり、多重特異性ポリペプチド構築物は、第3のポリペプチドからさらに形成され、少なくとも第1および第2のポリペプチドは、T A Aに結合するF a bの鎖(例えば、F a bのV H - C H 1またはV L - C L)を含み、第3のポリペプチドは、T A Aに結合するF a bの他方の鎖(例えば、F a bのV H - C H 1またはV L - C Lの他方)を含有する。

20

30

## 【0289】

いくつかの実施形態では、C R B R、または第1のC R B Rおよび/もしくは第2のC R B RなどのC R B Rの各々は独立して、2つ以上の鎖を含有する。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物のC R B R、または第1のC R B Rおよび/または第2のC R B RなどのC R B Rの各々は独立して、F A Bとして集合したV HおよびV L配列を含有する。

## 【0290】

いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物のC R B R抗原結合ドメイン、または第1の抗原結合ドメインおよび/もしくは第2の抗原結合ドメインなどのC R B R抗原結合ドメインの各々は独立して、共刺激受容体に結合するF a b抗体のV H - C H 1(F d)およびV L - C Lを含有する。いくつかの実施形態では、V H - C H 1(F d)およびV L - C Lを含有するF a b抗体は、多重特異性ポリペプチド構築物のF c領域に対してアミノ末端に、かつ/またはC D 3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、F c領域に対してアミノ末端、および/またはC D 3結合領域に対してカルボキシ末端のいずれかに位置付けられ得る、共刺激受容体に結合する、V H - C H 1(F d)またはV L - C Lを含有する1つのF a b抗体のみを含有する。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、一方がF c領域に対してアミノ末端に位置付けられ、他方がC D 3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる、共刺激受容体に結合する、各々がV H - C H 1(F d)およびV L - C Lを含有する2つのF a b抗体断片を含有する。

40

50

## 【0291】

いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、および共刺激受容体に結合するFab抗体断片のVH-CH1(Fd)またはVL-CLを含む第1のポリペプチドと、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、および任意選択的に、共刺激受容体に結合するFab抗体断片の同じVH-CH1(Fd)またはVL-CLを含む第2のポリペプチドと、共刺激受容体に結合するFab抗体断片のVH-CH1(Fd)またはVL-CLの他方を含む第3のポリペプチドと、を含む、3つ以上のポリペプチドから形成されるか、またはそれらを含む。多重特異性ポリペプチド構築物の第1、第2、および/または第3のポリペプチドはまた、記載されるいずれかなどのPD-1 VHHドメインを含み得る。

10

## 【0292】

いくつかの実施形態では、CRBR、またはCRBRの各々は独立して、共刺激受容体(例えば、天然リガンド)の天然(natural)(天然(native))同族結合パートナー、または共刺激受容体への結合活性を示すそのバリエーションであるか、またはそれを含む。

## 【0293】

いくつかの実施形態では、提供される多重特異性ポリペプチド構築物の1つ以上のCRBRは、T細胞上に発現される共刺激受容体に結合する。いくつかの実施形態では、共刺激受容体に結合する2つ以上のCRBRがあり、第1のCRBRおよび第2のCRBRなどのCRBRの各々は、同じ共刺激受容体に結合する。いくつかの実施形態では、第1のCRBRおよびCRBRなどのCRBRの各々は、異なる共刺激受容体に結合する。いくつかの実施形態では、第1のCRBRおよび第2のCRBRなどのCRBRの各々は、同じ共刺激受容体上の異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、第1の抗原-CRBRおよびCRBRなどのCRBRの各々は、同じ共刺激受容体上の同じエピトープに結合する。

20

## 【0294】

いくつかの実施形態では、共刺激受容体に結合するCRBR、またはCRBRの各々は独立して、共刺激受容体への一価、二価、三価、または四価結合をもたらす。

## 【0295】

いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、対象から得られる初代T細胞などのT細胞上に発現される。いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、ヒト対象から得られる初代ヒトT細胞などのヒトT細胞上に発現される。

30

## 【0296】

いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、腫瘍壊死因子(TNF)受容体ファミリーのメンバーである。いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)のメンバーである。いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、受容体のB7ファミリーのメンバーである。

## 【0297】

いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、グルコシルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体(BAFF-R)、B細胞成熟抗原(BCMA)、膜貫通アクチベーターおよびCAMLインタラクター(TACI)、ならびにNKGD2からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、41BB、OX40、GITR、ICOS、またはCD28から選択される。いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、41BB、OX40、またはGITRから選択される。

40

## 【0298】

いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、41BBである。いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、OX40である。いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、GITRである。いくつかの実施形態では、共刺激受容体は、ICOSである。いくつかの実施

50

形態では、共刺激受容体は、CD28である。

【0299】

いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチドのCRBRは、共刺激受容体への作動性結合分子であるか、またはそれを含む。CRBRは、共刺激受容体に結合し、受容体の天然リガンドによって開始、誘発、または刺激されるものと同様または同一である反応または活性を開始、誘発、または刺激することができる。いくつかの態様では、共刺激受容体へのCRBRの結合は、受容体の天然リガンドによって開始、誘発、または刺激されるシグナルの5%超、10%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、または100%超である、下流シグナルを誘発または刺激する。

10

【0300】

いくつかの実施形態では、1つ以上のCRBRは、共刺激受容体41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、グルコルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体(BAFF-R)、B細胞成熟抗原(BCMA)に結合する抗体またはその断片である。いくつかの実施形態では、1つ以上のCRBRは、共刺激受容体41BB、OX40、GITR、ICOS、またはCD28に結合する抗体またはその断片である。いくつかの実施形態では、1つ以上のCRBRは、共刺激受容体41BB、OX40、またはGITRに結合する抗体またはその断片である。41BB、OX40、およびGITRに結合するための例示的なポリペプチドは、PCT公開第WO2017/123650号、同第WO2017/123673号、および同第WO2017/015623号に記載されている。いくつかの実施形態では、1つ以上のCRBRは、PCT公開第WO2017/123650号、同第WO2017/123673号、および同第WO2017/015623号に記載されるものなど、共刺激受容体に結合する単一ドメイン抗体(sdAb)である。

20

【0301】

いくつかの実施例では、共刺激受容体結合領域(CRBR)は、41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、グルコルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体(BAFF-R)、B細胞成熟抗原(BCMA)、膜貫通アクチベーターおよびCAMLインタラクター(TACI)、NKG2Dの天然同族結合パートナーに結合するか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、天然同族結合パートナーは、41BBリガンド(41BBL)、OX40L(CD252)、CD70、GITRリガンド/TNFSF18、CD80(B7-1)、CD86(B7-2)、ICOSリガンド(ICOSL)、CD154(CD40L)、B細胞活性化因子(BAFF)、A増殖誘導リガンド(APRIL)、NKG2D断片、またはそれらの機能的断片から選択される。

30

【0302】

CRBRの例示的な配列を表4に記載する。

【0303】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCRBR、または独立して各CRBRは、共刺激受容体41BBに結合する。いくつかの実施例では、CRBRは、例えば、VHおよびVLを含有するsdAbまたは断片(例えば、scFv)など、41BBに特異的な、またはそれに結合する抗体または抗原結合断片であるか、またはそれを含有する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCRBR、または独立して各CRBRは、41BBの天然リガンドであるか、またはその機能的結合断片である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCRBR、または独立して各CRBRは、アンチカリンである。そのような41BB結合CRBRの例は、配列番号186~210のいずれかに記載される。いくつかの実施形態では、41BB結合CRBRは、配列番号187、189、および191のいずれかに記載されるVHと、配列番号188、190、または192のいずれかに記載されるVLとを含有する。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中のCRBR、または独立して各CRBRは、上記の配列番号のいずれかと少なくとも85%、85%

40

50

、 87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、41BBに結合することができる。

【0304】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCRBR、または独立して各CRBRは、共刺激受容体OX40に結合する。いくつかの実施例では、CRBRは、例えば、VHおよびVLを含有するsdAbまたは断片（例えば、scFv）など、OX40に特異的な、またはそれに結合する抗体または抗原結合断片であるか、またはそれを含有する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCRBR、または独立して各CRBRは、OX40の天然リガンドであるか、またはその機能的結合断片である。そのようなOX40結合CRBRの例は、配列番号211～220のいずれかに記載される。いくつかの実施形態では、OX40結合CRBRは、配列番号216および218のいずれかに記載されるVHと、配列番号217および219のいずれかに記載されるVLとを含有する。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中のCRBR、または独立して各CRBRは、上記の配列番号のいずれかと少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、OX40に結合することができる。

10

【0305】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCRBR、または独立して各CRBRは、共刺激受容体GITRに結合する。いくつかの実施例では、CRBRは、例えば、VHおよびVLを含有するsdAbまたは断片（例えば、scFv）など、GITRに特異的な、またはそれに結合する抗体または抗原結合断片であるか、またはそれを含有する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCRBR、または独立して各CRBRは、GITRの天然リガンドであるか、またはその機能的結合断片である。そのようなGITR結合CRBRの例は、配列番号221～230のいずれかに記載される。いくつかの実施形態では、GITR結合CRBRは、配列番号222、224、226、および228のいずれかに記載されるVHと、配列番号223、225、227、および229のいずれかに記載されるVLとを含有する。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中のCRBR、または独立して各CRBRは、上記の配列番号のいずれかと少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、GITRに結合することができる。

20

30

【0306】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCRBR、または独立して各CRBRは、共刺激受容体CD27に結合する。いくつかの実施例では、CRBRは、例えば、VHおよびVLを含有するsdAbまたは断片（例えば、scFv）など、CD27に特異的な、またはそれに結合する抗体または抗原結合断片であるか、またはそれを含有する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCRBR、または独立して各CRBRは、CD27の天然リガンドであるか、またはその機能的結合断片である。そのようなCD27結合CRBRの例は、配列番号231のいずれかに記載される。いくつかの実施形態では、CD27結合CRBRは、配列番号232に記載されるVHと、配列番号233に記載されるVLとを含有する。提供される多重特異性ポリペプチド構築物中のCRBR、または独立して各CRBRは、上記の配列番号のいずれかと少なくとも85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、CD27に結合することができる。

40

【0307】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCRBR、または独立して各CRBRは、共刺激受容体ICOSに結合する。いくつかの実施例では、CRBRは、例えば、VHおよびVLを含有するsdAbまたは断片（例えば、scFv）など、ICOSに特異的な、またはそれに結合する抗体または抗原結合断片であるか、またはそれを含有する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのCRBR、または独立して各CRBRは、ICOSの天然リガンドであるか、またはその機能的結合断片である。例示的なICOS結合C

50

R B R 配列は、配列番号 2 3 4 に記載される。

【 0 3 0 8 】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの C R B R、または独立して各 C R B R は、共刺激受容体 C D 2 8 に結合する。いくつかの実施例では、C R B R は、例えば、V H および V L を含有する s d A b または断片（例えば、s c F v）など、C D 2 8 に特異的な、またはそれに結合する抗体または抗原結合断片であるか、またはそれを含有する。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの C R B R、または独立して各 C R B R は、C D 2 8 の天然リガンドであるか、またはその機能的結合断片である。例示的な C D 2 8 結合 C R B R 配列は、配列番号 2 3 5 に記載される。

【表 4 - 1】

CRBR	フォーマット	参照	配列番号
表 4: 例示的な CRBR 配列			
41BB 結合 CRBR 配列			
41BBL	天然リガンド	UniProt アクセッション番号 P41273	186
PF-05082566	VH	US2012/0237498 (配列番号 43)	187
	VL	US2012/0237498 (配列番号 45)	188
BMS663513	VH	W02005/035584 (配列番号 9)	189
	VL	W02005/035584 (配列番号 6)	190
MSB7	VH	US2017/0226215 (配列番号 138)	191
	VL	US2017/0226215 (配列番号 28)	192
41BB アンチカリン	アンチカリン	W02016/177762 (配列番号 12)	193
41BB アンチカリン	アンチカリン	W02016/177762 (配列番号 13)	194
41BB アンチカリン	アンチカリン	W02016/177762 (配列番号 14)	195
41BB アンチカリン	アンチカリン	W02016/177762 (配列番号 15)	196
41BB アンチカリン	アンチカリン	W02016/177762 (配列番号 16)	197
41BB アンチカリン	アンチカリン	W02016/177762 (配列番号 17)	198
41BB アンチカリン	アンチカリン	W02016/177762 (配列番号 18)	199
41BB アンチカリン	アンチカリン	W02016/177762 (配列番号 19)	200
41BB アンチカリン	アンチカリン	W02016/177762 (配列番号 20)	200
ヒト 41BBL の 71~254	41BB リガンド	W02017/167672 (配列番号 3)	201
ヒト 41BBL の 85~254	41BB リガンド	W02017/167672 (配列番号 4)	202
ヒト 41BBL の 80~254	41BB リガンド	W02017/167672 (配列番号 5)	203
ヒト 41BBL の 52~254	41BB リガンド	W02017/167672 (配列番号 6)	204
ヒト 41BBL の 71~248	41BB リガンド	W02017/167672 (配列番号 7)	206
ヒト 41BBL の 85~248	41BB リガンド	W02017/167672 (配列番号 8)	207
ヒト 41BBL の 80~248	41BB リガンド	W02017/167672 (配列番号 9)	208
ヒト 41BBL の 52~248	41BB リガンド	W02017/167672 (配列番号 10)	209

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

41BB sdAb	sdAb	US2017/0198050	210
OX40 結合 CRBR 配列			
OX40 リガンド	天然リガンド	UniProt アクセション番号 P23510	211
OX40 リガンド	天然リガンド	US7, 959, 925 (配列番号 2)	212
ヒト OX40L:51~183	天然リガンド	W02017/167672 (配列番号 11)	213
ヒト OX40L:51~183 N90D	天然リガンド	W02017/167672 (配列番号 12)	214
ヒト OX40L:52~183	天然リガンド	W02017/167672 (配列番号 13)	215
1A07	VH	US2015/0307617 (配列番号 56)	216
	VL	US2015/0307617 (配列番号 59)	217
1949	VH	W02016/179517 (配列番号 16)	218
	VL	W02016/179517	219
1D10v1	sdAb	US9, 006, 399	220
GITR 結合 CRBR 配列			
GITR リガンド	天然リガンド	UniProt 番号 Q9UNG2	221
36E5	VH	US2014/0348841 (配列番号 104)	222
	VL	US2014/0348841 (配列番号 105)	223
TRX-518	VH	US2013/0183321 (配列番号 54)	224
	VL	US2013/0183321 (配列番号 44)	225
5H7v2	VH	US2015/0064204 (配列番号 282)	226
	VL	US2015/0064204 (配列番号 134)	227
41G5v2	VH	US2015/0064204 (配列番号 312)	228
	VL	US2015/0064204 (配列番号 124)	229
C06v3	sdAb	US2017/0022284 (配列番号 59)	230
CD27 結合 CRBR 配列			
CD70-ECD	天然リガンド	UniProt 番号 P32970	231
1F5	VH	US2011/0274685	232
	VL	US2011/0274685	233
ICOS 結合 CRBR 配列			
ICOS sdAb	sdAb		234
CD28 結合 CRBR 配列			
CD28 sdAb	sdAb		235

## 【0309】

いくつかの実施形態では、1つ以上のCRBRは、直接またはリンカーを介して間接的に、Fc領域および/またはCD3結合領域に連結される。いくつかの実施形態では、連結は、リンカーを介している。いくつかの実施形態では、リンカーは、本明細書に記載される任意の可動性または剛性リンカーを含み得る連結ペプチド(LP)であるが、概して、CRBRまたは領域を連結するペプチドは、切断可能なリンカーではない。

## 【0310】

いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、CRBRとFc領域との間の連結ペプチド(LP)を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3結合領域とCRBRとの間の連結ペプチド(LP)を含む。

## 【0311】

## 3. NK 動員

いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、本明細書に提供される少なく

とも1つのPD-1 VHHドメイン、およびナチュラルキラー（NK）細胞上に発現されるか、またはNK細胞を動員する表面分子に結合することが可能な少なくとも1つの追加の結合分子であるか、またはこれらを含む、二重特異性構築物である。特定の態様では、多重特異性構築物は、PD-1およびNK細胞表面分子に対して二重特異性である。いくつかの実施形態では、表面分子は、CD16（Fc RII）である。具体的には、提供される二重特異性PD-1結合ポリペプチドは、ヒトCD16aなどのヒトNK細胞上に発現されるNK活性化受容体に特異的に結合することが可能である。

#### 【0312】

CD16は、抗体依存性細胞傷害性（ADCC）に関与することが既知であるいくつかのIgGのFc部分に対する低親和性受容体であり、NK細胞による標的細胞溶解を引き起こすことに関与する、最もよく特徴がわかっている膜受容体である（Mandelboim et al., 1999, PNAS 96:5640-5644）。概して、ヒトNK細胞の大多数（約90%）は、低密度のCD56（CD56dim）および高レベルのFc RII（CD16）を発現する（Cooper et al., 2001, Trends Immunol. 22:633-640）。ヒトFc RIIは、それらの細胞外免疫グロブリン結合領域において96%の配列同一性を共有する2つのアイソフォーム、CD16a（Fc RIIA）およびCD16b（Fc RIIIB）として存在する（van de Winkel and Capel, 1993, Immunol. Today 14(5):215-221）。特定の実施形態では、追加の結合分子は、CD16aに特異的に結合することが可能である。

#### 【0313】

CD16aは、マクロファージ、マスト細胞、およびNK細胞上で膜貫通受容体として発現される。NK細胞上でCD16aのアルファ鎖は、シグナル伝達を媒介するために、Fc RII鎖および/またはT-細胞受容体（TCR）/CD3鎖を含有する免疫受容体チロシン系活性化モチーフ（ITAM）と会合する（Wirthmueller et al., 1992, J. Exp. Med. 175:1381-1390）。鎖および鎖のホモ二量体およびヘテロ二量体の異なる組み合わせとCD16aとの相互作用が、NK細胞において観察されており、NK細胞におけるCD16a複合体の変異を介した異なるシグナル伝達経路を介して、シグナル伝達を媒介する能力を示す（Anderson et al., 1990, PNAS 87(6):2274-2278、Ackersly et al., 1992, Int. J. Cancer Suppl. 7:11-14）。Fc R発現エフェクター細胞は、ADCCを介した腫瘍細胞の破壊に関与することが示されている。例えば、CD16aに特異的に結合することが可能なアゴニスト結合分子などとのCD16aの関与は、CD16aを発現するNK細胞の活性化をもたらし、それによって生物学的応答、特にシグナル伝達応答を引き起こすことができる。場合によっては、結合分子は、抗体依存性細胞傷害性（ADCC）と類似した様式で、そのような細胞への結合によって細胞死滅を引き起こすことが可能である。

#### 【0314】

特定の実施例では、PD-1結合ポリペプチドは、PD-1およびCD16aに特異的に結合することができる二重特異性分子を含み、抗原を有する細胞がNK細胞媒介性細胞死滅を介して根絶され得るように、NK細胞をそのような抗原を有する細胞に標的化し得る。例えば、腫瘍細胞上に発現されるPD-1に特異的に結合する結合分子は、NK細胞を腫瘍細胞に標的化し得る。場合によっては、CD16aに結合する結合分子によって引き起こされるNK細胞の活性化は、腫瘍細胞の死滅をもたらし得る。

#### 【0315】

いくつかの実施形態では、CD16aなどの活性化NK細胞受容体に特異的な追加の結合ドメインは、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fv断片、scFv、ジスルフィド安定化Fv断片（dsFv）、scAb、dAb、単ドメイン重鎖抗体（VHH）、または単ドメイン軽鎖抗体から選択される抗原結合断片である。いくつかの実施形態では、追加の結合ドメインは、CD16aなどの活性化T NK細胞受容体に結合することに対し

て一価である。

【0316】

場合によっては、追加の結合ドメインは、CD16aを認識する。いくつかの実施形態では、抗CD16a結合ドメインは、抗CD16a Fab断片、抗CD16a F(ab')<sub>2</sub>断片、抗CD16a Fv断片、抗CD16a scFv、抗CD16a dsFv、抗CD16a scAb、抗CD16a dAb、抗CD16a単ドメイン重鎖抗体(VHH)、および抗CD16a単ドメイン軽鎖抗体の1つ以上のコピーを含む。いくつかの実施形態では、抗CD16a結合ドメインは、CD16aに結合することに対して一価である。いくつかの実施形態では、BH73結合ポリペプチドは、BH73に結合し、CD16aの活性をアゴナイズする二重特異性構築物である。

10

【0317】

CD16aに特異的な抗体およびその抗原結合断片は既知であり、例えば、NM3E2を含む(McCall et al. (1999) Mol. Immunol., 36:433-045)。他の抗CD16a抗体も、本明細書に提供される構築物で使用され得、公開された米国特許出願第US1016/0280795号、米国特許第9,701,750号、Behar et al. (2008) Protein Eng Des Sel. 21:1-10、Arndt et al., (1999) Blood 94:2562-2568に記載されるいずれかを含む。特定の実施例では、抗CD16aは、抗CD16a scFvである。いくつかの実施形態では、抗CD16aは、TandAb分子に含まれる抗CD16a抗体である(例えば、Reush et al. (2014) Mabs, 6:727-738を参照)。いくつかの態様では、抗CD16aは、米国特許第9,035,026号に記載される抗CD16aまたはscFvなどの抗原結合断片である。

20

【0318】

提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つのPD-1 VHHドメインと、CD16a結合ドメインなどの活性化NK細胞受容体に特異的な少なくとも1つの追加のドメインとを含有する、多数のフォーマットのいずれかでフォーマットされ得る。

【0319】

一実施形態では、二重特異性構築物は、抗CD16a Fabなどの、NK細胞活性化受容体、例えばCD16aに特異的なFab抗原結合断片に直接または間接的に連結された、記載される少なくとも1つのPD-1 VHHドメインを含有する、二重特異性単ドメイン抗体連結Fab(S-Fab)である。いくつかの実施形態では、PD-1 VHHドメインは、抗CD16a FabのVH鎖またはVL鎖のC末端に連結される。いくつかの実施形態では、S-Fabは、ポリエチレングリコール(PEG)、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド(HPMA)コポリマー、タンパク質(アルブミンなど)、ポリグルタミン酸、またはPASylationとのコンジュゲーションなどによってさらに修飾され得る(Pan et al. (2018) International Journal of Nanomedicine, 2018:3189-3201)。

30

【0320】

別の実施形態では、二重特異性構築物は、その構築物が、NK細胞活性化受容体、例えば、CD16aに特異的な抗原結合ドメインのVHおよびVLを含有するscFvに直接または間接的に連結された、記載される少なくとも1つのPD-1 VHHを含有する、scFv-単ドメイン抗体である。NK細胞活性化受容体に対するscFv、例えば、抗CD16a scFvは、記載されるVH配列およびVL配列のいずれかを含有し得る。いくつかの実施形態では、VHHドメインおよびscFvは、ペプチドリンカーなどのリンカーによって接続される。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーは、本明細書に記載されるペプチドリンカーであり得る。いくつかの実施形態では、VHHドメインおよびscFvは各々、任意選択的にヒンジ領域またはリンカー(例えば、ペプチドリンカー)を介して、Fc領域のN末端などのFc領域に接続される。Fc領域は、ヒトFc領域またはそのバリエーション、例えば、ヒトIgG1 Fc領域またはそのバリエーションなど、本明細書に記載されるいずれかであり得る。特定の実施例では、Fc領域は、異なるポリ

40

50

ペプチドが二量体化されてヘテロ二量体をもたらすことができるヘテロ二量体化を促進するように変異または修飾される、バリエーションFcドメイン、例えば、バリエーションヒトIgG1ドメインによって形成される。

#### 【0321】

さらなる実施形態では、NK細胞活性化受容体、例えば、CD16aに特異的な抗原結合ドメインは、CD16aに特異的に結合するVHHドメインなどの単一ドメイン抗体である。CD16aに結合するVHHドメインを含む単一ドメイン抗体は既知であり、例えば、公開された米国特許出願第US2016/0280795号を参照されたい。そのような態様では、本明細書に提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つのPD-1 VHHドメインと少なくとも1つのCD16a VHHドメインとを含み得る。構築物をフォーマットするために、場合によっては、各VHHドメインは、任意選択的にヒンジ領域またはリンカー（例えば、ペプチドリリンカー）を介して、Fc領域のN末端などのFc領域に接続される。Fc領域は、ヒトFc領域またはそのバリエーション、例えば、ヒトIgG1 Fc領域またはそのバリエーションなど、本明細書に記載されるいずれかであり得る。特定の実施例では、Fc領域は、異なるポリペプチドが二量体化されてヘテロ二量体をもたらすことができるヘテロ二量体化を促進するように変異または修飾される、バリエーションFcドメイン、例えば、バリエーションヒトIgG1ドメインによって形成される。

#### 【0322】

上記の実施形態では、ヘテロ二量体化を促進するためのFc領域の例示的な修飾は既知であり、例えば、以下の表1に記載されるいずれかを含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、配列番号103、107、115、または117のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの他方のFcポリペプチドは、配列番号104、108、111、113、119、または121のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含有する。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、配列番号105、109、116、または118のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの他方のFcポリペプチドは、配列番号106、110、112、114、120、または122のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含む。

#### 【0323】

#### 4. サイトカイン融合体および/またはサイトカイン受容体標的化

いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、サイトカイン-抗体融合タンパク質（PD-1 VHH-サイトカイン融合体とも呼ばれる）である、多重特異性ポリペプチド構築物である。いくつかの態様では、本明細書に提供される少なくとも1つのPD-1 VHHドメインは、インターフェロンなどの少なくとも1つのサイトカインに直接または間接的に連結される。特定の実施形態では、サイトカインは、抗増殖活性、アポトーシス活性、および/または抗ウイルス活性を示すことが可能なインターフェロンである。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1 VHH-サイトカイン融合体の界面は、IFNAR1および/または2から構成される受容体に結合することが可能である。様々なアッセイのいずれかを使用して、IFNAR1および/または2への結合、癌細胞の成長速度および/もしくは増殖速度の低減もしくは減少、腫瘍サイズの縮小、腫瘍の排除、または癌細胞の死の誘発（例えば、アポトーシスを介した）に対するそのような融合タンパク質の効果を評価することができる。そのようなアッセイには、PD-1を発現することが既知の様々な癌細胞株を用いたインビトロアッセイ、または動物腫瘍モデルを採用したインビボアッセイが含まれる。

#### 【0324】

いくつかの実施形態では、インターフェロンは、ヒトI型インターフェロンまたはそのバリエーションなどのI型インターフェロンである。いくつかの態様では、ヒトI型インターフェロンは、切断型ヒトI型インターフェロンまたはヒト変異型I型インターフェロンであるバリエーションである。いくつかの実施形態では、I型インターフェロンまたはそのバリエーションは、野生型ヒトIFN-アルファ（IFN-アルファ、アルファ2、およびアルファ

10

20

30

40

50

ア14などの天然高親和性バリエーション)、インターフェロンベータ(IFN-ベータ)、ならびにその変異体および/またはその切断型である。いくつかの実施形態では、インターフェロンは、ヒトII型インターフェロンまたはそのバリエーションなどのII型インターフェロンである。いくつかの態様では、ヒトII型インターフェロンは、切断型ヒトII型インターフェロンまたはヒト変異型II型インターフェロンであるバリエーションである。いくつかの実施形態では、II型インターフェロンまたはそのバリエーションは、野生型ヒトインターフェロンガンマ(IFN-ガンマ)、ならびに変異体および/またはその切断型である。いくつかの実施形態では、提供されるサイトカイン-抗体融合タンパク質を使用して、PD-1を発現または過剰発現する標的細胞(例えば、癌細胞)の成長および/または増殖を阻害することができる。

10

## 【0325】

いくつかの実施形態では、PD-1 VHH-サイトカイン融合タンパク質は、国際PCT公開出願第WO2014/194100号、米国特許第9,803,021号、Valledkarimi et al.(2017) Biomed Pharmacother., 95:731-742、またはYoung et al.(2014) Semin Oncol., 41:623-636に記載されるいずれかとフォーマットが類似している。

## 【0326】

特定の実施形態では、インターフェロン、例えば、ヒトI型インターフェロンなどのI型インターフェロン(例えば、IFN-アルファ、IFN-ベータ、またはIFN-ガンマ)は、天然もしくは野生型インターフェロンの内因性結合親和性および/または活性を、好ましくは少なくとも60%、もしくは少なくとも約80%、例えば、少なくとも90%、95%、98%、99%、100%のレベル、または天然野生型インターフェロン(その単離形態の)よりも大きいレベルで有するものである。

20

## 【0327】

インターフェロンおよびインターフェロン変異体は、サイトカインの周知の、特徴がはっきりした群である(例えば、WO2002/095067、WO2002/079249、WO2002/101048、WO2002/095067、WO2002/083733、WO2002/086156、WO2002/083733、WO2003/000896、WO2002/101048、WO2002/079249、WO2003/000896、WO2004/022593、WO2004/022747、WO2003/023032、WO2004/022593、およびKim et al.(2003) Cancer Lett. 189(2):183-188、Hussain et al.(2000) J. Interferon Cytokine Res. 20(9):763-768、Hussain et al.(1998) J. Interferon Cytokine Res. 18(7):469-477、Nyman et al.(1988) Biochem. J. 329(Pt 2):295-302、Golovleva et al.(1997) J. Interferon Cytokine Res. 17(10):637-645、Hussain et al.(1997) J. Interferon Cytokine Res. 17(9):559-566、Golovleva et al.(1997) Hum. Hered. 47(4):185-188、Kita et al.(1991) J. Interferon Cytokine Res. 17(3):135-140、Golovleva et al.(1996) Am. J. Hum. Genet. 59(3):570-578、Hussain et al.(1996) J. Interferon Cytokine Res. 16(7):523-529、Linge et al.(1995) Biochim Biophys Actaを参照)。そのようなもののいずれも、提供されるサイトカイン-抗体融合タンパク質で使用され得る。

30

40

## 【0328】

いくつかの実施形態では、インターフェロンは、ヒトI型インターフェロンである。遺伝子/タンパク質のヒトインターフェロンファミリーの対立遺伝子が既知であり、例えば

50

、 Pestka (10983) Arch Biochem Biophys., 221: 1-37、 Diaz et al. (1994) Genomics, 22: 540-52、 Pestka (1986) Meth. Enzymol., 199: 3-4、 および Krause et al. (2000) J. Biol. Chem., 275: 22995-3004 を参照されたい。

【0329】

いくつかの実施形態では、インターフェロンは、完全長IFN-アルファ（例えば、ヒトIFN-アルファ）、完全長IFN-ベータ（例えば、ヒトIFN-ベータ）、または完全長IFN-ガンマ（例えば、ヒトIFN-ガンマ）である。いくつかの実施形態では、インターフェロンは、生物学的に活性な切断型IFN-アルファ（例えば、ヒトIFN-アルファ）、生物学的に活性な切断型IFN-ベータ（例えば、ヒトIFN-ベータ）、または生物学的に活性な切断型IFN-ガンマ（例えば、ヒトIFN-ガンマ）である。いくつかの実施形態では、生物学的に活性な切断型インターフェロンは、N末端および/またはC末端で切断された野生型または天然インターフェロンのアミノ酸の連続配列を含有し、天然または野生型インターフェロンの長さの少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、またはそれ以上の長さを含む。インターフェロンの生物学的活性を評価するための様々な標準アッセイのいずれかが使用され得る。例えば、IFN-アルファ活性は、特定の試験ウイルスに対する抗ウイルス活性を測定することによって分析され得る。IFN-アルファ活性を分析するためのキットは、市販されている（例えば、Neutekbio, IrelandによるILITE（商標）アルファベータキットを参照）。いくつかの態様では、IFN-アルファは、IFN-a2a（例えば、アクセッション番号CAA23805）、IFN-a-c（アクセッション番号P01566）、IFN-a-d（アクセッション番号AAB59403）、IFNa-5（アクセッション番号CAA26702）、IFNa-6（アクセッション番号AA26704）、IFNa-4（アクセッション番号NP\_\_066546）、IFNa-4b（アクセッション番号CAA26701）、IFNa-I（アクセッション番号AAA52725）、IFNa-J（アクセッション番号CAA23792）、IFNa-H（アクセッション番号CAA23794）、IFNa-F（アクセッション番号AAA52718）、IFNa-7（アクセッション番号CAA26903）、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様では、IFN-ベータは、アクセッション番号AAC41702に記載されるIFN-ベータ、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの態様では、IFN-ガンマは、アクセッション番号P01579に記載されるIFN-ガンマ、またはその生物学的に活性な断片である。

【0330】

いくつかの実施形態では、バリエーションまたは変異インターフェロンアルファ2（IFNa2）を含有する、提供されるPD-1 VHH-サイトカイン融合体が企図される。特定の変異体には、57位のHis、および/または58位のE、および/または61位のQの変異が含まれる。特定の実施形態では、変異体は、変異H57Y、および/またはE58N、および/またはQ61Sを含む。特定の実施形態では、変異体は、変異H57Y、E58N、およびQ61S（YNS）を有する変異IFNa2を含む（例えば、Kalie et al. (2007) J. Biol. Chem., 282: 11602-11611を参照）。他の実施形態では、変異体は、57位のHis、および/または58位のE、および/または61位のQからA（アラニン）への変異を含む。特定の実施形態では、変異体は、変異H57A、E58A、およびQ61A（HEQ）を有する変異IFNa2を含む（例えば、Jaitin et al. (2006) Mol. Cellular Biol., 26(5): 1888-1897を参照）。特定の実施形態では、変異インターフェロンは、57位のHisからA、Y、もしくはMへの変異、および/または58位のEからA、もしくはN、もしくはD、もしくはLへの変異、および/または61位のQからA、もしくはS、もしくはL、もしくはDへの変異を含む。特定の実施形態では、変異体は、R145からV、I、もしくはL、および/またはA146からNもしくはS、

および/またはM149からYに対応するアミノ酸の置き換えを有するバリエーション、例えば、R145V/A146N/M149Y、R145I/A146S/M149Y、またはR145L/A146S/M149Yなど、インターフェロンアルファ8 (IFN- $\alpha$ 8)の変異体を含む(例えば、Yamamoto et al., (2009) J. Interferon & cytokine Res, 29:161-170を参照)。

【0331】

いくつかの実施形態では、提供されるPD-1 VHH-サイトカイン融合体は、アミノ酸17で天然システインに対して置換されたセリンを含有する変異またはバリエーションIFN- $\beta$ を含有する(例えば、Hawkins et al., (1985) Cancer Res., 45, 5914-5920を参照)。

10

【0332】

いくつかの実施形態では、提供されるPD-1 VHH-サイトカイン融合体は、切断型インターフェロンを含有する。一実施形態では、切断型インターフェロンは、最大で最初の15個のアミノ末端のアミノ酸残基、および/または最大で最後の10~13個のカルボキシル末端のアミノ酸残基の欠失を有するヒトIFN- $\alpha$ を含み、これは、天然または野生型ヒトIFN- $\alpha$ の活性を保持することが示されている(例えば、Ackerman (1984) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:1045-1047を参照)。いくつかの実施形態では、切断型ヒトIFN- $\alpha$ は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、もしくは13個のカルボキシル末端のアミノ酸残基が欠失しており、かつ/または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15個のアミノ末端のアミノ酸残基が欠失している。

20

【0333】

いくつかの実施形態では、提供されるPD-1 VHH-サイトカイン融合体は、公開された米国特許出願 第US2009/0025106号に記載されるような切断型インターフェロンを含有する。いくつかの実施形態では、提供されるPD-1 VHH-サイトカイン融合体は、Lundell et al., (1991) Protein Neg., 4:335-341、Pan et al., (1987) Eur. J. Biochem., 166:145-149に記載されるような、Nおよび/またはC末端欠失を含有する切断型IFN- $\gamma$ を含有する。

30

【0334】

いくつかの実施形態では、インターフェロン、例えば、ヒトインターフェロンは、修飾されていない典型的には野生型のタンパク質と比較して、タンパク質分解に耐性がある変異インターフェロンであり、例えば、米国特許第7,998,469号、米国特許第8,052,964号、米国特許第4,832,959号、米国特許第6,120,762号、WO1992/008737、およびEP219781を参照されたい。

【0335】

提供されるPD-1 VHH-サイトカイン融合タンパク質の態様では、抗体およびサイトカイン、例えば、インターフェロンは、直接結合されるか、またはペプチドリンカーなどのリンカーを介して間接的に結合される。結合は、結合がPD-1への抗体の結合を干渉しない限り、VHHドメインのN末端またはC末端に対するものであり得る。本明細書に記載される任意のリンカー、例えばペプチドリンカーが使用され得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、GGSGGS、すなわち、(GGG)<sub>2</sub>(配列番号1)、GGSGGSGGS、すなわち、(GGG)<sub>3</sub>(配列番号2)、GGSGGSGGSGGS、すなわち、(GGG)<sub>4</sub>(配列番号3)、およびGGSGGSGGSGGSGGS、すなわち、(GGG)<sub>5</sub>(配列番号4)からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むGSリンカーである。いくつかの実施形態では、リンカーは、非限定的な例として、GG、GGG、GGGG(配列番号5)、GGGGG(配列番号6)、およびGGGGGG(配列番号7)などのグリシン残基を含む可動性リンカーである。いくつかの実施形態では、融合タンパク質は、GSリンカーとグリシンリンカーとの組み合わせを含むことができる。

40

50

## 【0336】

## D. 操作された細胞

本明細書に記載される提供されるPD-1結合分子のいずれかを発現する操作された細胞が、本明細書に提供される。特定の実施形態では、提供されるPD-1結合分子は、細胞から分泌される。いくつかの実施形態では、例えば、本明細書に提供される抗PD-1VHHドメインを含有するPD-1結合分子は、シグナルペプチド、例えば、抗体シグナルペプチド、または細胞外にドメインを得るための他の効率的なシグナル配列を含む。PD-1結合分子がシグナルペプチドを含み、操作された細胞によって発現される場合、シグナルペプチドは、免疫調節タンパク質を操作された細胞によって分泌させる。概して、シグナルペプチド、またはシグナルペプチドの一部は、分泌を伴う結合分子から切断される。PD-1結合分子は、核酸（発現ベクターの一部であり得る）によってコードされ得る。いくつかの実施形態では、PD-1結合分子は、細胞（免疫細胞、例えば、初代免疫細胞など）によって発現および分泌される。

10

## 【0337】

いくつかの実施形態では、提供される操作された細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)をさらに含有する。CARは、典型的には、単一融合分子中の1つ以上のシグナル伝達ドメインと会合し、かつT細胞などの細胞の表面上に発現される、細胞外標的化/結合部分を含有する合成受容体である。したがって、CARは、単一融合分子中で抗原特異性とT細胞活性化特性とを組み合わせる。第1世代CARは、典型的には、CD3ゼータまたはFcγR受容体鎖の細胞質領域をそれらのシグナル伝達ドメインとして含んだ。第1世代CARは、卵巣癌、腎癌、リンパ腫、および神経芽腫を有する患者において第I相臨床試験で試験されており、それらはわずかな応答を誘発した(Sadelain et al., Curr Opin Immunol, 21(2): 215-223, 2009で考察されている)。CD28およびCD3ゼータなどの共刺激分子のシグナル伝達ドメインを含有する第2世代CARは、活性化シグナルと共刺激シグナルとの組み合わせを方向付けるための二重シグナル伝達を提供する。第3世代CARは、3つ以上のシグナル伝達ドメインを有してより複雑である(Sadelain et al., Cancer Discovery(3), 388-398, 2013、およびDotti et al., Immunol Rev, 257(1), 1-36, 2014で考察されている)。

20

## 【0338】

いくつかの実施形態では、CARは、腫瘍抗原に特異的な1つ以上の抗原結合ドメインを含む細胞外ドメインを含有する。いくつかの態様では、TAAに特異的な腫瘍抗原および/または抗原結合ドメインは、本明細書に記載されるいずれかであり得る。CAR構築物は、1つ以上の細胞外抗原結合ドメインを含有する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達領域を含む。場合によっては、細胞外抗原結合ドメインは、scFvまたは単一ドメイン抗体(VHH)である。概して、CARの抗原結合ユニットを形成する細胞外抗原結合ドメインは、CARが標的抗原を発現する細胞または組織を標的とする療法において有用であるように、十分な親和性を有する標的抗原に「結合する」、または「結合することが可能である」、すなわち、それを標的とする。

30

## 【0339】

CARの膜貫通ドメインは、典型的には細胞膜を横断するか、または細胞膜を横断するもしくは細胞膜に及ぶことが可能であり、細胞外抗原結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含有する内質部分に直接または間接的に(例えば、免疫グロブリンヒンジ配列などのスペーサーを介して)接続される、ドメインである。一実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、膜貫通タンパク質(例えば、I型膜貫通タンパク質)、人工疎水性配列、またはそれらの組み合わせの膜貫通領域である。一実施形態では、膜貫通ドメインは、CD3ゼータドメインまたはCD28膜貫通ドメインを含む。他の膜貫通ドメインが当業者に明らかになり、本明細書に提供されるCARの実施形態に関連して使用され得る。

40

## 【0340】

本明細書に提供されるCARの細胞内シグナル伝達領域は、例えば、結合抗原上のなど

50

、CARの抗原結合ドメインの関与時に、T細胞にシグナルを伝達する1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。いくつかの実施形態では、細胞内領域は、ITAMシグナル伝達ドメインであるか、またはそれを含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。例示的な細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、T細胞受容体複合体の鎖またはその相同体（例えば、鎖、Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$ および鎖、MB1(Ig $\alpha$ )鎖、B29(Ig)鎖など)、ヒトCD3ゼータ鎖、CD3ポリペプチド(、、および)、sykファミリーチロシンキナーゼ(Syk、ZAP70など)、srcファミリーチロシンキナーゼ(Lck、Fyn、Lynなど)、ならびにCD2、CD5、OX40、およびCD28などの、T細胞形質導入に関与する他の分子に由来するシグナル伝達ドメインが挙げられる。特定の実施形態では、細胞内シグナル伝達領域は、ヒトCD3ゼータ鎖に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。

10

#### 【0341】

いくつかの実施形態では、エンドドメインは、CD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD3-ゼータシグナル伝達ドメインは、配列番号236に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号236と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、T細胞シグナル伝達の活性を保持する。

#### 【0342】

いくつかの実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達領域は、共刺激分子に由来する細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含有することができる。そのような実施例では、そのようなシグナル伝達ドメインは、例えば、ITAM含有シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3ゼータのみを含有するCARと比較して、抗原特異的関与後のメモリー細胞の増殖、生存、および/または発生などを介して、CAR-T細胞活性を強化し得る。いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、以下から選択されるタンパク質から得られた機能的シグナル伝達ドメインである：CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、またはそれらの組み合わせ。特定の実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、ヒトタンパク質に由来するか、またはそれから得られる。いくつかの態様では、共刺激シグナル伝達ドメインは、ヒトCD28またはヒトCD137(4-1BB)に由来するか、またはそれから得られる。

20

30

#### 【0343】

いくつかの実施形態では、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28または4-1BBに由来し、配列番号237~240のいずれかに記載されるアミノ酸の配列、または配列番号237~240と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、T細胞共刺激シグナル伝達の活性を保持する。

#### 【0344】

特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとを接続するヒンジまたはスペーサー領域をさらに含む。このヒンジまたはスペーサー領域は、結果として生じるCARの異なる長さおよび可動性を達成するために使用され得る。使用され得るヒンジまたはスペーサー領域の例としては、抗体のFc断片、またはその断片もしくは誘導体、抗体のヒンジ領域またはその断片もしくは誘導体、抗体のCH2領域、抗体のCH3領域、人工スペーサー配列、例えば、ペプチド配列、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。他のヒンジまたはスペーサー領域は、当業者に明らかになり、使用され得る。一実施形態では、ヒンジは、IgG4ヒンジまたはCD8Aヒンジである。

40

#### 【0345】

いくつかの実施形態では、スペーサーおよび膜貫通ドメインは、配列番号241~24

50

3に記載される例示的な配列、または配列番号241~243と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列を有するような、CD8由来のヒンジおよび膜貫通ドメインである。

#### 【0346】

本明細書に提供されるPD-1結合分子をコードするポリヌクレオチドを含む単離核酸構築物も、本明細書に提供される。CARをコードし、本明細書に提供されるPD-1結合分子をコードするポリヌクレオチドを含む単離核酸構築物も、本明細書に提供される。いくつかでは、CARをコードする第1の核酸は、IRESまたはリボソームスキップ配列（例えば、T2AまたはP2A）などの2シストロン性の要素によってPD-1結合分子をコードする第2の核酸から分離される。いくつかの態様では、構築物は、細胞におけるPD-1結合分子および/またはCARの発現のための発現ベクターである。発現ベクターは、ウイルスベクターであってもよい。ウイルスベクター技術は、当該技術分野で周知であり、例えば、Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2013)に記載される。哺乳動物細胞への遺伝子導入のために、多数のウイルス系が開発されている。例えば、アデノウイルスベクターなどのレトロウイルスが使用される。一実施形態では、レンチウイルスベクターが使用される。

10

#### 【0347】

さらなる態様では、上記の1つ以上の核酸構築物を含む単離細胞または細胞集団も提供される。また、本明細書に提供されるPD-1結合分子および/またはCARを発現するように遺伝子組み換えされた単離細胞または細胞集団が提供される。したがって、本明細書に提供されるCARを安定的に発現するなど、CARを含む遺伝子操作された細胞が本明細書に提供される。一実施形態では、細胞は、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、制御性T細胞、造血幹細胞、および/または多能性胚性/誘導性幹細胞からなる群から選択される。場合によっては、細胞は、CD4および/またはCD8 T細胞などのT細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、対象に対して自己である。例えば、いくつかの実施形態では、T細胞は、例えば、CAR核酸構築物を用いたトランスフェクションまたは形質導入などの操作のために、患者から単離されてもよい(初代T細胞とも呼ばれる)。

20

#### 【0348】

例示的な例では、初代T細胞は、エクスピボで精製され(CD4細胞もしくはCD8細胞、または両方)、抗CD3/抗CD28被覆ビーズなどのTCR/CD28アゴニストで刺激され得る。2~3日間の活性化プロセスの後、CARをコードする組み換え発現ベクターは、標準的なレンチウイルスもしくはレトロウイルスの形質導入プロトコル、またはプラスミドエレクトロポレーション法を介して、初代T細胞に安定的に導入され得る。細胞は、例えば、抗エピトープタグ、または天然親分子と交差反応する抗体を使用したフローサイトメトリーによって、PD-1結合分子の分泌および/またはCAR発現について監視され得る。CARを発現するT細胞は、抗エピトープタグ抗体を用いたソーティングを介して濃縮され得るか、または用途に応じて高発現もしくは低発現のために濃縮され得る。

30

40

#### 【0349】

PD-1結合分子および/またはCAR操作されたT細胞は、様々な手段によって適切な機能について分析され得る。場合によっては、インビトロ細胞傷害性、増殖、またはサイトカインアッセイ(例えば、IFN-ガンマ発現)を使用して、操作されたT細胞の機能を評価することができる。例示的な標準エンドポイントは、腫瘍系統の溶解率、操作されたT細胞の増殖、または培養上清におけるIFN-ガンマタンパク質発現である。場合によっては、例えば抗原を介してCARの刺激時にT細胞の活性化を刺激する能力は、CD69、CD44、もしくはCD62Lなどの活性化マーカーの発現、増殖、および/ま

50

たはサイトカイン産生を監視することなどによって評価され得る。

【0350】

また、本明細書に提供される操作された細胞を対象に投与することを含む、癌などの対象における疾患または状態の予防および/または治療のための方法が本明細書に提供される。概して、対象は、その疾患または状態の治療、薬学的に活性な量の細胞および/または本発明の医薬組成物を必要とする。

【0351】

IV. ポリペプチドの発現および産生

提供される s d A b および P D - 1 結合ポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子が提供される。いくつかの実施形態では、提供される核酸配列、特に DNA 配列は、本明細書に提供される融合タンパク質をコードする。上記の実施形態のいずれかにおいて、核酸分子はまた、P D - 1 結合ポリペプチドの分泌を誘導するリーダー配列をコードしてもよく、そのリーダー配列は典型的には、分泌ポリペプチド中に存在しないように切断される。リーダー配列は、天然重鎖（または V H H ）リーダー配列であってもよいが、または別の異種リーダー配列であってもよい。

【0352】

核酸分子は、当該技術分野で従来的な組み換え DNA 技術を使用して構築され得る。いくつかの実施形態では、核酸分子は、選択された宿主細胞における発現に好適な発現ベクターである。

【0353】

本明細書に記載される P D - 1 結合ポリペプチドをコードする核酸を含むベクターが提供される。そのようなベクターとしては、DNA ベクター、ファージベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ベクターは、CHO 細胞もしくは CHO 由来細胞などの所望の細胞型における、または NSO 細胞におけるポリペプチドの発現に最適化されたものから選択される。例示的なそのようなベクターは、例えば、Running Deer et al., Biotechnol. Prog. 20: 880 - 889 (2004) に記載されている。

【0354】

特に、融合タンパク質などの所望の P D - 1 結合ポリペプチドをコードする DNA ベクターを使用して、本明細書に記載される P D - 1 結合ポリペプチドを調製する方法を容易にし、有意量を得ることができる。DNA 配列は、適切な発現ベクター、すなわち、挿入されたタンパク質コード配列の転写および翻訳に必要な要素を含有するベクターに挿入され得る。様々な宿主 - ベクター系を利用して、タンパク質コード配列を発現し得る。これらには、ウイルスに感染した哺乳動物細胞系（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルスなど）、ウイルスに感染した昆虫細胞系（例えば、バキュロウイルス）、酵母ベクターを含有する酵母などの微生物、またはバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA、もしくはコスミド DNA で形質転換された細菌が含まれる。利用される宿主 - ベクター系に応じて、多数の好適な転写および翻訳要素のいずれか 1 つが使用され得る。

【0355】

本開示はまた、ポリペプチドの発現をもたらす条件下で細胞を培養することによって、P D - 1 結合ポリペプチドを産生する方法を提供し、細胞は、本明細書に記載される P D - 1 結合ポリペプチドをコードする単離核酸分子、および/またはこれらの単離された核酸配列を含むベクターを含む。

【0356】

いくつかの実施形態では、P D - 1 結合ポリペプチドは、細菌細胞などの原核細胞において、または真菌細胞（酵母など）、植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞などの真核細胞において発現され得る。そのような発現は、例えば、当該技術分野で既知の手順に従って実施され得る。ポリペプチドを発現するために使用され得る例示的な真核細胞としては、COS 7 細胞を含む COS 細胞、293 - 6 E 細胞を含む 293 細胞、CHO - S

10

20

30

40

50

、D G 4 4、L e c 1 3 C H O細胞、およびF U T 8 C H O細胞を含むC H O細胞、P E R . C 6 (登録商標)細胞(C r u c e l l)、ならびにN S O細胞が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、P D - 1結合ポリペプチドは、酵母において発現され得る。例えば、米国公開第U S 2 0 0 6 / 0 2 7 0 0 4 5 ( A 1 )号を参照されたい。いくつかの実施形態では、特定の真核宿主細胞は、ポリペプチドに所望の翻訳後修飾を行うその能力に基づいて選択される。例えば、いくつかの実施形態では、C H O細胞は、2 9 3細胞で産生されるのと同じポリペプチドよりも高いレベルのシアル化を有するポリペプチドを産生する。

【0357】

所望の宿主細胞への1つ以上の核酸(ベクターなど)の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E - デキストラン媒介性トランスフェクション、カチオン性脂質媒介性トランスフェクション、電気穿孔、形質導入、感染などを含むが、これらに限定されない任意の方法によって達成され得る。非限定的な例示的な方法は、例えば、S a m b r o o k e t a l . , M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l , 3<sup>rd</sup> e d . C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s ( 2 0 0 1 ) に記載されている。核酸は、任意の好適な方法に従って、所望の宿主細胞において一過性にまたは安定的にトランスフェクトされ得る。

10

【0358】

本明細書に記載される核酸またはベクターのいずれかを含む宿主細胞も提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるP D - 1結合ポリペプチドを発現する宿主細胞が提供される。宿主細胞において発現されたP D - 1結合ポリペプチドは、任意の好適な方法によって精製され得る。そのような方法としては、親和性マトリックスまたは疎水性相互作用クロマトグラフィーの使用が挙げられるが、これらに限定されない。好適な親和性リガンドには、R O R 1 E C D、およびF c領域に結合する薬剤が含まれる。例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、または抗体親和性カラムを使用して、F c領域を結合し、F c領域を含むP D - 1結合ポリペプチドを精製してもよい。疎水性相互作用クロマトグラフィー、例えば、ブチルまたはフェニルカラムも、抗体などの一部のポリペプチドを精製するのに好適であり得る。イオン交換クロマトグラフィー(例えば、アニオン交換クロマトグラフィーおよび/またはカチオン交換クロマトグラフィー)もまた、抗体などの一部のポリペプチドを精製するのに好適であり得る。混合モードクロマトグラフィー(例えば、逆相/アニオン交換、逆相/カチオン交換、親水性相互作用/アニオン交換、親水性相互作用/カチオン交換など)も、抗体などの一部のポリペプチドを精製するのに好適であり得る。ポリペプチドを精製する多くの方法は、当該技術分野で既知である。

20

30

【0359】

いくつかの実施形態では、P D - 1結合ポリペプチドは、無細胞系で産生される。非限定的な例示的な無細胞系は、例えば、S i t a r a m a n e t a l . , M e t h o d s M o l . B i o l . 4 9 8 : 2 2 9 - 4 4 ( 2 0 0 9 )、S p i r i n , T r e n d s B i o t e c h n o l . 2 2 : 5 3 8 - 4 5 ( 2 0 0 4 )、E n d o e t a l . , B i o t e c h n o l . A d v . 2 1 : 6 9 5 - 7 1 3 ( 2 0 0 3 ) に記載されている。

40

【0360】

いくつかの実施形態では、上記の方法によって調製されるP D - 1結合ポリペプチドが提供される。いくつかの実施形態では、P D - 1結合ポリペプチドは、宿主細胞で調製される。いくつかの実施形態では、P D - 1結合ポリペプチドは、無細胞系で調製される。いくつかの実施形態では、P D - 1結合ポリペプチドは、精製される。いくつかの実施形態では、P D - 1結合ポリペプチドを含む細胞培養培地が提供される。

【0361】

いくつかの実施形態では、上記の方法によって調製された抗体を含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、組成物は、宿主細胞で調製されたP D - 1結合ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、無細胞系で調製されたP D - 1結合ポリ

50

ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、精製されたPD-1結合ポリペプチドを含む。

#### 【0362】

##### V. 医薬組成物および製剤

本明細書に提供されるPD-1結合ポリペプチド、またはそれを発現する操作された細胞のいずれかを含有する医薬組成物が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質などのPD-1結合ポリペプチド（本明細書において「活性化化合物」とも称される）、およびその誘導體、断片、類似体、および相同体は、投与に好適な医薬組成物に組み込まれ得る。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1結合ポリペプチドを含有する、キメラ抗原受容体などのキメラ受容体を発現する操作された細胞は、投与に好適な医薬組成物に組み込まれ得る。

10

#### 【0363】

そのような組成物は、典型的には、薬学的に許容される担体を含有する。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、薬剤投与に適合する、あらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤、および抗真菌剤、等張剤、および吸収遅延剤などを含むことが意図される。好適な担体は、当該技術分野の標準的な参照テキストであるRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。そのような担体または希釈剤の好適な例としては、水、生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。リボソーム、および固定油などの非水性ビヒクルも使用され得る。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野で周知である。任意の従来媒体または薬剤が活性化化合物と適合不可能である場合を除き、組成物におけるその使用が企図される。補助的活性化化合物も組成物に組み込まれ得る。

20

#### 【0364】

本開示の医薬組成物は、その意図される投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例としては、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、腫瘍内、経口（例えば、吸入）、経皮（すなわち、局所）、経粘膜、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下への適用に使用される溶液または懸濁液には、以下の構成成分が含まれ得る：滅菌希釈剤、例えば、注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化物質、例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）；緩衝剤、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、またはリン酸塩、ならびに張性の調整のための薬剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロースなどが含まれ得る。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整され得る。非経口調製物は、ガラスもしくはプラスチックで作製されたアンプル、使い捨てシリンジ、または複数回投与バイアルに封入され得る。

30

#### 【0365】

注射用途に好適な医薬組成物には、滅菌水溶液（水溶性である）または分散液、および滅菌注射用溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。静脈内投与については、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、CREMOPHOR EL（商標）（BASF, Parsippany, N.J.）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が挙げられる。すべての場合において、組成物は、滅菌されなければならない、容易な注射可能性が存在する程度まで流体でなければならない。これは、製造および保管の条件下で安定していなければならない、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合に必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤

40

50

および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成され得る。多くの場合、等張剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましい。注射用組成物の長期間の吸収は、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなど、吸収を遅らせる薬剤を組成物中に含むことによってもたらされ得る。

【0366】

滅菌注射用溶液は、必要に応じて、上で列挙した成分の1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒中に活性化化合物を必要量で組み込み、その後ろろ過滅菌することによって調製され得る。概して、分散液は、塩基性分散媒体と上で列挙したものからの必要な他の成分とを含有する滅菌ビヒクル中に、活性化化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法は、活性成分の粉末、およびその以前に滅菌ろ過された溶液からの任意の追加の所望の成分をもたらず、真空乾燥および凍結乾燥である。

10

【0367】

経口組成物は概して、不活性希釈剤または食用担体を含む。これらは、ゼラチンカプセルに封入され得るか、または錠剤に圧縮され得る。経口治療的投与の目的のために、活性化化合物は、賦形剤と組み込まれ、錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で使用され得る。経口組成物はまた、マウスウォッシュとして使用するための流体担体を使用して調製され得、流体担体中の化合物は、経口的に適用され、うがいおよび吐き出しまたは嚥下される。薬学的に適合する結合剤、および/またはアジュバント材料は、組成物の一部として含まれ得る。錠剤、-pill、カプセル、トローチなどは、以下の成分、または類似の性質の化合物のいずれかを含有することができる：結合剤、例えば、微結晶セルロース、トラガカントガム、もしくはゼラチン；賦形剤、例えば、デンプンもしくはラクトース、崩壊剤、例えば、アルギン酸、Primogel、もしくはトウモロコシデンプン；潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムもしくはSterote；滑剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、例えば、スクロースもしくはサッカリン；または香味剤、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ香料。

20

【0368】

吸入による投与については、化合物は、好適な噴射剤、例えば、二酸化炭素などのガス含有する加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからのエアロゾルスプレーの形態で送達される。

30

【0369】

全身投与はまた、経粘膜的または経皮的手段によるものであり得る。経粘膜投与または経皮投与については、透過されるバリアに適切な浸透剤が製剤中で使用される。そのような浸透剤は、当該技術分野で一般的に知られており、例えば、経粘膜的投与のために、洗剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻腔スプレーまたは坐薬の使用によって達成され得る。経皮投与については、活性化化合物は、当該技術分野で一般的に既知の軟膏、膏薬、ゲル、またはクリームに製剤化される。

【0370】

化合物はまた、直腸送達のための坐薬（例えば、ココアバターおよび他のグリセリドなどの従来の坐薬基剤を用いた）、または停留浣腸の形態で調製され得る。

40

【0371】

一実施形態では、活性化化合物は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤などの、身体からの迅速な除去から化合物を保護する担体で調製される。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーが使用され得る。そのような製剤の調製方法は、当業者に明らかになるであろう。材料はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手され得る。リポソーム懸濁液はまた、薬学的に許容される担体としても使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるように、当業者に既

50

知の方法に従って調製され得る。

【0372】

投与の容易さおよび投与量の均一性のために、単位剤形で経口組成物または非経口組成物を製剤化することが特に有利である。本明細書で使用される場合、単位剤形は、治療される対象に対する単位投与量として好適な、物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要とされる薬学的担体に関連して所望の治療効果をもたらすよう計算された所定量の活性化化合物を含有する。本開示の単位剤形の仕様は、活性化化合物の特有の特徴、および達成される特定の治療効果、ならびに個体の治療のためのそのような活性化化合物を配合する技術分野に固有の限界によって決定され、かつそれらに直接依存する。

【0373】

医薬組成物は、投与についての説明書と一緒にキット、容器、パック、またはディスペンサーに含まれ得る。これらの医薬組成物は、使用説明書とともに診断キットに含まれ得る。

【0374】

医薬組成物は、特定の適応症の治療または予防に有効な量で投与される。治療有効量は、典型的には、治療されている対象の体重、その身体状態もしくは健康状態、治療される状態の広範さ、または治療されている対象の年齢に依存する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1用量当たり約50  $\mu\text{g} / \text{kg}$  体重 ~ 約50  $\text{mg} / \text{kg}$  体重の範囲の量で投与されてもよい。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1用量当たり約100  $\mu\text{g} / \text{kg}$  体重 ~ 約50  $\text{mg} / \text{kg}$  体重の範囲の量で投与されてもよい。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1用量当たり約100  $\mu\text{g} / \text{kg}$  体重 ~ 約20  $\text{mg} / \text{kg}$  体重の範囲の量で投与されてもよい。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1用量当たり約0.5  $\text{mg} / \text{kg}$  体重 ~ 約20  $\text{mg} / \text{kg}$  体重の範囲の量で投与されてもよい。

【0375】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1用量当たり約10  $\text{mg}$  ~ 約1,000  $\text{mg}$  の範囲の量で投与されてもよい。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1用量当たり約20  $\text{mg}$  ~ 約500  $\text{mg}$  の範囲の量で投与されてもよい。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1用量当たり約20  $\text{mg}$  ~ 約300  $\text{mg}$  の範囲の量で投与されてもよい。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、1用量当たり約20  $\text{mg}$  ~ 約200  $\text{mg}$  の範囲の量で投与されてもよい。

【0376】

医薬組成物は、必要に応じて対象に投与されてもよい。いくつかの実施形態では、有効用量の医薬組成物は、1回以上対象に投与される。様々な実施形態では、有効用量の医薬組成物は、月1回、月1回未満、例えば、2か月毎、3か月毎、または6か月毎など、対象に投与される。他の実施形態では、有効用量の医薬組成物は、月2回以上、例えば、2週間毎、毎週、週2回、週3回、毎日、または1日複数回など、投与される。有効用量の医薬組成物は、少なくとも1回対象に投与される。いくつかの実施形態では、有効用量の医薬組成物は、少なくとも1か月、少なくとも6か月、または少なくとも1年の期間にわたって複数回投与されてもよい。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、状態のうちの1つ以上の症状を軽減するために、必要に応じて対象に投与される。

【0377】

VI. 治療および使用方法

本明細書に記載されるPD-1結合ポリペプチドまたはそれを発現する操作された細胞は、様々な治療的、診断的、および予防的適応症において有用である。例えば、PD-1結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、対象における様々な疾患および障害の治療で有用である。そのような方法および使用には、例えば、腫瘍または癌などの疾患、状態、または障害を有する対象に、分子もしくは操作された細胞、またはそれを含有する組成物を投与することを伴う、治療方法および使用が含まれる。いくつかの実施形態では、分子または操作された細胞は、疾患または障害の治療をもたらすのに有効な量で投与される。使用には、そのような方法および治療における、ならびにそのような治療方法を実施する

10

20

30

40

50

ための薬剤の調製における、PD-1結合ポリペプチドまたは操作された細胞を含有する分子の使用が含まれる。いくつかの実施形態では、方法は、PD-1結合ポリペプチドもしくは操作された細胞、またはそれを含む組成物を、疾患または状態を有するか、または有する疑いがある対象に投与することによって実施される。いくつかの実施形態では、方法は、それによって対象における疾患または状態または障害を治療する。

【0378】

一実施形態では、本開示のPD-1結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、治療薬として使用され得る。そのような薬剤は、概して、対象における疾患または病理を診断、予測、監視、治療、軽減、および/または予防するために採用される。治療レジメンは、標準的な方法を使用して、障害に罹患している（または発症するリスクがある）対象、例えば、ヒト患者または他の哺乳動物を同定することによって実施される。場合によっては、PD-1を発現する腫瘍を有することが既知であるか、疑われているか、または同定されている対象が選択される。PD-1結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、対象に投与される。PD-1結合ポリペプチドまたは操作された細胞が対象に投与され、概して、標的（複数可）とのその結合による効果を有する。

10

【0379】

いくつかの実施形態では、提供されるPD-1ポリペプチド多重特異性ポリペプチド構築物または操作された細胞は、細胞におけるCD3および/もしくはCD3シグナルの関与によって、かつ/またはPD-1とPD-L1/PD-L2との相互作用を遮断することなどによって、対象に投与されたときに免疫応答を調節する、例えば、増加させることが可能である。いくつかの実施形態では、治療有効量の提供される多重特異性構築物もしくは操作された細胞、またはその医薬組成物を投与することによって、対象において免疫応答を調節する方法が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、免疫応答を調節する方法は、対象における免疫応答を増加させるか、または強化する。例えば、応答の増加または強化は、細胞媒介性免疫の増加であり得る。いくつかの実施例では、方法は、細胞溶解性T細胞（CTL）活性などのT細胞活性を増加させる。いくつかの実施形態では、調節された（例えば、増加した）免疫応答は、腫瘍または癌に対するものである。

20

【0380】

いくつかの実施形態では、PD-1-Fc融合タンパク質またはFc領域を含有する多重特異性構築物などのPD-1結合ポリペプチドの投与は、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域を通したFcRの関与を介して、自然免疫細胞を活性化し得る。そのような多重特異性ポリペプチド構築物の投与は、ADCC、サイトカイン放出、脱顆粒、および/またはADCPを含む、自然免疫細胞エフェクター機能をアゴナイズ、刺激、活性化、および/または増強し得る。拘束された多重特異性ポリペプチド構築物の場合、そのような多重特異性ポリペプチド構築物の投与は、第1および第2の構成成分を結合するリンカー（複数可）がプロテアーゼによって、および/または標的細胞（例えば、腫瘍細胞）上の腫瘍抗原の結合によって切断されると、T細胞を活性化し、それによって抗CD3結合部分がT細胞上のCD3に結合することを可能にし得る。場合によっては、多重特異性ポリペプチド構築物の投与は、CD3媒介性T細胞の活性化、細胞傷害性、サイトカイン放出、および/または増殖をアゴナイズ、刺激、活性化、および/または増強し得る。

30

40

【0381】

いくつかの実施形態では、提供される方法は、治療有効量の提供されるPD-1結合ポリペプチドもしくは操作された細胞、またはその医薬組成物のいずれかを投与することによって、対象において疾患または状態を治療するためのものである。いくつかの実施形態では、疾患または状態は、腫瘍または癌である。概して、疾患または障害の軽減または治療は、疾患または障害に関連する1つ以上の症状または医学的問題の減少を伴う。例えば、癌の場合、治療有効量の薬物は、以下の1つまたは組み合わせを達成することができる：癌細胞の数の低減、腫瘍サイズの縮小、末梢器官への癌細胞浸潤の阻害（すなわち、ある程度の減少および/もしくは停止）、腫瘍転移の阻害、腫瘍増殖のある程度の阻害、ならびに/または癌に関連する症状の1つ以上のある程度の緩和。いくつかの実施形態では

50

、本開示の組成物は、対象、例えば、ヒトまたは他の哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、コンパニオン動物（例えば、ネコ、イヌ、ウマ）、家畜、労働動物、もしくは動物園動物における疾患または障害の発症または再発を予防するために使用され得る。対象および患者という用語は、本明細書において互換的に使用される。

#### 【0382】

いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドもしくは操作された細胞、またはその医薬組成物を使用して、哺乳動物癌細胞（ヒト癌細胞など）の増殖を阻害することができる。癌を治療する方法は、有効量の明細書に記載される医薬組成物のいずれかを、癌を有する対象に投与することを含み得る。有効量の医薬組成物は、癌の進行を阻害、停止、または逆転するために投与され得る。ヒト癌細胞は、インビボまたはエキスピボで処置され得る。ヒト患者のエキスピボ治療では、癌細胞を含有する組織または体液は、体外で処置され、次いで組織または体液は、患者内に再導入されて戻される。いくつかの実施形態では、癌は、治療用組成物を患者に投与することによって、インビボでヒト患者において治療される。

10

#### 【0383】

疾患の非限定的な例としては、あらゆる種類の癌（乳癌、肺癌、結腸直腸癌、前立腺癌、黒色腫、頭頸部癌、膵癌など）、関節リウマチ、クローン病、SLE、心血管損傷、虚血などが挙げられる。例えば、適応症には、T細胞性急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）を含む白血病、多発性骨髄腫を含むリンパ芽球性疾患、ならびに肺腫瘍、結腸直腸腫瘍、前立腺腫瘍、膵臓腫瘍、および乳房腫瘍（トリプルネガティブ乳癌を含む）を含む固形腫瘍が含まれる。例えば、適応症には、原発腫瘍起源に関係なく、骨疾患または癌の転移；非限定的な例としてER/PR+乳癌、Her2+乳癌、トリプルネガティブ乳癌を含む乳癌；結腸直腸癌；子宮内膜癌；胃癌；膠芽腫；食道癌などの頭頸部癌；非限定的な例として非小細胞肺癌などの肺癌；多発性骨髄腫、卵巣癌；膵癌；前立腺癌；骨肉腫などの肉腫；非限定的な例として腎細胞癌などの腎癌；および/または非限定的な例としての扁平上皮癌、基底細胞癌、もしくは黒色腫などの皮膚癌が含まれる。いくつかの実施形態では、癌は、扁平上皮癌である。いくつかの実施形態では、癌は、皮膚扁平上皮癌である。いくつかの実施形態では、癌は、食道扁平上皮癌である。いくつかの実施形態では、癌は、頭頸部扁平上皮癌である。いくつかの実施形態では、癌は、肺扁平上皮癌である。

20

#### 【0384】

いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドもしくは操作された細胞、またはその医薬組成物は、癌または他の新生物状態の治療、その症状の軽減、改善、およびその進行の遅延に有用である。いくつかの実施形態では、癌は、膀胱癌、乳癌、子宮/子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、食道癌、消化管癌、膵癌、結腸直腸癌、腎臓癌、頭頸部癌、肺癌、胃癌、生殖細胞癌、骨癌、肝臓癌、甲状腺癌、皮膚癌、中枢神経系の新生物、リンパ腫、白血病、骨髄腫、肉腫、およびウイルス関連癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌、難治性癌、または再発癌である。

30

#### 【0385】

いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質または多重特異性ポリペプチド構築物などのPD-1結合ポリペプチドの治療有効量は、概して、治療目的を達成するために必要な量に関する。典型的には、投与される本開示の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、および状態の個体差を考慮して、医師によって決定され得る。

40

#### 【0386】

いくつかの実施形態では、治療有効用量は、非限定的な例として、約0.01 μg/kg体重～約10 mg/kg体重であり得る。いくつかの実施形態では、治療有効用量は、非限定的な例として、約0.01 mg/kg体重～約5～10 mg/kg体重であり得る。一般的な投与頻度は、例えば、1日2回から週に1回までの範囲であり得る。

#### 【0387】

いくつかの実施形態では、治療量の明細書の操作された細胞組成物が投与される。概し

50

て、本明細書に記載される操作された細胞、例えば、T細胞を含む医薬組成物は、 $10^4$  ~  $10^9$ 細胞/kg体重、例えば、 $10^5$  ~  $10^6$ 細胞/kg体重の投与量で投与されてもよく、これらの範囲内のすべての整数値を含むことが規定され得る。T細胞組成物などの操作された細胞組成物はまた、これらの投与量で複数回投与され得る。細胞は、免疫療法で一般的に既知の注入技術を使用することによって投与され得る（例えば、Rosenberg et al, New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照）。特定の患者のための最適な投与量および治療レジメンは、疾患の徴候について患者を監視し、それに応じて治療を調整することによって、当業者によって容易に決定され得る。

#### 【0388】

治療の有効性は、特定の障害を診断または治療するための任意の既知の方法に関連して決定される。所望の特異性を有するPD-1結合ポリペプチドまたはそれを含有する操作された細胞のスクリーニング方法としては、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、および当該技術分野内で既知の他の免疫学的媒介技術が挙げられるが、これらに限定されない。提供されるPD-1結合ポリペプチドまたは操作された細胞の投与が、望ましくない免疫反応を媒介するか、もしくは媒介することが可能な免疫細胞の排除、隔離、もしくは不活性化；防御免疫応答を媒介するか、もしくは媒介することが可能である免疫細胞の誘発、生成、もしくは刺激；免疫細胞の物理的もしくは機能的特性の変化；またはこれらの効果の組み合わせによって、免疫学的活性を十分に調節するかを判定するための様々な手段が知られている。免疫学的活性の調節の測定例としては、免疫細胞集団の存在または非存在の検査（フローサイトメトリー、免疫組織化学、組織学、電子顕微鏡法、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR））；シグナルに応答して増殖または分裂する能力またはそれに対する耐性を含む、免疫細胞の機能的能力の測定（抗CD3抗体、抗T細胞受容体抗体、抗CD28抗体、カルシウムイオノフォア、ペプチドまたはタンパク質抗原がロードされたPMA（ホルボール12-ミリストート13-アセート）抗原提示細胞での刺激後の3H-チミジン取り込みに基づく、T細胞増殖アッセイおよびペプスキャン分析、B細胞増殖アッセイを使用するなど）；他の細胞を死滅させるか、または溶解する能力の測定（細胞傷害性T細胞アッセイなど）；サイトカイン、ケモカイン、細胞表面分子、抗体、および他の細胞産物の測定（例えば、フローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着アッセイ、ウェスタンブロット分析、タンパク質マイクロアレイ分析、免疫沈降分析による）；免疫細胞または免疫細胞内のシグナル伝達経路の活性化の生化学的マーカーの測定（例えば、チロシン、セリン、またはトレオニンリン酸化のウェスタンブロットおよび免疫沈降分析、ポリペプチド切断、ならびにタンパク質複合体の形成または解離；タンパク質アレイ分析；DNAアレイまたはサブトラクティブハイブリダイゼーションを使用したDNA転写プロファイリング）；アポトーシス、壊死、または他の機構による細胞死の測定（例えば、アネキシンV染色、TUNELアッセイ、DNAラダーを測定するためのゲル電気泳動、組織学；蛍光発生カスパーゼアッセイ、カスパーゼ基質のウェスタンブロット分析）；免疫細胞によって産生された遺伝子、タンパク質、および他の分子の測定（例えば、ノーザンブロット分析、ポリメラーゼ連鎖反応、DNAマイクロアレイ、タンパク質マイクロアレイ、二次元ゲル電気泳動、ウェスタンブロット分析、酵素結合免疫吸着アッセイ、フローサイトメトリー）；ならびに例えば、再発率または疾患重症度を測定することによる自己タンパク質または自己ポリペプチドを伴う自己免疫疾患、神経変性疾患、および他の疾患の改善などの臨床症状または転帰の測定（臨床スコア、追加の療法の使用についての必要条件、機能状態、画像研究）が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0389】

提供されるPD-1結合ポリペプチドはまた、様々な診断用および予防用製剤でも有用である。一実施形態では、PD-1結合ポリペプチドは、前述の障害の1つ以上を発症するリスクがある患者に投与される。障害の1つ以上に対する患者または器官の素因は、遺伝子型マーカー、血清学的マーカー、または生化学的マーカーを使用して決定され得る。

#### 【0390】

10

20

30

40

50

本開示の別の実施形態では、PD-1結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、前述の障害の1つ以上に関連する臨床的適応症と診断されたヒト個体に投与される。診断時、そのような治療薬は、臨床的適応症の影響を軽減または逆転するために投与される。

【0391】

併用療法

本開示のPD-1結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、単独で、または他の抗癌剤などの他の治療様式と組み合わせて投与され得る。これらは、他の治療様式の前、それと実質的に同時、または後に提供され得る（すなわち、同時または連続的に）。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される治療方法は、以下を施すことをさらに含むことができる：放射線療法、化学療法、ワクチン接種、標的腫瘍療法、CAR-T療法、腫瘍溶解性ウイルス療法、癌免疫療法、サイトカイン療法、外科的切除、クロマチン修飾、アブレション、凍結療法、腫瘍標的に対するアンチセンス剤、腫瘍標的に対するsiRNA剤、腫瘍標的に対するマイクロRNA剤もしくは抗癌剤/抗腫瘍剤、または抗体、サイトカイン、もしくは受容体細胞外ドメイン-Fc融合体などの生物製剤。

10

【0392】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1結合ポリペプチドは、1つ以上の化学療法薬、CAR-T（キメラ抗原受容体T細胞）療法、腫瘍溶解性ウイルス療法、サイトカイン療法、および/またはVISTA、gpNMB、B7H4、HHLA2、CD73、CTLA4、TIGITなどの他のチェックポイント分子を標的とする薬剤と同時に与えられる。

20

【0393】

いくつかの実施形態では、本開示のPD-1結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、抗HER-2抗体、抗CD20抗体、上皮成長因子受容体（EGFR）拮抗薬（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤）、HER1/EGFR阻害剤（例えば、エルロチニブ（TARCEVA（登録商標））、血小板由来成長因子阻害剤（例えば、GLEEVEC（登録商標）（イマチニブメシル酸塩））、COX-2阻害剤（例えば、セレコキシブ）、インターフェロン、CTLA4阻害剤（例えば、抗CTLA抗体イピリムマブ（YERVOY（登録商標）））、PD-1阻害剤（例えば、抗PD1抗体、BMS-936558）、PDL1阻害剤（例えば、抗PDL1抗体、MPDL3280A）、PDL2阻害剤（例えば、抗PDL2抗体）、サイトカイン、以下の標的：ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR-ベータ、BlyS、APRIL、BCMA、PD-1、PDL1、PDL2、CTLA4、またはVEGF受容体（複数可）の1つ以上に結合する拮抗薬（例えば、中和抗体）、TRAIL/Apo2、および他の生物活性および有機化学剤など、他の抗腫瘍剤と組み合わされて使用される。

30

【0394】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるPD-1結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、PD-1/PD-L1療法と同時に与えられる。PD-1/PD-L1療法の例としては、ニボルマブ（BMS）、ピジリズマブ（CureTech、CT-011）、ペムブロリズマブ（Merck）、デュルバルマブ（Medimmune/AstraZeneca）、アテゾリズマブ（Genentech/Roche）、アベルマブ（Pfizer）、AMP-224（Amplimmune）、BMS-936559、AMP-514（Amplimmune）、MDX-1105（Merck）、TSR-042（Tesar/AonaptysBio、ANB-011）、STI-A1010（Sorrento Therapeutics）、STI-A1110（Sorrento Therapeutics）、およびプログラム死-1（PD-1）またはプログラム死リガンド1（PD-L1）に向けられる他の薬剤が挙げられる。

40

【0395】

いくつかの実施形態では、本開示のPD-1結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、化学療法薬として使用され得る。化学療法薬の例としては、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびCYTOXAN（登録商標）シクロホスファミド；スルホン酸アルキル、例

50

えば、ブスルファン、インブスルファンおよびピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、およびトリメチロロメラミンを含むエチレンイミンおよびメチラメラミン；アセトゲニン（特にブラタシンおよびブラタシノン）；カンプトテシン（合成類似体トポテカンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体KW-2189およびCB1-TM1を含む）；エリュテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；窒素マスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、シクロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピキン、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソ尿素、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニンヌスチン；抗生物質、例えば、エンジン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシガンマ1IおよびカリケアマイシンオメガI1（例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186(1994)を参照）；ジネマイシンAを含むジネマイシン；ビスホスホネート、例えば、クロドロネート；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォアおよび関連する色素タンパク質エンジン抗生物質クロモフォア）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN（登録商標）ドキシソルピシン（モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、およびデオキシドキシソルピシンを含む）、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベンメックス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）；葉酸類似体、例えば、デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えば、アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充剤、例えば、フォリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エリプチニウムアセテート；エポチロン；エトグルシド；ガリウムニトレート；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシノイド、例えば、メイタンシンおよびアンサミトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）多糖類複合体（JHS Natural Products, Eugene, OR）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特に、T-2毒素、ベラクリンA、ロリジンA、およびアングイジン）；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、TAXOL（登録商標）パクリタキセル

10

20

30

40

50

(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、パクリタキセルのABRAXANE (登録商標)クレモフォル無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤 (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois)、およびTAXOTERE (登録商標)ドキセタキセル (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France) ; クロランブシル ; GEMZAR (登録商標)ゲムシタピン ; 6-チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキサート ; プラチナ類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン ; ビンブラスチン ; プラチナ ; エトポシド (VP-16) ; イホスファミド ; ミトキサントロン ; ピンクリスチン ; NAVELBINE (登録商標)ピノレルピン ; ノバントロン ; テニポシド ; エダトレキサート ; ダウノマイシン ; アミノプテリン ; ゼ  
10  
ローダ ; イバンドロネート ; イリノテカン (Campotosar, CPT-11) (5-FUおよびロイコボリンを用いたイリノテカンの治療レジメを含む) ; トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000 ; ジフルオロメチルオルニチン (DMFO) ; レチノイド、例えば、レチノイン酸 ; カペシタピン ; コンプレタスタチン ; ロイコボリン (LV) ; オキサリプラチン治療レジメン (FOLFOX) を含むオキサリプラチン ; 細胞増殖を低減するPKC-アルファ、Raf、H-Ras、EGFR (例えば、エルロチニブ (TARCEVA (登録商標))) およびVEGF-Aの阻害剤、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0396】

さらなる非限定的な例示的な化学療法薬としては、例えば、タモキシフェン (NOLV  
20  
ADEX (登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびFARESTON (登録商標)トレミフェン ; 例えば、4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE (登録商標)メゲストロールアセテート、AROMASIN (登録商標)エキセメスタン、フォルメスタニー、ファドロゾール、RIVISOR (登録商標)ボロゾール、FEMARA (登録商標)レトロゾール、およびARIMIDEX (登録商標)アナストロゾールなどの、副腎におけるエストロゲン産生を調整する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害薬 ; ならびに抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリン ; ならびにトロキサシタピン (1,3-ジオキサランヌクレオシドシトシン類似体) ;  
30  
アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に例えば、PKC-アルファ、Ralf、およびH-Rasなど、異常な細胞増殖 (abherent cell proliferation) に関与しているシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの ; リボザイム、例えば、VEGF発現阻害剤 (例えば、ANGIOZYME (登録商標)リボザイム)、およびHER2発現阻害剤 ; ワクチン、例えば、遺伝子療法ワクチン、例えば、ALLOVECTIN (登録商標)ワクチン、LEUVECTIN (登録商標)ワクチン、およびVAXID (登録商標)ワクチン ; PROLEUKIN (登録商標) (アルデスロイキン) rIL-2 ; LURTOTECAN (登録商標)トポイソメラーゼ1阻害剤 ; ABA  
40  
RELIIX (登録商標) GnRHアゴニスト ; ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体を含む、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) など、癌に対するホルモン作用を制御または阻害する抗ホルモン剤が挙げられる。

#### 【0397】

いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドおよび追加の薬剤は、単一の治療用組成物に製剤化され、PD-1結合ポリペプチドおよび追加の薬剤は、同時に投与される。代替的に、PD-1結合ポリペプチドもしくは操作された細胞および追加の薬剤は、互いに分離しており、例えば、各々は、別個の治療用組成物に製剤化され、PD-1結合ポリペプチドもしくは操作された細胞および追加の薬剤は、同時に投与されるか、またはPD-1結合ポリペプチドもしくは操作された細胞および追加の薬剤は、治療レジメン中の異なる時間に投与される。例えば、PD-1結合ポリペプチドもしくは操作された細胞  
50

は、追加の薬剤の投与前に投与されるか、PD-1結合ポリペプチドもしくは操作された細胞は、追加の薬剤の投与後に投与されるか、またはPD-1結合ポリペプチドもしくは操作された細胞および追加の薬剤は、交互に投与される。PD-1結合ポリペプチドおよび追加の薬剤は、単回用量または複数回用量で投与されてもよい。

【0398】

いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の薬剤（複数可）は、同時に投与される。例えば、PD-1結合ポリペプチドおよび追加の薬剤（複数可）は、単一の組成物に製剤化されてもよく、または2つ以上の別個の組成物として投与されてもよい。いくつかの実施形態では、PD-1結合ポリペプチドもしくは操作された細胞および追加の薬剤（複数可）は、連続的に投与されるか、またはPD-1結合ポリペプチドもしくは操作された細胞および追加の薬剤は、治療レジメン中の異なる時間に投与される。

10

【0399】

VII. 例示的な実施形態

特に以下の実施形態が提供される。

【0400】

1. PD-1に特異的に結合する少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン（PD-1 VHHドメイン）と、PD-1以外の標的に結合する1つ以上の追加の結合ドメインと、を含む、PD-1結合ポリペプチド構築物。

【0401】

2. 少なくとも1つのVHHドメインが、配列番号268、272、273、および313からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）と、配列番号278または314に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2（CDR2）と、配列番号283または315に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3（CDR3）と、を含む、実施形態1に記載のPD-1結合構築物。

20

【0402】

3. 配列番号268、272、273、および313からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）と、配列番号278または314に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2（CDR2）と、配列番号283に記載される選択されたアミノ酸配列を含む相補性決定領域3（CDR3）と、を含む、少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン（PD-1 VHHドメイン）を含む、PD-1結合構築物。

30

【0403】

4. PD-1が、ヒトPD-1である、実施形態1～3のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0404】

5. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、ヒト化である、実施形態1～4のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0405】

6. 1つ以上の追加の結合ドメインが、免疫細胞上の活性化受容体に結合する、実施形態1、2、4、および5のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

40

【0406】

7. 免疫細胞が、T細胞である、実施形態6に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0407】

8. 活性化受容体が、CD3（CD3）である、実施形態6または実施形態7に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0408】

9. PD-1およびCD3に対して二重特異性である、実施形態8に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0409】

10. 免疫細胞が、ナチュラルキラー（NK）細胞である、実施形態9に記載のPD-

50

1 結合ポリペプチド構築物。

【0410】

11．活性化受容体が、CD16 (CD16a) である、実施形態6または実施形態10に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0411】

12．PD-1およびCD16aに対して二重特異性である、実施形態11に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0412】

13．1つ以上の追加のドメインが、腫瘍関連抗原(TAA)に結合する、実施形態1、2、4、および5のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

10

【0413】

14．1つ以上の追加の結合ドメインが、サイトカイン受容体に結合する、実施形態1、2、4、および5のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0414】

15．1つ以上の追加の結合ドメインが、抗体またはその抗原結合断片を含む、実施形態1、2、および4~14のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0415】

16．1つ以上の追加の結合ドメインが、一価である、実施形態1、2、および4~15のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0416】

17．抗体またはその抗原結合断片が、Fv、ジスルフィド安定化Fv(dsFv)、scFv、Fab、単ドメイン抗体(sdAb)、VNAR、またはVHHである、実施形態16に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

20

【0417】

18．1つ以上の追加の結合ドメインが、サイトカインであるか、またはサイトカイン受容体に結合することが可能なその切断断片もしくはバリエントである、実施形態14に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0418】

19．サイトカインが、I型インターフェロンもしくはII型インターフェロンであるインターフェロンであるか、I型インターフェロンの切断断片もしくはバリエントであるか、またはII型インターフェロンの切断断片もしくはバリエントである、実施形態18に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

30

【0419】

20．I型インターフェロンが、IFN-アルファもしくはIFN-ベータであるか、またはその切断断片もしくはバリエントであるか、または

II型インターフェロンが、IFN-ガンマであるか、またはその切断断片もしくはバリエントである、実施形態19に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0420】

21．ポリペプチドが、免疫グロブリンFc領域を含む、実施形態1~20のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

40

【0421】

22．ポリペプチドが、少なくとも1つの単ドメイン抗体および1つ以上の追加の結合ドメインを連結する免疫グロブリンFc領域を含む、実施形態1、2、および4~21のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0422】

23．二量体である、実施形態1~22のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0423】

24．Fc領域が、ホモ二量体Fc領域である、実施形態21~23のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

50

## 【 0 4 2 4 】

25. Fc領域が、配列番号8、10、11、12、もしくは13のいずれかに記載されるアミノ酸の配列、または配列番号8、10、11、12、もしくは13のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、実施形態21~24のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

## 【 0 4 2 5 】

26. Fc領域が、ヒトIgG1である、実施形態21~24のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

10

## 【 0 4 2 6 】

27. Fc領域が、配列番号8に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号8と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、実施形態26に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

## 【 0 4 2 7 】

28. Fc領域が、ヘテロ二量体Fc領域である、実施形態21~23のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

## 【 0 4 2 8 】

29. Fc領域が、エフェクター機能を示す、実施形態21~28のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

20

## 【 0 4 2 9 】

30. Fc領域が、エフェクター機能を低減し、かつ/またはFcガンマ受容体もしくはC1qから選択されるエフェクター分子への結合を低減する、1つ以上のアミノ酸修飾を含むポリペプチドを含む、実施形態21~29のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

## 【 0 4 3 0 】

31. 1つ以上のアミノ酸修飾が、Glu233、Leu234、またはLeu235のうちの1つ以上の欠失である、実施形態30に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

## 【 0 4 3 1 】

32. Fc領域が、配列番号9に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号9と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、実施形態30または実施形態31に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

30

## 【 0 4 3 2 】

33. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号251~267もしくは284のいずれかに記載される配列、または配列番号251~267もしくは284のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態1~32のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

40

## 【 0 4 3 3 】

34. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、(i)配列番号284に記載される配列、(ii)配列番号284のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号284と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態1~33のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

## 【 0 4 3 4 】

35. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号284に記載される配

50

列を含む、実施形態 1 ~ 3 4 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 4 3 5 】

3 6 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 6 8、2 7 2、および 2 7 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 と、配列番号 2 7 8 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 2 と、配列番号 2 8 3 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 3 と、を含む、実施形態 1 ~ 3 4 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド。

【 0 4 3 6 】

3 7 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、それぞれ配列番号 2 6 8、2 7 8、および 2 8 3、それぞれ配列番号 2 7 2、2 7 8、および 2 8 3、またはそれぞれ配列番号 2 7 3、2 7 8、および 2 8 3 に記載される C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

10

【 0 4 3 7 】

3 8 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 1 ~ 2 6 7 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 1 ~ 2 6 7 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 ~ 3 4、3 6、および 3 7 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 4 3 8 】

3 9 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 1 ~ 2 6 7 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸の配列を含む、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 8 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

20

【 0 4 3 9 】

4 0 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 7 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 7 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 4 4 0 】

4 1 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 7 に記載されるアミノ酸の配列を含む、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 4 0 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

30

【 0 4 4 1 】

4 2 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 1 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 1 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 4 4 2 】

4 3 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 2 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 2 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

40

【 0 4 4 3 】

4 4 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 3 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 3 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態

50

1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 4 4 4 】

4 5 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 4 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 4 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 4 4 5 】

4 6 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 5 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 5 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

10

【 0 4 4 6 】

4 7 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 6 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 6 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 4 4 7 】

4 8 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 8 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 8 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

20

【 0 4 4 8 】

4 9 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 9 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 9 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

30

【 0 4 4 9 】

5 0 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 6 0 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 6 0 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 4 5 0 】

5 1 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 6 1 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 6 1 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

40

【 0 4 5 1 】

5 2 . 少なくとも 1 つの P D - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 6 2 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 6 2 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 ~ 3 4 および 3 6 ~ 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 4 5 2 】

50

53. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号263に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号263と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態1~34および36~39のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0453】

54. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号264に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号264と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態1~34および36~39のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

10

【0454】

55. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号265に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号265と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態1~34および36~39のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0455】

56. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号266に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号266と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態1~34および36~39のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

20

【0456】

57. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号267に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号267と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態1~34および36~39のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0457】

30

58. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、または284と少なくとも95%の配列同一性を含み、PD-1に結合する、実施形態1~34および36~39のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0458】

59. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、または284に記載される、実施形態1~34および36~39のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

40

【0459】

60. (a) 第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドを含むヘテロ二量体Fc領域を含む第1の構成成分と、(b) 可変重鎖領域(VH)および可変軽鎖領域(VL)を含む抗CD3抗体または抗原結合断片を含む第2の構成成分と、を含む、多重特異性ポリペプチド構築物であって、

抗CD3抗体または抗原結合断片を含むVHおよびVLが、ヘテロ二量体Fcの反対側のポリペプチドに連結され、

第1および第2の構成成分が、リンカーによって連結され、ヘテロ二量体Fc領域が、抗CD3抗体のN末端に位置付けられ、

第1および第2の構成成分のうち的一方または両方が、腫瘍関連抗原(TAA)に結合

50

する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み、

第1および第2の構成成分のうち的一方または両方が、少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン(PD-1 VHHドメイン)を含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

【0460】

61. 多重特異性ポリペプチド構築物が、少なくとも(i)ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチド、リンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインを含む第1のポリペプチドと、(ii)ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意選択的に第1のポリペプチド中に存在するのと同じリンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのうち他方を含む第2のポリペプチドと、を含み、

10

第1および第2のポリペプチドのうち的一方または両方が独立して、TAAに結合する少なくとも1つの抗原結合ドメイン、および少なくとも1つのPD-1 VHHドメインを含む、実施形態60に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0461】

62. ヘテロ二量体Fc領域の第1および第2のFcポリペプチドのうち的一方または両方が、ホモ二量体Fc領域のポリペプチドと比較して、任意選択的に配列番号245に記載されるFcポリペプチドまたはその免疫学的に活性な断片と比較して、ヘテロ二量体化を誘発する少なくとも1つの修飾を含む、実施形態60または実施形態61に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0462】

20

63. ヘテロ二量体Fcの第1および第2のFcポリペプチドの各々が独立して、少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む、実施形態62に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0463】

64. ヘテロ二量体Fcの第1および第2のFcポリペプチドの各々が、ノブイントゥホール修飾を含むか、またはポリペプチドの静電的相補性を増加させるための電荷変異を含む、実施形態63に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0464】

65. アミノ酸修飾が、ノブイントゥホール修飾である、実施形態64に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0465】

30

66. ヘテロ二量体Fcの第1のFcポリペプチドが、Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val、およびそれらの組み合わせの中から選択される修飾を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のFcポリペプチドが、修飾Thr366Trpを含む、実施形態60~65のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0466】

67. 第1および第2のFcポリペプチドが、システイン残基への非システイン残基の修飾をさらに含み、第1のポリペプチドの修飾が、位置Ser354およびTyr349のうち的一方であり、第2のFcポリペプチドの修飾が、位置Ser354およびTyr349のうち他方である、実施形態66に記載の多重特異性ポリペプチド。

【0467】

40

68. アミノ酸修飾が、ポリペプチドの静電的相補性を増加させるための電荷変異である、実施形態60~64のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0468】

69. 第1および/もしくは第2のFcポリペプチド、または第1および第2のFcポリペプチドの各々が、相補的な位置の修飾を含み、修飾が、他方のポリペプチドの相補的アミノ酸と反対の電荷を有するアミノ酸での置き換えである、実施形態60~64および68のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0469】

70. ヘテロ二量体Fcの第1または第2のFcポリペプチドのうちの一つが、残基Ile253での修飾をさらに含む、実施形態60~69のいずれかに記載の多重特異性が

50

リペプチド構築物。

【0470】

71. 修飾が、I l e 2 5 3 A r gである、実施形態70に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0471】

72. ヘテロ二量体F cの第1または第2のF cポリペプチドのうちの1つが、残基H i s 4 3 5での修飾をさらに含む、実施形態60~71のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0472】

73. 修飾が、H i s 4 3 5 A r gである、実施形態72に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 10

【0473】

74. F c領域が、L y s 4 4 7を欠くポリペプチドを含む、実施形態60~73のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0474】

75. F c領域が、F c R n結合を強化するための少なくとも1つの修飾を含むポリペプチドを含む、実施形態60~74のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0475】

76. 修飾が、M e t 2 5 2、S e r 2 5 4、T h r 2 5 6、M e t 4 2 8、A s n 4 3 4、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される位置である、実施形態75に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 20

【0476】

77. 修飾が、M e t 2 5 2 Y、S e r 2 5 4 T、T h r 2 5 6 E、M e t 4 2 8 L、M e t 4 2 8 V、A s n 4 3 4 S、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される位置である、実施形態76に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0477】

78. 修飾が、位置M e t 2 5 2および位置M e t 4 2 8である、実施形態76に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0478】

79. 修飾が、M e t 2 5 2 YおよびM e t 4 2 8 Lである、実施形態78に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 30

【0479】

80. 修飾が、M e t 2 5 2 YおよびM e t 4 2 8 Vである、実施形態76に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0480】

81. ヘテロ二量体F cの第1のポリペプチドが、配列番号103、107、115、または117のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体F cの第2のポリペプチドが、配列番号104、108、111、113、119、または121のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含む、実施形態60~80のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 40

【0481】

82. F c領域が、エフェクター機能を低減し、かつ/またはF cガンマ受容体もしくはC1qから選択されるエフェクター分子への結合を低減する、少なくとも1つのアミノ酸修飾を含むポリペプチドを含む、実施形態1~81のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0482】

83. 1つ以上のアミノ酸修飾が、G l u 2 3 3、L e u 2 3 4、またはL e u 2 3 5のうちの1つ以上の欠失である、実施形態82に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0483】

84. ヘテロ二量体F cの第1のポリペプチドが、配列番号105、109、116、 50

または 118 のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体 Fc の第 2 のポリペプチドが、配列番号 106、110、112、114、120、または 122 のいずれかに記載されるアミノ酸の配列を含む、実施形態 60 ~ 83 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0484】

85 . 抗 CD3 抗体または抗原結合断片が、一価である、実施形態 60 ~ 84 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0485】

86 . 抗 CD3 抗体または抗原結合断片が、単鎖抗体ではなく、任意選択的に単鎖可変断片 (scFv) ではない、実施形態 60 ~ 85 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【0486】

87 . 抗 CD3 抗体または抗原結合断片が、Fv 抗体断片である、実施形態 60 ~ 86 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0487】

88 . Fv 抗体断片が、ジスルフィド安定化抗 CD3 結合 Fv 断片 (dsFv) を含む、実施形態 87 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0488】

89 . 抗 CD3 抗体または抗原結合断片が、アミノ酸配列 TYAMN (配列番号 29) を含む VH CDR1、アミノ酸配列 RIRSKYNNYATYYADSVKD (配列番号 30) を含む VH CD2、アミノ酸配列 HGNFGNSYVSWFAY (配列番号 31) を含む VH CDR3、アミノ酸配列 RSSSTGAVTTSNYAN (配列番号 32) を含む VL CDR1、アミノ酸配列 GTNKRAP (配列番号 33) を含む VL CDR2、およびアミノ酸配列 ALWYSNLWV (配列番号 34) を含む VL CDR3 を含む、60 ~ 88 の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【0489】

90 . 抗 CD3 抗体または抗原結合断片が、配列番号 35 ~ 65 のいずれかのアミノ酸配列、または配列番号 35 ~ 65 のいずれかと少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を示す配列を有する VH と、

30

配列番号 66 ~ 85 および 293 のいずれかのアミノ酸配列、または配列番号 66 ~ 85 および 293 のいずれかと少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を示す配列を有する VL と、を有する、実施形態 60 ~ 89 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0490】

91 . 抗 CD3 抗体または抗原結合断片が、配列番号 47 のアミノ酸配列および配列番号 75 のアミノ酸配列を含む、実施形態 60 ~ 90 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0491】

92 . 抗 CD3 抗体または抗原結合断片が、配列番号 47 のアミノ酸配列および配列番号 285 のアミノ酸配列を含む、実施形態 60 ~ 90 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【0492】

93 . 少なくとも 1 つの PD-1 VHH ドメインが、Fc 領域に対してアミノ末端に、かつ/または多重特異性ポリペプチド構築物の CD3 結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる、実施形態 60 ~ 92 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0493】

94 . 第 1 のポリペプチドが、N 末端から C 末端への順序で、TAA に結合する第 1 の抗原結合ドメイン、ヘテロ二量体 Fc 領域の第 1 の Fc ポリペプチドを含む第 1 のポリペ

50

プチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメイン、およびTAAに結合する第2の抗原結合ドメインを含み、

第2のポリペプチドが、少なくとも1つのPD-1 VHHドメインを含み、N末端からC末端への順序で、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意選択的に、第1のポリペプチド中に存在するのと同じリンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのうちの他方を含み、少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる、実施形態60~93のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0494】

95. 多重特異性ポリペプチド構築物が、PD-1に特異的に結合する1つのPD-1 VHHドメインのみを含む、実施形態60~94のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0495】

96. PD-1 VHHドメインが、多重特異性構築物のFc領域に対してアミノ末端に位置付けられる、実施形態60~95のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0496】

97. 第1のポリペプチドが、N末端からC末端への順序で、TAAに結合する第1の抗原結合ドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドを含む第1のポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメイン、およびTAAに結合する第2の抗原結合ドメインを含み、

第2のポリペプチドが、N末端からC末端への順序で、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意選択的に、第1のポリペプチド中に存在するのと同じリンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのうちの他方、およびPD-1 VHHドメインを含む、実施形態60~96のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0497】

98. PD-1 VHHドメインが、多重特異性構築物のFc領域に対してアミノ末端に位置付けられる、実施形態60~95のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0498】

99. 第1のポリペプチドが、N末端からC末端への順序で、TAAに結合する第1の抗原結合ドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドを含む第1のポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメイン、およびTAAに結合する第2の抗原結合ドメインを含み、

第2のポリペプチドが、N末端からC末端への順序で、PD-1 VHHドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意選択的に、第1のポリペプチド中に存在するのと同じリンカー、および抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのうちの他方を含む、実施形態60~95および98のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0499】

100. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号251~267もしくは284のいずれかに記載される配列、または配列番号251~267もしくは284のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60~99のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0500】

101. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、(i)配列番号284に記載

10

20

30

40

50

される配列、( i i ) 配列番号 2 8 4 のヒト化バリエーション、または ( i i i ) 配列番号 2 8 4 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD - 1 に結合する、実施形態 6 0 ~ 1 0 0 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

1 0 2 . 少なくとも 1 つの PD - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 8 4 に記載される配列を含む、実施形態 6 0 ~ 1 0 1 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【 0 5 0 1 】

1 0 3 . 少なくとも 1 つの PD - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 6 8、2 7 2、および 2 7 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 と、配列番号 2 7 8 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 2 と、配列番号 2 8 3 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 3 と、を含む、実施形態 6 0 ~ 1 0 1 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【 0 5 0 2 】

1 0 4 . 少なくとも 1 つの PD - 1 V H H ドメインが、それぞれ配列番号 2 6 8、2 7 8、および 2 8 3、それぞれ配列番号 2 7 2、2 7 8、および 2 8 3、またはそれぞれ配列番号 2 7 3、2 7 8、および 2 8 3 に記載される C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む、実施形態 6 0 ~ 1 0 0 および 1 0 3 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【 0 5 0 3 】

1 0 5 . 少なくとも 1 つの PD - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 1 ~ 2 6 7 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 1 ~ 2 6 7 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD - 1 に結合する、実施形態 6 0 ~ 1 0 0、1 0 3、および 1 0 4 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【 0 5 0 4 】

1 0 6 . 少なくとも 1 つの PD - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 1 ~ 2 6 7 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸の配列を含む、実施形態 6 0 ~ 1 0 0 および 1 0 3 ~ 1 0 5 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

【 0 5 0 5 】

1 0 7 . 少なくとも 1 つの PD - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 7 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 7 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD - 1 に結合する、実施形態 6 0 ~ 1 0 0 および 1 0 3 ~ 1 0 6 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【 0 5 0 6 】

1 0 8 . 少なくとも 1 つの PD - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 7 に記載されるアミノ酸の配列を含む、実施形態 6 0 ~ 1 0 0 および 1 0 3 ~ 1 0 7 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【 0 5 0 7 】

1 0 9 . 少なくとも 1 つの PD - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 1 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 1 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD - 1 に結合する、実施形態 6 0 ~ 1 0 0 および 1 0 3 ~ 1 0 6 のいずれかに記載の PD - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 5 0 8 】

1 1 0 . 少なくとも 1 つの PD - 1 V H H ドメインが、配列番号 2 5 2 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 2 5 2 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、

50

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、  
もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60~100および103~106のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。  
【0509】

111. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号253に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号253と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60~100および103~106のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。  
【0510】

10

112. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号254に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号254と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60~100および103~106のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。  
【0511】

113. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号255に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号255と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60~100および103~106のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。  
【0512】

20

114. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号256に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号256と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60~100および103~106のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。  
【0513】

115. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号258に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号258と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60~100および103~106のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。  
【0514】

30

116. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号259に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号259と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60~100および103~106のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。  
【0515】

40

117. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号260に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号260と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60~100および103~106のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。  
【0516】

118. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号261に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号261と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形

50

態 60 ~ 100 および 103 ~ 106 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0517】

119 . 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号262に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号262と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60 ~ 100 および 103 ~ 106 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0518】

120 . 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号263に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号263と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60 ~ 100 および 103 ~ 106 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【0519】

121 . 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号264に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号264と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60 ~ 100 および 103 ~ 106 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0520】

122 . 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号265に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号265と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60 ~ 100 および 103 ~ 106 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【0521】

123 . 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号266に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号266と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60 ~ 100 および 103 ~ 106 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

【0522】

124 . 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号267に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号267と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60 ~ 100 および 103 ~ 106 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0523】

125 . 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、または284と少なくとも95%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60 ~ 100 および 103 ~ 106 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【0524】

126 . 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、または284に記載される、実施形態60 ~ 100 および 103 ~ 106 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0525】

127 . 第1および第2の構成成分のうち的一方または両方が、共刺激受容体に結合す

50

る少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)を含む、実施形態60~126のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0526】

128. 少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)が、Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/または多重特異性ポリペプチド構築物のCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる、実施形態127に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0527】

129. 多重特異性ポリペプチド構築物が、1つの共刺激受容体結合領域(CRR)のみを含む、実施形態127または実施形態128に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【0528】

130. 多重特異性ポリペプチド構築物が、任意選択的に同じであるかまたは異なる2つの共刺激受容体結合領域(CRR)を含む、実施形態127~129のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0529】

131. 少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)が、共刺激受容体の天然同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、または共刺激受容体への結合活性を示すそのバリエーションであるか、またはそれを含む、実施形態127~129のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0530】

132. 少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)が、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、単ドメイン重鎖抗体、および単ドメイン軽鎖抗体からなる群から選択される抗体またはその抗原結合断片である、実施形態127~130のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【0531】

133. 抗体またはその抗原結合断片が、Fv、scFv、Fab、単ドメイン抗体(sdAb)、VNAR、またはVHHである、実施形態132に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0532】

134. 抗体または抗原結合断片が、sdAbである、実施形態1132または実施形態133に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

【0533】

135. sdAbが、ヒトまたはヒト化sdAbである、実施形態134に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0534】

136. 少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)が、41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、グルコシルコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体(BAFF-R)、B細胞成熟抗原(BCMA)、膜貫通アクチベーターならびにCAMLインタラクター(TACI)、およびNKG2Dの中から選択される共刺激受容体に結合する、実施形態127~135のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【0535】

137. 少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)が、41BB(CD137)、OX40(CD134)、およびグルコシルコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)の中から選択される共刺激受容体に結合する、実施形態127~136のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0536】

138. 少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)が、配列番号210に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号210に記載される配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

50

96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有し、4-1BBに結合する配列を含む、実施形態127~137のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0537】

139. 多重特異性ポリペプチド構築物が、TAAに結合する第1および第2の抗原結合ドメインを含む、実施形態60~138のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0538】

140. 抗原結合ドメインが、同じ腫瘍関連抗原(TAA)に結合する、実施形態139に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0539】

141. 第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインが、同じTAAの異なるエピトープまたは非重複エピトープに結合し、かつ/または同じTAAへの結合を競合する、実施形態139または実施形態149に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0540】

142. 第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインが、異なるTAAに結合する、実施形態139に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0541】

143. 1つの抗原結合ドメインが、Fc領域に対してアミノ末端に位置付けられ、1つの抗原結合ドメインが、CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる、実施形態139~142のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0542】

144. TAAに結合する抗原結合ドメイン、またはTAAに結合する抗原結合ドメインの各々が独立して、TAAの天然同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、またはTAAへの結合活性を示すそのバリエーションを含む、実施形態60~143のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0543】

145. TAAに結合する抗原結合ドメイン、またはTAAに結合する抗原結合ドメインの各々が独立して、抗体またはその抗原結合断片である、実施形態60~143のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0544】

146. 抗体またはその抗原結合断片が、Fv、scFv、Fab、単ドメイン抗体(sdAb)、VNAR、またはVHHである、実施形態145に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0545】

147. 抗体または抗原結合断片が、sdAbである、実施形態145または実施形態146に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0546】

148. sdAbが、ヒトまたはヒト化sdAbである、実施形態147に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0547】

149. 抗原結合ドメイン、または抗原結合ドメインの各々が独立して、1-92-LFA-3、5T4、アルファ-4インテグリン、アルファ-Vインテグリン、アルファ4ベータ1インテグリン、アルファ4ベータ7インテグリン、AGR2、抗Lewis-Y、アペリンJ受容体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5補体、C-242、CA9、CA19-9、(Lewis a)、炭酸脱水酵素9、CD2、CD3、CD6、CD9、CD11a、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD40L、CD41、CD44、CD44v6、CD47、CD51、CD52、CD56、CD64、CD70、CD71、CD74、CD80、CD81、CD86、CD95、CD117、CD123、CD125、CD132、(IL-2RG)、CD133、CD1

10

20

30

40

50

37、CD138、CD166、CD172A、CD248、CDH6、CEACAM5 (CEA)、CEACAM6 (NCA-90)、CLAUDIN-3、CLAUDIN-4、cMet、コラーゲン、Cripto、CSFR、CSFR-1、CTLA-4、CTGF、CXCL10、CXCL13、CXCR1、CXCR2、CXCR4、CYR61、DL44、DLK1、DLL3、DLL4、DPP-4、DSG1、EDA、EDB、EGFR、EGFRviii、エンドセリンB受容体(ETBR)、ENPP3、EpCAM、EPHA2、EPHB2、ERBB3、RSVのFタンパク質、FAP、FGF-2、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FLT-3、葉酸受容体アルファ(FR)、GAL3ST1、G-CSF、G-CSFR、GD2、GITR、GLUT1、GLUT4、GM-CSF、GM-CSFR、GP IIB/IIIa受容体、Gp130、GPIIB/IIIA、GPNMB、GRP78、HER2/neu、HER3、HER4、HGF、hGH、HVEM、ヒアルロニダーゼ、ICOS、IFNアルファ、IFNベータ、IFNガンマ、IgE、IgE受容体(FcεRI)、IGF、IGF1R、IL1B、IL1R、IL2、IL11、IL12、IL12p40、IL-12R、IL-12Rベータ1、IL13、IL13R、IL15、IL17、IL18、IL21、IL23、IL23R、IL27/IL27R(wsx1)、IL29、IL-31R、IL31/IL31R、IL2R、IL4、IL4R、IL6、IL6R、インスリン受容体、Jaggedリガンド、Jagged 1、Jagged 2、KISS1-R、LAG-3、LIF-R、Lewis X、LIGHT、LRP4、LRRC26、Ly6G6D、LYPD1、MCSP、メソテリン、MRP4、MUC1、ムチン-16 (MUC16、CA-125)、Na/K ATPase、NGF、ニカストリン、Notch受容体、Notch 1、Notch 2、Notch 3、Notch 4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFRアルファ、PDGFRベータ、PD-1、PD-L1、PD-L2、ホスファチジル-セリン、P1GF、PSCA、PSMA、PSGR、RAAG12、RAGE、SLC44A4、スフィンゴシン1リン酸、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TAPA1、TEM-8、TGFベータ、TIGIT、TIM-3、TLR2、TLR4、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TMEM31、TNFアルファ、TNFR、TNFRS12A、TRAIL-R1、TRAIL-R2、トランスフェリン、トランスフェリン受容体、TRK-A、TRK-B、uPAR、VAP1、VCAM-1、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、VISTA、WISP-1、WISP-2、およびWISP-3の中から選択される腫瘍抗原に結合する、実施形態60~148のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

20

30

【0548】

150. 第1のポリペプチドが、N末端からC末端への順序で、TAAに結合する第1の抗原結合ドメイン、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドを含む第1のポリペプチド、リンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメイン、およびTAAに結合する第2の抗原結合ドメインを含み、

第2のポリペプチドが、N末端からC末端への順序で、PD-1 VHHドメインまたはCRBRのうちの1つ、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意選択的に、第1のポリペプチド中に存在するのと同じリンカー、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのうちの他方、およびPD-1 VHHドメインまたはCRBRのうちの他方を含む、実施形態139~149のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【0549】

151. リンカーが、ペプチドまたはポリペプチドリリンカーであり、任意選択的にリンカーが、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20アミノ酸長である、実施形態60~150のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

50

## 【 0 5 5 0 】

1 5 2 . リンカーが、切断不可能なリンカーである、実施形態 6 0 ~ 1 5 1 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【 0 5 5 1 】

1 5 3 . 切断不可能なリンカーが、G S、G G S、G G G S ( 配列番号 1 2 5 )、G G G G S ( 配列番号 1 2 6 )、およびそれらの組み合わせを含む、実施形態 1 5 2 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【 0 5 5 2 】

1 5 4 . リンカーが、配列 G G G G S G G G G S G G G G S ( 配列番号 1 2 7 ) であるか、またはそれを含む、実施形態 6 0 ~ 1 5 3 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

## 【 0 5 5 3 】

1 5 5 . リンカーが、切断可能なリンカーである、実施形態 6 0 ~ 1 5 1 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【 0 5 5 4 】

1 5 6 . 切断可能なリンカーが、プロテアーゼの基質として機能するポリペプチドである、実施形態 1 5 5 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【 0 5 5 5 】

1 5 7 . プロテアーゼが、免疫エフェクター細胞、腫瘍、または腫瘍微小環境中に存在する細胞によって産生される、実施形態 1 5 6 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

## 【 0 5 5 6 】

1 5 8 . プロテアーゼが、免疫エフェクター細胞によって産生され、免疫エフェクター細胞が、活性化 T 細胞、ナチュラルキラー ( N K ) 細胞、または N K T 細胞である、実施形態 1 5 6 または実施形態 1 5 7 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【 0 5 5 7 】

1 5 9 . プロテアーゼが、マトリプターゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ ( M M P )、グランザイム B、およびそれらの組み合わせから選択される、実施形態 1 5 6 ~ 1 5 8 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【 0 5 5 8 】

1 6 0 . プロテアーゼが、グランザイム B である、実施形態 1 5 9 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

## 【 0 5 5 9 】

1 6 1 . 切断可能なリンカーが、アミノ酸配列

## 【 化 2 】

**GGSGGGGIEPDIGGSGGS**

( 配列番号 1 7 1 ) を含む、実施形態 1 5 6 ~ 1 6 0 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【 0 5 6 0 】

1 6 2 . 配列番号 2 6 8、2 7 2、および 2 7 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域 1 ( C D R 1 ) と、配列番号 2 7 8 に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域 2 ( C D R 2 ) と、配列番号 2 8 3 に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域 3 ( C D R 3 ) と、を含む、P D - 1 に結合する単離された単一ドメイン抗体。

40

## 【 0 5 6 1 】

1 6 3 . 配列番号 2 5 1 ~ 2 6 7 もしくは 2 8 4 のいずれかに記載されるアミノ酸配列、または配列番号 2 5 1 ~ 2 6 7 もしくは 2 8 4 のいずれかと少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P D - 1 に結合する、実施形態 1 6 2 に記載の単離された単一ドメイン抗体。

50

## 【0562】

164. 単ドメイン抗体が、(i) 配列番号284に記載される配列、(ii) 配列番号284のヒト化バリエーション、または(iii) 配列番号284と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態162または実施形態163に記載の単離された単ドメイン抗体。

## 【0563】

165. sdAbが、配列番号284に記載される配列を含む、実施形態162~164のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

10

## 【0564】

166. sdAbが、配列番号268、272、および273からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号278に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号283に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3と、を含む、実施形態162~164のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

## 【0565】

167. sdAbが、それぞれ配列番号268、278、および283、それぞれ配列番号272、278、および283、またはそれぞれ配列番号273、278、および283に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、実施形態162~164のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

20

## 【0566】

168. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号251~267のいずれかに1つに記載されるアミノ酸の配列、または配列番号251~267と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態162~164、166、および167のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

## 【0567】

169. sdAbが、配列番号251~267のいずれかに1つに記載されるアミノ酸の配列を含む、実施形態162~164および166~168のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

30

## 【0568】

170. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号257に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号257と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態162~164および166~169のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

## 【0569】

171. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号257に記載されるアミノ酸の配列を含む、実施形態162~164および166~169のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

40

## 【0570】

172. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号251に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号251と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態162~164および166~169のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

## 【0571】

173. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号252に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号252と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%

50

、 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態162~164および166~169のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0572】

174. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号253に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号253と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態162~164および166~169のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0573】

175. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号254に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号254と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態162~164および166~169のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0574】

176. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号255に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号255と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態162~164および166~169のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0575】

177. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号256に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号256と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態162~164および166~169のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0576】

178. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号258に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号258と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態162~164および166~169のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0577】

179. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号259に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号259と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態162~164および166~169のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0578】

180. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号260に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号260と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態162~164および166~169のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0579】

181. 少なくとも1つのPD-1 sdAbが、配列番号261に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号261と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態16

10

20

30

40

50

2 ~ 164 および 166 ~ 169 のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0580】

182 . 少なくとも1つのPD - 1 s d A b が、配列番号262に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号262と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD - 1 に結合する、実施形態162 ~ 164 および 166 ~ 169 のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0581】

183 . 少なくとも1つのPD - 1 s d A b が、配列番号263に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号263と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD - 1 に結合する、実施形態162 ~ 164 および 166 ~ 169 のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

10

【0582】

184 . 少なくとも1つのPD - 1 s d A b が、配列番号264に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号264と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD - 1 に結合する、実施形態162 ~ 164 および 166 ~ 169 のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0583】

185 . 少なくとも1つのPD - 1 s d A b が、配列番号265に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号265と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD - 1 に結合する、実施形態162 ~ 164 および 166 ~ 169 のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

20

【0584】

186 . 少なくとも1つのPD - 1 s d A b が、配列番号266に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号266と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD - 1 に結合する、実施形態162 ~ 164 および 166 ~ 169 のいずれかの実施形態に記載の単離された単ドメイン抗体。

30

【0585】

187 . 少なくとも1つのPD - 1 s d A b が、配列番号267に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号267と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD - 1 に結合する、実施形態162 ~ 164 および 166 ~ 169 のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0586】

188 . s d A b が、配列番号251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、または284に記載されるアミノ酸の配列を含む、実施形態162 ~ 164 および 166 ~ 169 のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

40

【0587】

189 . 実施形態1 ~ 59 のいずれかに記載のPD - 1 結合ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド(複数可)。

【0588】

190 . 実施形態60 ~ 161 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物をコードする、ポリヌクレオチド(複数可)。

【0589】

50

191. 実施形態60～161のいずれかに記載の多重特異性構築物の第1のポリペプチドをコードする第1の核酸配列と、多重特異性構築物の第2のポリペプチドをコードする第2の核酸配列と、を含む、ポリヌクレオチドであって、第1および第2の核酸配列が、内部リボソーム侵入部位(IRES)、または自己切断ペプチドもしくはリボソームスキッピングを引き起こすペプチドをコードする核酸によって分離される、ポリヌクレオチド。

【0590】

192. 第1の核酸配列および第2の核酸配列が、同じプロモータに作動可能に連結される、実施形態191に記載のポリヌクレオチド。

【0591】

193. 自己切断ペプチドまたはリボソームスキッピングを引き起こすペプチドをコードする核酸が、T2A、P2A、E2A、またはF2Aから選択される、実施形態192に記載のポリヌクレオチド。

【0592】

194. 実施形態162～188のいずれかに記載の単ドメイン抗体をコードする、ポリヌクレオチド。

【0593】

195. 実施形態189～194のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【0594】

196. 発現ベクターである、実施形態195に記載のベクター。

【0595】

197. ウイルスベクターまたは真核ベクターであり、任意選択的に、真核ベクターが哺乳動物ベクターである、実施形態195または実施形態196に記載のベクター。

【0596】

198. 実施形態189～194のいずれかに記載のポリヌクレオチド(複数可)、または実施形態195～197のいずれかに記載のベクター(複数可)を含む、細胞。

【0597】

199. 細胞が、組み換えまたは単離である、実施形態198に記載の細胞。

【0598】

200. 細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態199に記載の細胞。

【0599】

201. ポリペプチドを産生する方法であって、細胞に、実施形態189～194のいずれかに記載のポリヌクレオチド(複数可)、または実施形態195～197に記載のベクター(複数可)を導入することと、多重特異性ポリペプチド構築物を産生するための条件下で細胞を培養することと、を含む、方法。

【0600】

202. 細胞からポリペプチドを単離または精製することをさらに含む、実施形態201に記載の方法。

【0601】

203. 実施形態201または実施形態202に記載の方法によって産生される、ポリペプチド。

【0602】

204. 実施形態1～59のいずれかに記載の結合分子または実施形態162～188のいずれかに記載の単ドメイン抗体を含む結合分子を含む、操作された免疫細胞であって、任意選択的に、結合分子が、細胞から分泌可能である、操作された免疫細胞。

【0603】

205. キメラ抗原受容体(CAR)をさらに含む、実施形態204に記載の操作された細胞。

【0604】

10

20

30

40

50

206．細胞が、リンパ球である、実施形態204または実施形態205に記載の操作された免疫細胞。

【0605】

207．細胞が、T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞である、実施形態205または206に記載の操作された免疫細胞。

【0606】

208．CARが、TAAに結合する抗原結合ドメインを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む、実施形態205～207のいずれかに記載の操作された免疫細胞。

【0607】

209．細胞内シグナル伝達ドメインが、免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ITAM）シグナル伝達ドメインを含み、任意選択的に、細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3ゼータシグナル伝達ドメイン、任意選択的にヒトCD3ゼータシグナル伝達ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態208に記載の操作された免疫細胞。

【0608】

210．細胞内シグナル伝達ドメインが、共刺激分子のシグナル伝達ドメインをさらに含む、実施形態209に記載の操作された免疫細胞。

【0609】

211．実施形態1～59のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド、実施形態60～161のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物、実施形態162～188のいずれかに記載の単一ドメイン抗体、または実施形態204～210のいずれかに記載の操作された免疫細胞を含む、医薬組成物。

【0610】

212．薬学的に許容される担体を含む、実施形態211に記載の医薬組成物。

【0611】

213．滅菌されている、実施形態211または実施形態212に記載の医薬組成物。

【0612】

214．対象における免疫応答を刺激または誘発する方法であって、それを必要とする対象に、実施形態1～59のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド、実施形態60～161のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物、実施形態162～188のいずれかに記載の単一ドメイン抗体、または実施形態204～210のいずれかに記載の操作された免疫細胞、または実施形態211～213に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【0613】

215．免疫応答が、腫瘍または癌、任意選択的にPD-1を発現する腫瘍または癌に対して増加する、実施形態214に記載の方法。

【0614】

216．方法が、対象における疾患または状態を治療する、実施形態214または実施形態215に記載の方法。

【0615】

217．対象における疾患または状態を治療する方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量の実施形態1～59のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド、実施形態60～161のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物、実施形態162～188のいずれかに記載の単一ドメイン抗体、または実施形態204～210のいずれかに記載の操作された免疫細胞、または実施形態211～213に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【0616】

218．疾患または状態が、腫瘍または癌である、実施形態216または実施形態217に記載の方法。

【0617】

10

20

30

40

50

219. 当該対象が、ヒトである、実施形態214～218のいずれかに記載の方法。

【0618】

220. 少なくとも1つのVHHドメインが、配列番号300に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号301に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号302に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、実施形態1に記載のPD-1結合構築物。

【0619】

221. 少なくとも1つのVHHドメインが、配列番号303に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号304に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号305に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、実施形態1に記載のPD-1結合構築物。

10

【0620】

222. 少なくとも1つのVHHドメインが、配列番号306に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号307に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号308に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、実施形態1に記載のPD-1結合構築物。

【0621】

223. 少なくとも1つのVHHドメインが、配列番号309に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号310に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号311に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、実施形態1に記載のPD-1結合構築物。

20

【0622】

224. 配列番号300に記載される選択されたアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号301に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号302に記載される選択されたアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン(PD-1 VHHドメイン)を含む、PD-1結合構築物。

【0623】

225. 配列番号303に記載される選択されたアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号304に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号305に記載される選択されたアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン(PD-1 VHHドメイン)を含む、PD-1結合構築物。

30

【0624】

226. 配列番号306に記載される選択されたアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号307に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号308に記載される選択されたアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン(PD-1 VHHドメイン)を含む、PD-1結合構築物。

【0625】

227. 配列番号309に記載される選択されたアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号310に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号311に記載される選択されたアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン(PD-1 VHHドメイン)を含む、PD-1結合構築物。

40

【0626】

228. PD-1が、ヒトPD-1である、実施形態220～227のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0627】

229. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、ヒト化である、実施形態22

50

0 ~ 2 2 8 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 2 8 】

2 3 0 . 1 つ以上の追加の結合ドメインが、免疫細胞上の活性化受容体に結合する、実施形態 2 2 0 ~ 2 2 4 および 2 2 8 ~ 2 2 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 2 9 】

2 3 1 . 免疫細胞が、T 細胞である、実施形態 2 3 0 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 3 0 】

2 3 2 . 活性化受容体が、C D 3 ( C D 3 ) である、実施形態 2 3 0 または実施形態 2 3 1 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

10

【 0 6 3 1 】

2 3 3 . P D - 1 および C D 3 に対して二重特異性である、実施形態 2 3 2 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 3 2 】

2 3 4 . 免疫細胞が、ナチュラルキラー ( N K ) 細胞である、実施形態 2 3 3 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 3 3 】

2 3 5 . 活性化受容体が、C D 1 6 ( C D 1 6 a ) である、実施形態 2 3 0 または実施形態 2 3 4 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

20

【 0 6 3 4 】

2 3 6 . P D - 1 および C D 1 6 a に対して二重特異性である、実施形態 2 3 5 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 3 5 】

2 3 7 . 1 つ以上の追加のドメインが、腫瘍関連抗原 ( T A A ) に結合する、実施形態 2 2 0 ~ 2 2 4 および 2 2 8 ~ 2 2 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 3 6 】

2 3 8 . 1 つ以上の追加の結合ドメインが、サイトカイン受容体に結合する、実施形態 2 2 0 ~ 2 2 4 および 2 2 8 ~ 2 2 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

30

【 0 6 3 7 】

2 3 9 . 1 つ以上の追加の結合ドメインが、抗体またはその抗原結合断片を含む、実施形態 2 2 0 ~ 2 2 4 および 2 2 8 ~ 2 3 8 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 3 8 】

2 4 0 . 1 つ以上の追加の結合ドメインが、一価である、実施形態 2 2 0 ~ 2 2 4 および 2 2 8 ~ 2 3 9 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 3 9 】

2 4 1 . 抗体またはその抗原結合断片が、F v 、ジスルフィド安定化 F v ( d s F v ) 、s c F v 、F a b 、単ドメイン抗体 ( s d A b ) 、V N A R 、または V H H である、実施形態 2 4 0 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

40

【 0 6 4 0 】

2 4 2 . 1 つ以上の追加の結合ドメインが、サイトカインであるか、またはサイトカイン受容体に結合することが可能なその切断断片もしくはバリエーションである、実施形態 2 3 8 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 4 1 】

2 4 3 . サイトカインが、I 型インターフェロンもしくは I I 型インターフェロンであるインターフェロンであるか、I 型インターフェロンの切断断片もしくはバリエーションであるか、または I I 型インターフェロンの切断断片もしくはバリエーションである、実施形態 2

50

4 2 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 4 2 】

2 4 4 . I 型インターフェロンが、 I F N - アルファもしくは I F N - ベータであるか、またはその切断断片もしくはバリエーションであるか、または

I I 型インターフェロンが、 I F N - ガンマであるか、またはその切断断片もしくはバリエーションである、実施形態 2 4 3 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 4 3 】

2 4 5 . ポリペプチドが、免疫グロブリン F c 領域を含む、実施形態 2 2 0 ~ 2 4 4 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 4 4 】

2 4 6 . ポリペプチドが、少なくとも 1 つの単一ドメイン抗体および 1 つ以上の追加の結合ドメインを連結する免疫グロブリン F c 領域を含む、実施形態 2 2 0 ~ 2 2 4 および 2 2 8 ~ 2 4 5 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 4 5 】

2 4 7 . 二量体である、実施形態 2 2 0 ~ 2 4 6 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 4 6 】

2 4 8 . F c 領域が、ホモ二量体 F c 領域である、実施形態 2 4 5 ~ 2 4 7 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 4 7 】

2 4 9 . F c 領域が、配列番号 8、1 0、1 1、1 2、もしくは 1 3 のいずれかに記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 8、1 0、1 1、1 2、もしくは 1 3 のいずれかと少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、実施形態 2 4 5 ~ 2 4 8 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 4 8 】

2 5 0 . F c 領域が、ヒト I g G 1 である、実施形態 2 4 5 ~ 2 4 8 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 4 9 】

2 5 1 . F c 領域が、配列番号 8 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 8 と少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、実施形態 2 5 0 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 5 0 】

2 5 2 . F c 領域が、ヘテロ二量体 F c 領域である、実施形態 2 4 5 ~ 2 4 7 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 5 1 】

2 5 3 . F c 領域が、エフェクター機能を示す、実施形態 2 4 5 ~ 2 5 2 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 5 2 】

2 5 4 . F c 領域が、エフェクター機能を低減し、かつ/または F c ガンマ受容体もしくは C 1 q から選択されるエフェクター分子への結合を低減する、1 つ以上のアミノ酸修飾を含むポリペプチドを含む、実施形態 2 4 5 ~ 2 5 3 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 5 3 】

2 5 5 . 1 つ以上のアミノ酸修飾が、G l u 2 3 3、L e u 2 3 4、または L e u 2 3 5 のうちの 1 つ以上の欠失である、実施形態 2 5 4 に記載の P D - 1 結合ポリペプチド構築物。

【 0 6 5 4 】

10

20

30

40

50

256. Fc領域が、配列番号9に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号9と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含む、実施形態254または実施形態255に記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0655】

257. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号296~299のいずれかに記載される配列、または配列番号296~299のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態220~256のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

10

【0656】

258. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、(i)配列番号296に記載される配列、(ii)配列番号296のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号296と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態220~257のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0657】

259. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号296に記載される配列を含む、実施形態220~258のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

20

【0658】

260. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号300に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号301に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号302に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3と、を含む、実施形態220~258のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド。

【0659】

261. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、それぞれ配列番号300、301、および302に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、実施形態220~258および260~36のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

30

【0660】

262. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、(i)配列番号297に記載される配列、(ii)配列番号297のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号297と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態220~257のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0661】

263. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号297に記載される配列を含む、実施形態220~257および262のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

40

【0662】

264. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号303に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号304に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号305に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3と、を含む、実施形態220~257および262のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド。

【0663】

265. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、それぞれ配列番号303、3

50

04、および305に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、実施形態220～257、262、および264のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0664】

266．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、(i)配列番号298に記載される配列、(ii)配列番号298のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号298と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態220～257のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

10

【0665】

267．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号297に記載される配列を含む、実施形態220～257および266のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0666】

268．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号306に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号307に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号308に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3と、を含む、実施形態220～257および266のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド。

【0667】

269．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、それぞれ配列番号306、307、および308に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、実施形態220～257、266、および268のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

20

【0668】

270．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、(i)配列番号299に記載される配列、(ii)配列番号299のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号299と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態220～257のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

30

【0669】

271．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号299に記載される配列を含む、実施形態220～257および270のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0670】

272．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号309に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号310に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号311に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3と、を含む、実施形態220～257および270のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド。

40

【0671】

273．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、それぞれ配列番号309、310、および311に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、実施形態220～257、270、および272のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

【0672】

274．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号296～299と少なくとも95%の配列同一性を含み、PD-1に結合する、実施形態220～258、260～262、264～266、268～270、および272～273のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

50

## 【 0 6 7 3 】

275. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号296～299に記載される、実施形態220～258、260～262、264～266、268～270、および272～274のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド構築物。

## 【 0 6 7 4 】

276. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号296～299のいずれかに記載される配列、または配列番号296～299のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60～99のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

## 【 0 6 7 5 】

277. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、(i)配列番号296に記載される配列、(ii)配列番号296のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号296と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60～99または276のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【 0 6 7 6 】

278. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号296に記載される配列を含む、実施形態60～99、276、または277のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

## 【 0 6 7 7 】

279. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号300に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号301に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号302に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3と、を含む、実施形態60～99、276、または277のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【 0 6 7 8 】

280. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、それぞれ配列番号300、301、および302に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、実施形態60～99、276、277、または279のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

## 【 0 6 7 9 】

281. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、(i)配列番号297に記載される配列、(ii)配列番号297のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号297と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60～99または276のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【 0 6 8 0 】

282. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号297に記載される配列を含む、実施形態60～99、276、または281のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

## 【 0 6 8 1 】

283. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号303に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号304に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号305に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3と、を含む、実施形態60～99、276、または281のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【 0 6 8 2 】

284. 少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、それぞれ配列番号303、3

50

04、および305に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、実施形態60～99、276、281、または283のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0683】

285．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、(i)配列番号298に記載される配列、(ii)配列番号298のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号298と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60～99または276のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【0684】

286．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号297に記載される配列を含む、実施形態60～99、276、または285のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0685】

287．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号306に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号307に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号308に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3と、を含む、実施形態60～99、276、または285のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0686】

288．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、それぞれ配列番号306、307、および308に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、実施形態60～99、276、285、または287のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【0687】

289．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、(i)配列番号299に記載される配列、(ii)配列番号299のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号299と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60～99または276のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

【0688】

290．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号299に記載される配列を含む、実施形態60～99、276、または289のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0689】

291．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号309に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号310に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号311に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3と、を含む、実施形態60～99、276、または289のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【0690】

292．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、それぞれ配列番号300、301、および302に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、実施形態60～99、276、289、または291のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0691】

293．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号296、297、298、または299と少なくとも95%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態60～99または276～292のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

50

## 【0692】

294．少なくとも1つのPD-1 VHHドメインが、配列番号296、297、298、または299に記載される、実施形態60～99または276～292のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【0693】

295．第1および第2の構成成分のうち的一方または両方が、共刺激受容体に結合する少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)を含む、実施形態276～294のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【0694】

296．少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)が、Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/または多重特異性ポリペプチド構築物のCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる、実施形態295に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

## 【0695】

297．多重特異性ポリペプチド構築物が、1つの共刺激受容体結合領域(CRR)のみを含む、実施形態295または実施形態296に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【0696】

298．多重特異性ポリペプチド構築物が、任意選択的に同じであるかまたは異なる2つの共刺激受容体結合領域(CRR)を含む、実施形態295～297のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

## 【0697】

299．少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)が、共刺激受容体の天然同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、または共刺激受容体への結合活性を示すそのバリエーションであるか、またはそれを含む、実施形態295～297のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【0698】

300．少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)が、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、単ドメイン重鎖抗体、および単ドメイン軽鎖抗体からなる群から選択される抗体またはその抗原結合断片である、実施形態295～298のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

## 【0699】

301．抗体またはその抗原結合断片が、Fv、scFv、Fab、単ドメイン抗体(sdAb)、VNAR、またはVHHである、実施形態300に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【0700】

302．抗体または抗原結合断片が、sdAbである、実施形態300または実施形態301に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【0701】

303．sdAbが、ヒトまたはヒト化sdAbである、実施形態302に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

## 【0702】

304．少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)が、41BB(CD137)、OX40(CD134)、CD27、グルコシルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)、CD28、ICOS、CD40、B細胞活性化因子受容体(BAFF-R)、B細胞成熟抗原(BCMA)、膜貫通アクチベーターならびにCAMLインタラクター(TACI)、およびNKG2Dの中から選択される共刺激受容体に結合する、実施形態295～303のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

## 【0703】

305．少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRR)が、41BB(CD137)、OX40(CD134)、およびグルコシルチコイド誘導性TNFR関連タンパク

50

質 (GITR) の中から選択される共刺激受容体に結合する、実施形態 295 ~ 304 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0704】

306 . 少なくとも1つの共刺激受容体結合領域 (CRBR) が、配列番号 210 に記載されるアミノ酸の配列、または配列番号 210 に記載される配列と少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有し、4-1BB に結合する配列を含む、実施形態 295 ~ 305 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0705】

307 . 多重特異性ポリペプチド構築物が、TAA に結合する第1および第2の抗原結合ドメインを含む、実施形態 276 ~ 306 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【0706】

308 . 抗原結合ドメインが、同じ腫瘍関連抗原 (TAA) に結合する、実施形態 307 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0707】

309 . 第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインが、同じTAAの異なるエピトープまたは非重複エピトープに結合し、かつ/または同じTAAへの結合を競合する、実施形態 307 または実施形態 308 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0708】

310 . 第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインが、異なるTAAに結合する、実施形態 307 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【0709】

311 . 1つの抗原結合ドメインが、Fc領域に対してアミノ末端に位置付けられ、1つの抗原結合ドメインが、CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられる、実施形態 307 ~ 310 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0710】

312 . TAA に結合する抗原結合ドメイン、またはTAAに結合する抗原結合ドメインの各々が独立して、TAAの天然同族結合パートナーの細胞外ドメインもしくはその結合断片、またはTAAへの結合活性を示すそのバリエーションを含む、実施形態 276 ~ 311 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

【0711】

313 . TAA に結合する抗原結合ドメイン、またはTAAに結合する抗原結合ドメインの各々が独立して、抗体またはその抗原結合断片である、実施形態 276 ~ 311 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0712】

314 . 抗体またはその抗原結合断片が、Fv、scFv、Fab、単一ドメイン抗体 (sdAb)、VNAR、またはVHHである、実施形態 313 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0713】

315 . 抗体または抗原結合断片が、sdAbである、実施形態 313 または実施形態 314 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【0714】

316 . sdAbが、ヒトまたはヒト化sdAbである、実施形態 315 に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0715】

317 . 抗原結合ドメイン、または抗原結合ドメインの各々が独立して、1-92-LFA-3、5T4、アルファ-4インテグリン、アルファ-Vインテグリン、アルファ4ベータ1インテグリン、アルファ4ベータ7インテグリン、AGR2、抗Lewis-Y、アペリンJ受容体、APRIL、B7-H3、B7-H4、BAFF、BTLA、C5

50

補体、C - 2 4 2、CA 9、CA 1 9 - 9、( L e w i s a )、炭酸脱水酵素 9、CD 2、CD 3、CD 6、CD 9、CD 1 1 a、CD 1 9、CD 2 0、CD 2 2、CD 2 4、CD 2 5、CD 2 7、CD 2 8、CD 3 0、CD 3 3、CD 3 8、CD 4 0、CD 4 0 L、CD 4 1、CD 4 4、CD 4 4 v 6、CD 4 7、CD 5 1、CD 5 2、CD 5 6、CD 6 4、CD 7 0、CD 7 1、CD 7 4、CD 8 0、CD 8 1、CD 8 6、CD 9 5、CD 1 1 7、CD 1 2 3、CD 1 2 5、CD 1 3 2、( I L - 2 R G )、CD 1 3 3、CD 1 3 7、CD 1 3 8、CD 1 6 6、CD 1 7 2 A、CD 2 4 8、CD H 6、C E A C A M 5 ( C E A )、C E A C A M 6 ( N C A - 9 0 )、C L A U D I N - 3、C L A U D I N - 4、c M e t、コラーゲン、C r i p t o、C S F R、C S F R - 1、C T L A - 4、C T G F、C X C L 1 0、C X C L 1 3、C X C R 1、C X C R 2、C X C R 4、C Y R 6 1、D L 4 4、D L K 1、D L L 3、D L L 4、D P P - 4、D S G 1、E D A、E D B、E G F R、E G F R v i i i、エンドセリン B 受容体 ( E T B R )、E N P P 3、E p C A M、E P H A 2、E P H B 2、E R B B 3、R S V の F タンパク質、F A P、F G F - 2、F G F 8、F G F R 1、F G F R 2、F G F R 3、F G F R 4、F L T - 3、葉酸受容体アルファ ( F R )、G A L 3 S T 1、G - C S F、G - C S F R、G D 2、G I T R、G L U T 1、G L U T 4、G M - C S F、G M - C S F R、G P I I b / I I I a 受容体、G p 1 3 0、G P I I B / I I I A、G P N M B、G R P 7 8、H E R 2 / n e u、H E R 3、H E R 4、H G F、h G H、H V E M、ヒアルロニダーゼ、I C O S、I F N アルファ、I F N ベータ、I F N ガンマ、I g E、I g E 受容体 ( F c e R I )、I G F、I G F 1 R、I L 1 B、I L 1 R、I L 2、I L 1 1、I L 1 2、I L 1 2 p 4 0、I L - 1 2 R、I L - 1 2 R ベータ 1、I L 1 3、I L 1 3 R、I L 1 5、I L 1 7、I L 1 8、I L 2 1、I L 2 3、I L 2 3 R、I L 2 7 / I L 2 7 R ( w s x 1 )、I L 2 9、I L - 3 1 R、I L 3 1 / I L 3 1 R、I L 2 R、I L 4、I L 4 R、I L 6、I L 6 R、インスリン受容体、J a g g e d リガンド、J a g g e d 1、J a g g e d 2、K I S S 1 - R、L A G - 3、L I F - R、L e w i s X、L I G H T、L R P 4、L R R C 2 6、L y 6 G 6 D、L y P D 1、M C S P、メソテリン、M R P 4、M U C 1、ムチン - 1 6 ( M U C 1 6、C A - 1 2 5 )、N a / K A T P a s e、N G F、ニカストリン、N o t c h 受容体、N o t c h 1、N o t c h 2、N o t c h 3、N o t c h 4、N O V、O S M - R、O X - 4 0、P A R 2、P D G F - A A、P D G F - B B、P D G F R アルファ、P D G F R ベータ、P D - 1、P D - L 1、P D - L 2、ホスファチジル - セリン、P 1 G F、P S C A、P S M A、P S G R、R A A G 1 2、R A G E、S L C 4 4 A 4、スフィンゴシン - 1 - リン酸、S T E A P 1、S T E A P 2、T A G - 7 2、T A P A 1、T E M - 8、T G F ベータ、T I G I T、T I M - 3、T L R 2、T L R 4、T L R 6、T L R 7、T L R 8、T L R 9、T M E M 3 1、T N F アルファ、T N F R、T N F R S 1 2 A、T R A I L - R 1、T R A I L - R 2、トランスフェリン、トランスフェリン受容体、T R K - A、T R K - B、u P A R、V A P 1、V C A M - 1、V E G F、V E G F - A、V E G F - B、V E G F - C、V E G F - D、V E G F R 1、V E G F R 2、V E G F R 3、V I S T A、W I S P - 1、W I S P - 2、および W I S P - 3 の中から選択される腫瘍抗原に結合する、実施形態 2 7 6 ~ 3 1 6 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【 0 7 1 6 】

3 1 8 . 第 1 のポリペプチドが、N 末端から C 末端への順序で、T A A に結合する第 1 の抗原結合ドメイン、ヘテロ二量体 F c 領域の第 1 の F c ポリペプチドを含む第 1 のポリペプチド、リンカー、抗 C D 3 抗体または抗原結合断片の V H または V L ドメイン、および T A A に結合する第 2 の抗原結合ドメインを含み、

第 2 のポリペプチドが、N 末端から C 末端への順序で、P D - 1 V H H ドメインまたは C R B R のうちの 1 つ、ヘテロ二量体 F c 領域の第 2 の F c ポリペプチド、リンカー、任意選択的に、第 1 のポリペプチド中に存在するのと同じリンカー、抗 C D 3 抗体または抗原結合断片の V H または V L ドメインのうちの他方、および P D - 1 V H H ドメインまたは C R B R のうちの他方を含む、実施形態 3 1 0 ~ 3 1 7 のいずれかに記載の多重特

10

20

30

40

50

異性ポリペプチド構築物。

【0717】

319. リンカーが、ペプチドまたはポリペプチドリンカーであり、任意選択的にリンカーが、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20アミノ酸長である、実施形態276～318のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0718】

320. リンカーが、切断不可能なリンカーである、実施形態276～319のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0719】

321. 切断不可能なリンカーが、GS、GGS、GGGS（配列番号125）、GGGG（配列番号126）、およびそれらの組み合わせを含む、実施形態320に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0720】

322. リンカーが、配列GGGGGS（配列番号127）であるか、またはそれを含む、実施形態276～321のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0721】

323. リンカーが、切断可能なリンカーである、実施形態276～319のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0722】

324. 切断可能なリンカーが、プロテアーゼの基質として機能するポリペプチドである、実施形態323に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0723】

325. プロテアーゼが、免疫エフェクター細胞、腫瘍、または腫瘍微小環境中に存在する細胞によって産生される、実施形態324に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0724】

326. プロテアーゼが、免疫エフェクター細胞によって産生され、免疫エフェクター細胞が、活性化T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、またはNK T細胞である、実施形態324または実施形態325に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0725】

327. プロテアーゼが、マトリプターゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、グランザイムB、およびそれらの組み合わせから選択される、実施形態324～326のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0726】

328. プロテアーゼが、グランザイムBである、実施形態327に記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0727】

329. 切断可能なリンカーが、アミノ酸配列

【化3】

**GGSGGGGIEPDIGGSGGS**

（配列番号171）を含む、実施形態324～328のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【0728】

330. 配列番号300に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）と、配列番号301に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2（CDR2）と、配列番号302に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3（CDR3）と、を含む、PD-1に結合する単離された単一ドメイン抗体。

【0729】

10

20

30

40

50

331. 配列番号296に記載されるアミノ酸配列、または配列番号296のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態330に記載の単離された単ドメイン抗体。

【0730】

332. 単ドメイン抗体が、(i)配列番号296に記載される配列、(ii)配列番号296のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号296と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態330または実施形態331に記載の単離された単ドメイン抗体。

10

【0731】

333. sdAbが、配列番号296に記載される配列を含む、実施形態330~332のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0732】

334. sdAbが、配列番号300に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号301に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号302に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3と、を含む、実施形態330~332のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

20

【0733】

335. sdAbが、それぞれ配列番号300、301、および302に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、実施形態330~332および334のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0734】

336. 配列番号303に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号304に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号305に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、PD-1に結合する単離された単ドメイン抗体。

【0735】

30

337. 配列番号297に記載されるアミノ酸配列、または配列番号297のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態336に記載の単離された単ドメイン抗体。

【0736】

338. 単ドメイン抗体が、(i)配列番号297に記載される配列、(ii)配列番号297のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号297と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態336または実施形態337に記載の単離された単ドメイン抗体。

40

【0737】

339. sdAbが、配列番号297に記載される配列を含む、実施形態336~338のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

【0738】

340. sdAbが、配列番号303に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号304に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号305に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3と、を含む、実施形態336~338のいずれかに記載の単離された単ドメイン抗体。

50

## 【0739】

341. s d A b が、それぞれ配列番号303、304、および305に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、実施形態336～338および340のいずれかに記載の単離された単一ドメイン抗体。

## 【0740】

342. 配列番号306に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号307に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号308に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、PD-1に結合する単離された単一ドメイン抗体。

## 【0741】

343. 配列番号298に記載されるアミノ酸配列、または配列番号298のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態342に記載の単離された単一ドメイン抗体。

## 【0742】

344. 単一ドメイン抗体が、(i)配列番号298に記載される配列、(ii)配列番号298のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号298と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態342または実施形態343に記載の単離された単一ドメイン抗体。

## 【0743】

345. s d A b が、配列番号298に記載される配列を含む、実施形態342～344のいずれかに記載の単離された単一ドメイン抗体。

## 【0744】

346. s d A b が、配列番号306に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1と、配列番号307に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2と、配列番号308に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3と、を含む、実施形態342～344のいずれかに記載の単離された単一ドメイン抗体。

## 【0745】

347. s d A b が、それぞれ配列番号306、307、および308に記載されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、実施形態342～344および346のいずれかに記載の単離された単一ドメイン抗体。

## 【0746】

348. 配列番号309に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、配列番号310に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、配列番号311に記載されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)と、を含む、PD-1に結合する単離された単一ドメイン抗体。

## 【0747】

349. 配列番号299に記載されるアミノ酸配列、または配列番号299のいずれかと少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、PD-1に結合する、実施形態348に記載の単離された単一ドメイン抗体。

## 【0748】

350. 単一ドメイン抗体が、(i)配列番号299に記載される配列、(ii)配列番号299のヒト化バリエーション、または(iii)配列番号299と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含み、P

10

20

30

40

50

D - 1 に結合する、実施形態 3 4 8 または実施形態 3 4 9 に記載の単離された単一ドメイン抗体。

【 0 7 4 9 】

3 5 1 . s d A b が、配列番号 2 9 9 に記載される配列を含む、実施形態 3 4 8 ~ 3 5 0 のいずれかに記載の単離された単一ドメイン抗体。

【 0 7 5 0 】

3 5 2 . s d A b が、配列番号 3 0 9 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1 と、配列番号 3 1 0 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 2 と、配列番号 3 1 1 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 3 と、を含む、実施形態 3 4 8 ~ 3 5 0 のいずれかに記載の単離された単一ドメイン抗体。

10

【 0 7 5 1 】

3 5 3 . s d A b が、それぞれ配列番号 3 0 9、3 1 0、および 3 1 1 に記載される C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む、実施形態 3 4 8 ~ 3 5 0 および 3 5 2 のいずれかに記載の単離された単一ドメイン抗体。

【 0 7 5 2 】

3 5 4 . s d A b が、配列番号 2 9 6 ~ 2 9 9 のいずれかが 1 つに記載されるアミノ酸の配列を含む、実施形態 3 3 0 ~ 3 3 2、3 3 4 ~ 3 3 8、3 4 0 ~ 3 4 4、3 4 6 ~ 3 5 0、および 3 5 2 ~ 3 5 3 のいずれかに記載の単離された単一ドメイン抗体。

【 0 7 5 3 】

3 5 5 . s d A b が、配列番号 2 9 6、2 9 7、2 9 8、または 2 9 9 に記載されるアミノ酸の配列を含む、実施形態 3 3 0 ~ 3 3 2、3 3 4 ~ 3 3 8、3 4 0 ~ 3 4 4、3 4 6 ~ 3 5 0、および 3 5 2 ~ 3 5 4 のいずれかに記載の単離された単一ドメイン抗体。

20

【 0 7 5 4 】

3 5 6 . 実施形態 2 2 0 ~ 2 7 5 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド (複数可)。

【 0 7 5 5 】

3 5 7 . 実施形態 2 7 6 ~ 3 2 9 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物をコードする、ポリヌクレオチド (複数可)。

【 0 7 5 6 】

3 5 8 . 実施形態 2 7 6 ~ 3 2 9 のいずれかに記載の多重特異性構築物の第 1 のポリペプチドをコードする第 1 の核酸配列と、多重特異性構築物の第 2 のポリペプチドをコードする第 2 の核酸配列と、を含む、ポリヌクレオチドであって、第 1 および第 2 の核酸配列が、内部リボソーム侵入部位 ( I R E S )、または自己切断ペプチドもしくはリボソームスキッピングを引き起こすペプチドをコードする核酸によって分離される、ポリヌクレオチド。

30

【 0 7 5 7 】

3 5 9 . 第 1 の核酸配列および第 2 の核酸配列が、同じプロモータに作動可能に連結される、実施形態 3 5 8 に記載のポリヌクレオチド。

【 0 7 5 8 】

3 6 0 . 自己切断ペプチドまたはリボソームスキッピングを引き起こすペプチドをコードする核酸が、T 2 A、P 2 A、E 2 A、または F 2 A から選択される、実施形態 3 5 9 に記載のポリヌクレオチド。

40

【 0 7 5 9 】

3 6 1 . 実施形態 3 3 0 ~ 3 5 5 のいずれかに記載の単一ドメイン抗体をコードする、ポリヌクレオチド。

【 0 7 6 0 】

3 6 2 . 実施形態 3 5 6 ~ 3 6 1 のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【 0 7 6 1 】

3 6 3 . 発現ベクターである、実施形態 3 6 2 に記載のベクター。

50

## 【 0 7 6 2 】

3 6 4 . ウイルスベクターまたは真核ベクターであり、任意選択的に、真核ベクターが哺乳動物ベクターである、実施形態 3 6 2 または実施形態 3 6 3 に記載のベクター。

## 【 0 7 6 3 】

3 6 5 . 実施形態 3 5 6 ~ 3 6 1 のいずれかに記載のポリヌクレオチド (複数可)、または実施形態 3 6 2 ~ 3 6 4 のいずれかに記載のベクター (複数可) を含む、細胞。

## 【 0 7 6 4 】

3 6 6 . 細胞が、組み換えまたは単離である、実施形態 3 6 5 に記載の細胞。

## 【 0 7 6 5 】

3 6 7 . 細胞が、哺乳動物細胞である、実施形態 3 6 6 に記載の細胞。 10

## 【 0 7 6 6 】

3 6 8 . ポリペプチドを産生する方法であって、細胞に、実施形態 3 5 6 ~ 3 6 1 のいずれかに記載のポリヌクレオチド (複数可)、または実施形態 3 6 2 ~ 3 6 4 に記載のベクター (複数可) を導入することと、多重特異性ポリペプチド構築物を産生するための条件下で細胞を培養することと、を含む、方法。

## 【 0 7 6 7 】

3 6 9 . 細胞からポリペプチドを単離または精製することをさらに含む、実施形態 3 6 8 に記載の方法。

## 【 0 7 6 8 】

3 7 0 . 実施形態 3 6 8 または実施形態 3 6 9 に記載の方法によって産生される、ポリペプチド。 20

## 【 0 7 6 9 】

3 7 1 . 実施形態 2 2 0 ~ 2 7 5 のいずれかに記載の結合分子または実施形態 3 3 0 ~ 3 5 5 のいずれかに記載の単一ドメイン抗体を含む結合分子を含む、操作された免疫細胞であって、任意選択的に、結合分子が、細胞から分泌可能である、操作された免疫細胞。

## 【 0 7 7 0 】

3 7 2 . キメラ抗原受容体 ( C A R ) をさらに含む、実施形態 3 7 1 に記載の操作された細胞。

## 【 0 7 7 1 】

3 7 3 . 細胞が、リンパ球である、実施形態 3 7 1 または実施形態 3 7 2 に記載の操作された免疫細胞。 30

## 【 0 7 7 2 】

3 7 4 . 細胞が、T細胞またはナチュラルキラー ( N K ) 細胞である、実施形態 3 7 2 または 3 7 3 に記載の操作された免疫細胞。

## 【 0 7 7 3 】

3 7 5 . C A R が、T A A に結合する抗原結合ドメインを含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む、実施形態 3 7 2 ~ 3 7 4 のいずれかに記載の操作された免疫細胞。

## 【 0 7 7 4 】

3 7 6 . 細胞内シグナル伝達ドメインが、免疫受容体チロシン活性化モチーフ ( I T A M ) シグナル伝達ドメインを含み、任意選択的に、細胞内シグナル伝達ドメインが、C D 3 ゼータシグナル伝達ドメイン、任意選択的にヒト C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインであるか、またはそれを含む、実施形態 3 7 5 に記載の操作された免疫細胞。 40

## 【 0 7 7 5 】

3 7 7 . 細胞内シグナル伝達ドメインが、共刺激分子のシグナル伝達ドメインをさらに含む、実施形態 3 7 6 に記載の操作された免疫細胞。

## 【 0 7 7 6 】

3 7 8 . 実施形態 2 2 0 ~ 2 7 5 のいずれかに記載の P D - 1 結合ポリペプチド、実施形態 2 7 6 ~ 3 2 9 のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物、実施形態 3 3 0 ~ 3 5 5 のいずれかに記載の単一ドメイン抗体、または実施形態 3 7 1 ~ 3 7 7 のいずれ 50

かに記載の操作された免疫細胞を含む、医薬組成物。

【0777】

379．薬学的に許容される担体を含む、実施形態378に記載の医薬組成物。

【0778】

380．滅菌されている、実施形態378または実施形態379に記載の医薬組成物。

【0779】

381．対象における免疫応答を刺激または誘発する方法であって、それを必要とする対象に、実施形態220～275のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド、実施形態276～329のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物、実施形態330～355のいずれかに記載の単ドメイン抗体、または実施形態371～377のいずれかに記載の操作された免疫細胞、または実施形態378～380に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

10

【0780】

382．免疫応答が、腫瘍または癌、任意選択的にPD-1を発現する腫瘍または癌に対して増加する、実施形態381に記載の方法。

【0781】

383．方法が、対象における疾患または状態を治療する、実施形態381または実施形態382に記載の方法。

【0782】

384．対象における疾患または状態を治療する方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量の実施形態220～275のいずれかに記載のPD-1結合ポリペプチド、実施形態276～329のいずれかに記載の多重特異性ポリペプチド構築物、実施形態330～355のいずれかに記載の単ドメイン抗体、または実施形態371～377のいずれかに記載の操作された免疫細胞、または実施形態378～380に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

20

【0783】

385．疾患または状態が、腫瘍または癌である、実施形態384または実施形態385に記載の方法。

【0784】

386．当該対象が、ヒトである、実施形態381～385のいずれかに記載の方法。

30

【0785】

VIIII．実施例

以下の実施例は、例示の目的にのみ含まれ、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0786】

Example 1: PD-1 sdAbの生成

ヒトPD-1を標的とする単ドメイン抗体を、ラマおよびアルパカの免疫化を介して生成した。ラマおよびアルパカを、以下のように記載されるヒトPD-1細胞外ドメインの組み換えバージョン(ECD、配列番号286に記載されるヒトPD-1のアミノ酸25～167、例えば、UniProt番号Q15116)で免疫化した。

40

L D S P D R P W N P P T F S P A L L V V T E G D N A T F T C S F S N T S E S F V  
L N W Y R M S P S N Q T D K L A A F P E D R S Q P G Q D C R F R V T Q L P N G R  
D F H M S V V R A R R N D S G T Y L C G A I S L A P K A Q I K E S L R A E L R V  
T E R R A E V P T A H P S P S P R S A G Q F Q

【0787】

特異的な抗PD1抗体力価の発現に続いて、ラマ/アルパカ末梢血単核細胞(PBMC)を、免疫化した動物由来の500mLの血液から単離し、Qiagen RNeasy Maxi Kitを使用して総mRNAを単離し、その後、Thermo Superscript IV Reverse Transcriptaseおよびオリゴ-dTプライミングを使用して第1の鎖cDNAに変換した。単ドメイン抗体(sdAb、VHHと

50

も呼ばれる)配列を、鋳型としてcDNAを使用してPCRを介して特異的に増幅し、sdAb-Fc-AGA2融合タンパク質として酵母表面提示ベクターにクローニングした。Fcは、ヒトIgG1 Fc(配列番号8に記載される)であった。

【0788】

これらのsdAbを提示する酵母ライブラリーを、磁気ビーズ分離、続いて、蛍光活性化セルソーティング(FACS)を介して、PD-1 ECDの組み換え型を使用して濃縮した。ソーティングされた酵母を播種し、単離したコロニーを96ウェルブロックに採取し、発現を表面提示sdAb-Fcから培地への分泌に切り替えた培地中で増殖させた。例示的な同定されたsdAbを、表E1に記載する。

【表5】

クローン名	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号	VHH配列番号
18H10	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	284
1-14	GRTVSIYAMG	313	GIGWNGTTY	314	ESAAGTLGDY	315	312

【0789】

Example 2:ラクダ科由来PD-1 sdAbのヒト化

例示的なラクダ科由来PD-1 sdAb、18H10を、ヒトVH3-23生殖系列を足場として使用してヒト化した。溶解性、特異性、安定性、および/または親和性に寄与するラクダ科残基は、未修飾のままであった。加えて、すべてのヒト化バリエーションは、Leu11Glu(L11E)の修飾、ならびにSer112Lys(S112K)およびSer113Pro(S113P)のカルボキシ末端修飾を含有し、それは、これらが、sdAbに向けられた既存のADAの認識を阻害または低減することが知られているためである(US2016/0207981に記載されるように)。

【0790】

表E2は、例示的なPD-1 sdAbヒト化バリエーションに記載する。

10

20

30

40

50

【表 6】

表 E2:PD-1 sdAb ヒト化バリエーション							
クローン名	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号	VHH 配列番号
18H10 ヒト化バリエーション							
hz18H10v1	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	251
hz18H10v2	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	252
hz18H10v3	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	253
hz18H10v4	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	254
hz18H10v5	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	255
hz18H10v6	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	256
hz18H10v7	GSITGANTMG	273	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	257
hz18H10v8	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	258
hz18H10v9	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	259
hz18H10v10	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	260
hz18H10v11	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	261
hz18H10v12	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	262
hz18H10v13	GSMTGANTMG	268	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	263
hz18H10v14	GSVTGANTMG	272	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	264
hz18H10v15	GSITGANTMG	273	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	265
hz18H10v16	GSITGANTMG	273	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	266
hz18H10v17	GSITGANTMG	273	LIGNYVTH	278	YTDNLGTS	283	267

## 【 0 7 9 1 】

Example 3 : フローサイトメトリーによる PD - 1 発現細胞への sdAb の結合  
 PD - 1 発現細胞上の精製した sdAb - Fc について、特異性および相対親和性を評価した。293 個の細胞の一過性トランスフェクションについては、Free Style 293 細胞を、新鮮な Free Style 293 発現培地中で  $1 \times 10^6$  細胞 / mL において再懸濁した。細胞を、トランスフェクション当たり 50 mL に播種し、37 °C において振盪器上でインキュベートしながら、トランスフェクション試薬を調製した。50  $\mu$ g の各トランスフェクションプラスミドを、500  $\mu$ L の OptiMEM に希釈した。各トランスフェクション用の別個の管において、150  $\mu$ g のポリエチレンイミン (PEI、

10

20

30

40

50

75  $\mu$ Lの2 mg/mL溶液)を、500  $\mu$ LのOptiMEMに添加し、次いでDNA:OptiMEM溶液と1:1で混合した。DNAおよびPEIを室温で15分間複合体化した。次いで、DNA:PEI複合体を、FreeStyle293細胞の調製したフラスコに滴下し、回転によって混合した。トランスフェクトした細胞を37の振盪器で一晩インキュベートし、タンパク質発現のための時間を取った。使用したトランスフェクションプラスミドは、ヒト、カニクイザル、およびマウス起源のシトリンタグ付き完全長PD1タンパク質をコードした。

#### 【0792】

実施例1および実施例2に記載される例示的なPD-1-sdAb-Fc融合タンパク質の結合を、一過性にトランスフェクトしたPD-1発現細胞を使用してフローサイトメトリーによって評価した。トランスフェクトされていないFreeStyle293細胞または一過性にトランスフェクトしたFreeStyle293細胞を、FACS緩衝液(1xTBS、0.01% FBS、0.002%アジ化ナトリウム)中で $0.5 \times 10^6$ 細胞/mLに希釈し、96ウェル丸底アッセイプレート中で100  $\mu$ L/ウェルで播種した。アッセイプレートを約750 rpmで5分間遠心分離し、次いで上清を除去し、一次抗体希釈物を以下のように添加した。滴定希釈抗体を、293個の細胞を含むアッセイプレートに添加した。細胞を抗体希釈物中で4において30分間インキュベートした。30分間のインキュベーション後、アッセイプレートを約750 rpmで5分間遠心分離し、150  $\mu$ LのFACS緩衝液で洗浄し、約750 rpmで5分間再び遠心分離した。洗浄液を除去し、FACS緩衝液中で1:1000に希釈した50  $\mu$ L/ウェルのAlexa Fluor 647コンジュゲートロバ-抗ヒトIgGを添加し、4で20分間インキュベートした。次いで、アッセイプレートを750 rpmで5分間遠心分離し、150  $\mu$ LのFACS緩衝液で洗浄し、750 rpmで5分間再び遠心分離した。洗浄液を除去し、フローサイトメトリー(iQue Intellicyte)による分析のために、細胞を30  $\mu$ L/ウェルのFACS緩衝液中に再懸濁した。

#### 【0793】

例示的な結果を、ヒトPD-1発現細胞(huPD1-FL293)、カニクイザルPD-1発現細胞(cynoPD1-FL293)、マウスPD-1発現細胞(muPD1-FL293)、または非発現(UT293)細胞に結合するための18H10(ラマ由来の親、配列番号284)、18H10のヒト化バリエーション(配列番号251~257、259~260、および262~266)、または1-14(配列番号312)について図1A~図1Gに記載する。

#### 【0794】

Example 4: フローサイトメトリーによる活性化ヒトT細胞へのPD-1 sdAbの結合の評価

フローサイトメトリーによって、活性化ヒトT細胞へのPD-1-sdAb-Fc融合タンパク質の結合を評価した。

#### 【0795】

ヒトT細胞の濃縮および活性化のために、密度勾配遠心分離を使用して、末梢血単核細胞(PBMC)をヒトドナー血液から単離した。血液試料をPBS/2%FBS(1:2)で希釈し、30 mLの希釈血液を15 mLのLymphoprep密度勾配培地上に層状にした。遠心分離後、血漿とLymphoprepとの相間におけるPBMC層を除去し、残りの赤血球を、赤血球溶解緩衝液を使用して室温で5分間溶解した。非T細胞集団を、CD14、CD16、CD19、CD20、CD36、CD56、CD123、TCR  $\alpha/\beta$  に対するビオチン化抗系統マーカー抗体で標識し(20分間、室温)、磁気ストレプトアビジン粒子を使用して枯渇させた。T細胞画分を含有する非結合細胞上清を保持した。濃縮したヒトT細胞を、1  $\mu$ g/mLのマウス抗ヒトCD3(OKT3)でコーティングした組織培養プレート中で、1 mLの培地当たり約 $2 \times 10^6$ 細胞の密度で播種することによって、それらを3日間活性化した。活性化T細胞を、結合アッセイでさらに使用する前にPBS中で1回洗浄した。

10

20

30

40

50

## 【0796】

活性化ヒトT細胞への結合について、167 nM ~ 0.00847 nMに及ぶ4倍10点連続希釈の18H10（配列番号284）、ヒト化18H10（h z v 7、配列番号257）、または1-14（配列番号312）をインキュベーションのために使用したことを除いて、実質的に実施例3のようにフローサイトメトリーによって、結合を評価および定量化した。図2に示すように、試験した例示的なPD-1標的構築物およびヒト化バリアントは、濃縮および活性化したヒトT細胞に結合することが分かった。

## 【0797】

Example 5：レポーターアッセイを使用したPD-1/PD-L1遮断の評価

TCR関与がルシフェラーゼレポーター遺伝子の転写をもたらすPD-1発現Jurkatエフェクターレポーター細胞株を使用して、PD-1を標的とする例示的なsdAbがPD-1とPD-L1との相互作用を遮断する能力を評価した。アッセイでは、PD-L1発現aAPC/CHOK1細胞をJurkatレポーター細胞と共培養して、TCR特異的活性化シグナルを提供すると同時に、エフェクター細胞上のPD-1の関与を通してこのシグナルを抑制した。PD-1 sdAbが抑制されたシグナルを遮断し、TCR関与を強化する能力をモニタリングした。

10

## 【0798】

PD-L1発現aAPC/CHOK1細胞を、アッセイの1日前に、10% FBSで補充した100 μLのHam's F12に播種した。アッセイの当日、すべての培地を廃棄し、18H10（配列番号41）またはヒト化18H10（h z v 7、配列番号14）（開始濃度：50 nM、滴定1：4）を含有する試験タンパク質の滴定を含有する、40 μLのアッセイ培地（RPMI 1640、1% FBSで補充）で置き換えた。次いで、Jurkat PD-1レポーター細胞をプレート（40 μL）に添加し、プレートを6時間インキュベートした（37℃、加湿雰囲気中5% CO<sub>2</sub>）。インキュベーション後、等体積のBioGlo Luciferase Assay Substrateをウェルに添加し、室温で10分間インキュベートし、発光を評価および分析した。

20

## 【0799】

図3Aおよび図3Bに示すように、例示的な試験したタンパク質18H10（配列番号284）、ヒト化18H10（h z v 7、配列番号257）、または1-14（配列番号312）によるPD-1/PD-L1の遮断が、TCR関与およびルシフェラーゼ転写の存在によって示されるように観察された。

30

## 【0800】

Example 6：抗PD-1 sdAbを用いて、TAA標的された拘束されたCD3結合タンパク質を産生する方法

拘束されたCD3結合を示すジスルフィド安定化抗CD3 Fv結合領域、ヘテロ二量体Fcドメイン、Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられた1つ以上のTAA抗原結合ドメイン、およびFc領域に対してアミノ末端に、かつ/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられた、PD-1に対する単一ドメイン抗体（sdAb）を含有する阻害受容体結合領域（IRBR）を含有する、多重特異性ポリペプチド構築物を生成した。場合によっては、Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置付けられた、例えば41BBに対する少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）を含有するように、多重特異性ポリペプチド構築物を生成した。

40

## 【0801】

例示的な構築物では、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の少なくとも第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドを生成し、発現のためにプラスミドにクローニングした。第1のポリペプチド鎖は、概して、N末端からC末端への順序で、Fcホールポリペプチド（例えば、配列番号112または場合によっては配列番号114に記載される）、プロテアーゼの1つ以上の基質認識部位を含有するような切断可能または切断不可能なリンカー、およびdsFv抗CD3抗体の可変軽鎖

50

(V L)ドメイン(例えば、配列番号285に記載される)を含んだ。第2のポリペプチド鎖は、概して、N末端からC末端への順序で、Fcノブポリペプチド(例えば、配列番号105または場合によっては配列番号109に記載される)、第1のポリペプチド鎖と同じ切断可能なリンカーまたは同じ切断不可能なリンカー、およびdsFv抗CD3抗体の可変重鎖ドメイン(例えば、配列番号47に記載される)を含んだ。グランザイムBの基質認識部位を含有する、例示的な切断不可能なリンカー、GGGGSGGGGGSGGGGS(配列番号127)、または例示的な切断可能なリンカー、

【化4】

**GGSGGGGIEPDIGGSGGS**

10

(配列番号171)を有する構築物を生成した。ポリペプチド鎖の一方または両方はさらに、様々な配置で、Fcドメインのアミノ末端および/もしくはCD3結合領域のカルボキシ末端のPD-1sdAb(例えば、配列番号284もしくは配列番号257)、ならびに/またはFcドメインのアミノ末端および/もしくはCD3結合領域の4-1BBsdAb(例えば、配列番号210)共刺激受容体結合ドメインをコードした。

【0802】

ヘテロ二量体の拘束されたCD3結合タンパク質の各鎖をコードする別個のプラスミドを、ポリエチレンイミンを使用して等モル比で哺乳動物細胞(HEK293またはCHOのいずれか)に一過性にトランスフェクトした。上清中に分泌した組換えタンパク質を3~7日後に採取し、分泌した組み換えタンパク質をプロテインAクロマトグラフィー、続いて、分取サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)またはフロースルー疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)のいずれかによって精製した。位置I253RまたはH435Rのヘテロ二量体Fc(通常はホール-Fc)の1つの鎖へと設計された変異(それがプロテインAに結合しないような)によって、ヘテロ二量体タンパク質を選択的に精製した。SEC(Superdex-200樹脂を用いたAKTA)またはFT-HIC(ブチル/フェニルセファロースを用いたAKTA)上の第2のクロマトグラフィーステップを使用して、より疎水性であり、予測した分子量の2倍であった2つのヘテロ二量体Fcを含有するクロスペア種を除去した。

20

【0803】

方法は、ヘテロ二量体Fcの適切に対になった種、ならびに記載されるようなジスルフィド安定化抗CD3Fv(例えば、配列番号47に記載される変異G44Cを有する抗CD3VH、および配列番号285に記載される変異G100Cを有するVL)を含有する、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の産生に有利に働く。精製したヘテロ二量体の拘束されたCD3結合タンパク質は安定しており、4での長時間のインキュベーションまたはタンパク質濃度の増加時にクロスペア種を蓄積しなかった。

30

【0804】

本発明は、例えば、本発明の様々な態様を説明するために提供される、特定の開示された実施形態の範囲に限定されることを意図していない。記載される組成物および方法に対する様々な修正は、本明細書の記載および教示から明らかになるであろう。そのような変化は、本開示の真の範囲および趣旨から逸脱することなく実施され得、本開示の範囲内に入るものが意図される。

40

【表 7 - 1】

配列

#	配列	注釈
1	GGSGGS	(GGS)2 リンカー
2	GGSGGSGGS	(GGS)3 リンカー
3	GGSGGSGGSGGS	(GGS)4 リンカー
4	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGS)5 リンカー
5	GGGG	グリシンリンカー
6	GGGGG	グリシンリンカー
7	GGGGGG	グリシンリンカー
8	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	ヒト IgG1 Fc
9	PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRRWQQNV FSCSVMEAL HNHYTQKSLS LSPGK	Fc xELL
10	PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK	ヒト IgG2 Fc
11	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST FRVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRFTQK SLSLSPGK	ヒト IgG3 Fc
12	PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLTK	ヒト IgG4 Fc
13	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH	ヒト IgG4 Fc

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

#	配列	注釈
	EALHNHYTQK SLSLSLGK	
14	EPKSSDKTHTCPPC	修飾 IgG1 ヒンジ
15	DKTHTCPPC	切断 IgG1 ヒンジ
16	ESKYGPCPPC	修飾 IgG4 ヒンジ
17	GQGLVTVKPGG	カルボキシ末端 配列
18	GQGLVTVPEGG	カルボキシ末端 配列
19	QVQLVQSGGG VVQPGRSLRL SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGY INPSRGYTNV NQKVKDRFTI SRDNSKNTAF LQMDSLRPED TGVYFCARYY DDHYCLDYWG QGTPVTVSS	OKT3 VH
20	DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCASSSVS YMNWYQQTPG KAPKRWIYDT SKLASGVPSR FSGSGGTDY TFTISSLQPE DIATYYCQQW SSNPFTFGQG TKLQIT	OKT3 VL
21	QVQLVQSGGG VVQPGRSLRL SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGY INPSRGYTNV NQKVKDRFTI SRDNSKNTAF LQMDSLRPED TGVYFCARYY DDHYSLDYWG QGTPVTVSS	OKT3 ヒト化 VH
22	DVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGQGLEWIGY INPSRGYTNV ADSVKGRFTI TTDKSTSTAY MELSSLRSED TATYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTVTVSS	OKT3 ヒト化 VH
23	QVQLVQSGAE LKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGQCLEWIMGY INPSRGYTNV NQKFKDKATL TADKSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARYY DDHYSLDYWG QGTLVTVSS	OKT3 ヒト化 VH
24	QIVLTQSPAI MSASPGKVT MTCASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEIN	OKT3 ヒト化 VL
25	DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQSVS YMNWYQQKPG KAPKRWIYDT SKVASGVPAR FSGSGGTDY SLTINSLEAE DAATYYCQQW SSNPLTFGGG TKVEIK	OKT3 ヒト化 VL
26	DIQLTQSPSI LSASVGRVT ITCRASSSVS YMNWYQQKPG KAPKRWIYDT SKVASGVPIR FSGSGGTEY TLTISSMQPE DFATYYCQQW	OKT3 ヒト化 VL

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

#	配列	注釈
	SSNPLTFGCG TKVEIKRT	
27	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNLIKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLTVTVSA	抗 CD3 Hv
28	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEATYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 Lv
29	TYAMN	抗 CD3 VH CDR1
30	RIRSKYNNYATYYADSVKD	抗 CD3 VH CDR2
31	HGNFGNSYVSWFAY	抗 CD3 VH CDR3
32	RSSTGAVTTSNYAN	抗 CD3 VL CDR1
33	GTNKRAP	抗 CD3 VL CDR2
34	ALWYSNLWV	抗 CD3 VL CDR3
35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVGRIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLIKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH1
36	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNLIKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH2
37	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNLIKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH3
38	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNLIKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH4
39	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNLIKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH5
40	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKLEWVSRIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH6
41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKLEWVGRIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVS WFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH7
42	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLIKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYIS YWAYWGQGLTVTVS	抗 CD3 VH8
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH9

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

#	配列	注釈
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVS YFAYWGQGTITVTVSS	抗 CD3 VH10
45	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNKLTEDTAMYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVSS	抗 CD3 VH11
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVKP	抗 CD3 VH12
47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVKP	抗 CD3 VH13
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVKP	抗 CD3 VH14
49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVSS	抗 CD3 VH15
50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVSS	抗 CD3 VH16
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVSS	抗 CD3 VH17
52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVSS	抗 CD3 VH18
53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVSRIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVSS	抗 CD3 VH19
54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVSRIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVSS	抗 CD3 VH20
55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKCLEWVGRIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVSS	抗 CD3 VH21
56	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNKLTEDTAMYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVSS	抗 CD3 VH22
57	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNKLTEDTAMYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVSS	抗 CD3 VH23
58	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNKLTEDTAMYYCVRHGNFNGNSYVS WFAYWGQGTITVTVSS	抗 CD3 VH24
59	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSKY	抗 CD3 VH25

10

20

30

40

50

【表 7 - 5】

#	配列	注釈
	NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNLSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLVTVSS	
60	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKCLEWVSRIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLVTVSS	抗 CD3 VH26
61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKCLEWVGRIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVS WFAYWGQGLVTVSS	抗 CD3 VH27
62	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKCLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYIS YWAYWGQGLVTVSS	抗 CD3 VH28
63	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKCLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH29
64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKCLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS YFAYWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH30
65	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKCLEWVARIRSKY NNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNLSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLVTVSS	抗 CD3 VH31
66	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPDHLFTGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGKLTVL	抗 CD3 VL1
67	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYICALWYSNLWVFGGKLEIK	抗 CD3 VL2
68	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNK RAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYICALWYSNLWVFGGKLTVL	抗 CD3 VL3
69	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQTPGQAFRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIFCALWYSNLWVFGGKLTVL	抗 CD3 VL4
70	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQTPGQAFRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESIFCALWYSNLWVFGGKLTVL	抗 CD3 VL5
71	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQTPGQAFRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESIDYICALWYSNLWVFGGKLTVL	抗 CD3 VL6
72	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYICALWYSNLWVFGGKLTVL	抗 CD3 VL7
73	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTSGNPNWVQKPGQAPRGLIGGTF LAPGTPARFSGSLLGGKAALTISGVQPEDEADYICVWYSNRWVFGGKLTVL	抗 CD3 VL8
74	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYICALWYSNLWVFGGKLEIK	抗 CD3 VL9
75	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYICALWYSNLWVFGGKLEIK	抗 CD3 VL10
76	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQCFRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYICALWYSNLWVFGGKLEIK	抗 CD3 VL11
77	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPDHLFTGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGKLTVL	抗 CD3 VL12
78	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPKGKSPRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEADYICALWYSNLWVFGGKLEIK	抗 CD3 VL13

10

20

30

40

【表 7 - 6】

#	配列	注釈
79	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNK RAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYICALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL14
80	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIFYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗 CD3 VL15
81	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESIFYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL16
82	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESIFYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL17
83	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYICALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL18
84	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYICVLWYSNRWVFGCGTKLTVL	抗 CD3 VL19
85	QVQLQESGGG LVQAGGSLRL SCAASGRTFS NYHMGWFRQA PGKERELVAA ISGSGGSTYY TDSVKGRFTI SRNNAKNTMS LQMSNLKPED TGVVYCTTPT EKGSSIDYWG QGTQVTVSSG RYPYDVPDY	抗 CD3 VHH
86	QLQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDNYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSD GSTYYADSVKGRFTISRNNAKGTVYLLMNSLKPEDTAVYYCATELVPACTYSNGR GPLDGMIDYWGKGTQVTVKP	FR アルファ sdAb
87	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGIFSIDATAWYRQAPGKQRELVAITSSG STNYPESVKGRFTISRDNKNTVYLLQMSLRAEDTAVYYCNAITRYGGSTYDFWG QGTLVTVKP	FR アルファ sdAb
88	EVQPGGSLRLSCAASSETFGVFTLWYRQAPGKGRFVARVTGTDVYAESVKG RFTISSDFARNTVYLLQMSLRAEDTAVYYCNTGAYWGQGLTVTVKP	FR アルファ sdAb
89	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFILDYIAIGWFRQAPGKEREGVLCIDASD DITYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLLQMSLKPEDTGVYYCATPIGLSSSCLELY DYDYWGQGLTVTVKP	cMET sdAb
90	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGD GDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARNVFDGYWLVYWG QGTLVTVSSGGGGGGGGTGGGSDIVMTQTPLSLPVTPEPASISCRSSKSL HSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYCAQNELELPYTFGGGKVEIK	CD20 scFv
91	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR IFPGDGDY NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV FDGYWLVYWG QGTLVTVSS	CD20 VH
92	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSL HSNGITYLYW YLQKPGQSPQLLIYQMSNLV SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNELELPYTFGGGKVE IKRTV	CD20 VL
93	QVQLQESGGLVQKPSSETLSLTCTVSGGSSISSYWSWIRQPPGKLEWIGYVYYSG TTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCASIATVGFYFDYWGQ GTLVTVSSGGGGGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERVTLSCRASQRVNNN YLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVY YCQQYDRSPLTFGGGKLEIK	DLL3 scFv
94	QVQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGGSSIS SYYWSWIRQP PGKLEWIGYVYYSGTTNYPN PSLKSRTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCASIAV	DLL3 scFv

10

20

30

40

50

【表 7 - 7】

#	配列	注釈
	TGFYFDYWQQ GTLVTVSSGG GSGGGGSGG GGSEIVLTQS PGTLLSPGERVTLSCRASQ RVNNNYLAWY QQRPGQAPRL LIYGASSRAT GIPDRFSGSG SGTDFTLTIS RLEPEDFAVY YCQQYDRSPL TFGGGTKLEI K	
95	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTFTNYGMNWKQAPGKGLKMMAWINTYT GEPTYADDFKGRFAFSLETSASTASLQI INLKNEDTATYFCARIGDSSPSDYWGQ GTTLTVSSSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSC	DLL3 Fd
96	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVSNDVVWYQKPGQSPKLLIYASNRY TGVPDRFAGSGYGTDFSTISTVQAEDLAVYFCQQDYTSPTWTFGGGTKLEIRRTV AAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	DLL3 LC
97	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSKAASGFTFTNYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKS NNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMYLVQMNKLTEDTAMYCVRQWDYDVRAMN YWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP EPKSC	5T4 Fd
98	DIVMTQSHIFMSTSVGDRVSIITCKASQDQVDTAVAWYQKPGQSPKLLIYWASTRL TGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGTKLEIKRTV AAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	5T4 LC
99	EVQLVESGGGL VQPKGSLKLS CAASGFTFTNT YAMNWRQAP GKGLEWVARI RSKSNYATY YADSVKDRFT ISRDDSQSMY YLQMNKLTKE DTAMYCVRQ WDYDVRAMNY WGQGTSTVTS S	抗 5T4 VH
100	DIVMTQSHIF MSTSVGDRVS ITCKASQDQVDTAVAWYQKPGQSPKLLIYWASTRL GQSPKLLIYW ASTRLTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISNVQSEDLADYFCQQ YSSYPYTFGG GTKLEIK	抗 5T4 VL
101	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSFNYYWSWIRHHPGKLEWIGYIYY SGSTYSNPSLKRVTISVDTSKNQFSLTSSVTAADTAVYVCARGYNNYFDYWG QGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP KSC	gpNMB Fd
102	EIVMTQSPATLSPGERATLSCRASQSDNNLVWYQKPGQAPRLLIYGASTRA TGIPARFSGSGGTEFTLTISLQSEDFAVYCCQYNNWPPWTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	gpNMB LC
103	DKHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYDGVVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP AIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPT	ノブ Fc
104	DKHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYDGVVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP AIEKTIISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKS	ホール Fc

10

20

30

40

【表 7 - 8】

#	配列	注釈
	L S L S P T	
105	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPT	ノブ Fc
106	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSDGFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPT	ホール Fc
107	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NYYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	ノブ Fc
108	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NYYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGSDGFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	ホール Fc
109	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	ノブ Fc
110	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSDGFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG	ホール Fc
111	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NYYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGSDGFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNRYTQKS LSLSPT	ホール Fc
112	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSDGFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNRYTQKSLSL SPT	ホール Fc
113	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NYYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSGSDGFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNRYTQKS LSLSPG	ホール Fc

10

20

30

40

50

【表 7 - 9】

#	配列	注釈
114	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNRYTQKSLSL SPG	ホール Fe
115	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVVHEALHNHYTQKS LSLSPT	ノブ Fe
116	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVVHEALHNHYTQKSLSL SPT	ノブ Fe
117	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVVHEALHNHYTQKS LSLSPT	ノブ Fe
118	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVVHEALHNHYTQKSLSL SPG	ノブ Fe
119	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVVHEALHNRYTQKS LSLSPT	ホール Fe
120	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVVHEALHNRYTQKSLSL SPT	ホール Fe
121	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVVHEALHNRYTQKS LSLSPT	ホール Fe
122	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVVHEALHNRYTQKSLSL SPG	ホール Fe
123	(GGGS) <sub>n</sub> 、式中、nは1~5である	リンカー

10

20

30

40

50

【表 7 - 10】

#	配列	注釈
124	(GGGGGS) <sub>n</sub> 、式中、nは1~4である	リンカー
125	GGGGGS	リンカー
126	GGGGGS	リンカー
127	GGGGSGGGGSGGGGS	リンカー
128	GGGSGGGGSGGGGS	リンカー
129	GGSGGGGSGGGGSGGGGS	リンカー
130	GlyxXaa-Glyy-Xaa-Glyz Xaaは、A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D、またはEから独立して選択され、 x、y、およびzは各々、1~5の範囲の整数である	リンカー
131	Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly Xaaは、A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、H、D、またはEから独立して選択される	リンカー
132	(SSSSG) <sub>n</sub> n=1-9	リンカー
133	GGGGG-C-GGGG	リンカー
134	(EAAAK) <sub>n</sub>	リンカー
135	AS-(AP) <sub>n</sub> -GT n=2-20	リンカー
136	AS-(EAAAK) <sub>n</sub> -GT n=2-20	リンカー
137	(GGGA) <sub>n</sub> n=2-20	リンカー
138	(PGGS) <sub>n</sub> n=2-20	リンカー
139	(AGGS) <sub>n</sub> n=2-20	リンカー
140	GG-(EGKSSGSGSEKST) <sub>n</sub> -GG n=2-20	リンカー
141	SSASASSA	リンカー
142	GSPGSPG	リンカー
143	ATTGSSPGPT	リンカー
144	X1 X2 X3 X4 X5(P4 P3 P2 P1 ↓ P1') X1=I、L、Y、M、F、V、またはA;(P4=I、L、Y、M、F、V、またはA) X2=A、G、S、V、E、D、Q、N、またはY;(P3=A、G、S、V、E、D、Q、N、またはY) X3=H、P、A、V、G、S、またはT;(P2=H、P、A、V、G、S、またはT) X4=DまたはE;(P1=DまたはE) X5=I、L、Y、M、F、V、T、S、G、またはA(P1'=I、L、Y、M、F、V、T、S、G、またはA)	リンカーコンセンサス
145	X1 E X3 D X5(P4 P3 P2 P1 ↓ P1') X1=IまたはL;(P4=IまたはL) (P3=E) X3=PまたはA;(P2=PまたはA)	リンカーコンセンサス

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 1】

#	配列	注釈
	X5=I、V、T、S、またはG(P1' =I、V、T、S、またはG)	
146	LEAD	グランザイム B 基質
147	LEPD	リンカー
148	LEAE	リンカー
149	IEPDI	リンカー
150	LEPDG	リンカー
151	LEADT	リンカー
152	IEPDG	リンカー
153	IEPDV	リンカー
154	IEPDS	リンカー
155	IEPDT	リンカー
156	X1QARX5(P1QAR ↓ (A/V)) X1=任意のアミノ酸; (P1 は任意のアミノ酸) X5=A または V	リンカーコンセンサス
157	RQARX5(RQAR(A/V)) X5=A または V	リンカー
158	RQAR	マトリプターゼ 基質
159	RQARV	リンカー
160	X1X2 X3 X4(P3 P2 P1 ↓ P1' ) X1=P、V、またはA; (P3=P、V、またはA) X2=Q または D; (P2=Q または D) X3=A または N; (P1=A または N) X4=L、I、またはM(P1' =L、I、またはM)	リンカーコンセンサス
161	PX2X3X4(P3 P2 P1 ↓ P1' ) (P3=P) X2=Q または D; (P2=Q または D) X3=A または N; (P1 は A または N) X4=L または I(P1' は L または I)	リンカーコンセンサス
162	PAGL	MMP 基質
163	TGLEADGSPAGLGRQARVG	リンカー
164	TGLEADGSRQARVGPAGLG	リンカー
165	TGSPAGLEADGSRQARVGS	リンカー
166	TGPAGLGLEADGSRQARVG	リンカー
167	TGRQARVBLEADGSPAGLG	リンカー
168	TGSRQARVGPAGLEADGS	リンカー
169	TGPAGLGSRQARVBLEADGS	リンカー
170	GPAGLGLEPDGSRQARVG	リンカー
171	GGSGGGIEPDIGGSGGS	リンカー
172	GGSGGGLEADTGGSGGS	リンカー
173	GSIEPDIGS	リンカー
174	GSLEADTGS	リンカー
175	GGSGGGIEPDGGSGGS	リンカー
176	GGSGGGIEPDVGGSGGS	リンカー

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 2】

#	配列	注釈
177	GGSGGGIEPDSGGSGGS	リンカー
178	GGSGGGIEPDTGGSGGS	リンカー
179	GGGLEPDSGGGS	リンカー
180	GPAGLLEADGSRQARVG	リンカー
181	GGEGGGSGGGSGGS	リンカー
182	GSSAGSEAGGSGQAGVGS	リンカー
183	GGSGGGLEAEGSGGGGS	リンカー
184	GGSGGGIEPDPGGSGGS	リンカー
185	TGGSGGGIEPDIGSGGS	リンカー
186	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEANSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQCATVGLFRVTPEIPAGLPSRSE	41BBL
187	EVQLVQSGAEVKKPQESLRISCKGSGYSFSTYWIWVRRQMPGKLEWGMKIYPGD SYTNYSPSQGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGFIDYWGQGT LTVSS	41BB VH
188	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLYIQDKNRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFGGKTLTVL	41BB VL
189	QVQLQQWAGLLKPKSETLSLTCAVYGGSFSGYYWVIRQSPEKLEWIGEINHG YVTYNPLESRTVTSVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDYGPQNYDWYFDL WGRGTLTVSS	41BB VH
190	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRA TGIPARFSGSGSDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGKVEIK	41BB VL
191	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFSGYYMHWVRQAPGQGLEWGMWVNPMS GGTNYAQKFGQGRVITTRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREGMAMRLELDKW GGTLTVSS	41BB VH
192	SYELTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLYIYDSDRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWSSSVVFGGKTLTVL	41BB VL
193	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKYYVVGQAGNIKLRDQDPNKMMATI YELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYAIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRV VSTNYNQHAMVFFKVFVQNRREEFYITLYGRKELTSELKENFIRFSKSLGLPENH IVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリ ン
194	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKYYVVGQAGNIRLRDQDPNKMMATI YELKEDKSYDVTAVAFDDKKCMYDIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRV VSTNYNQHAMVFFKVFVQNRREEFYITLYGRKELTSELKENFIRFSKSLGLPENH IVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリ ン
195	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKYYVVGQAGNIRLRDQDPNKMMATI YELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRV VSTNYNQHAMVFFKVFVQNRREEFYITLYGRKELTSELKENFIRFSKSLGLPENH IVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリ ン
196	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKYYVVGQAGNIRLRDQDPNKMMATI YELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRV VSTNYNQHAMVFFKVFVQNRREEFYITLYGRKELTSELKENFIRFSKSLGLPENH IVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリ ン
197	QDSTDLIPA PPLSKVPLQQ NFQDNQFHGK WYVVGQAGNI KLREDSKMMAT IYELKEDKS YDVTGVSFDD KKCTYAIMTF	41BB アンチカリ ン

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 3】

#	配列	注釈
	VPGSQPGEFT LGKIKSFPGH TSSLVRVST NYNQHAMVFF KFVFNREEF YITLYGRTKE LTSELKENFI RFSKSLGLPE NHIVFPVPID QCIDG	
198	QDSTSDLIPA PPLSKVPLQQ NFDNQFHGK WYVVGQAGNI KLREDKDPVK MMATYIELKE DKSVDVTGVT FDDKKCRYDI STFVPGSQPG EFTFGKIKSF PGHTSSLVRV VSTNYNQHAM VFFKVFQNR EEFYITLYGR TKELTSELKE NFIRFSKSLG LPENHIVFPV PIDQCIDG	41BB アンチカリ ン
199	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFDNQFHGKWYVVGQAGNIRLREDKDPHKMMATI YELKEDKSYDVTGVTFFDDKKCTYAISTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPHTSSLVRV VSTNYNQHAMVFFKVFQNRREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENH IVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリ ン
200	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFDNQFHGKWYVVGQAGNIKREDKDPNKMMATI YELKEDKSYDVTGVTFFDDKKCTYAISTLVPGSQPGEFTFGKIKSFPHTSSLVRV VSTNYNQHAMVFFKVFQNRREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENH IVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリ ン
201	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFDNQFHGKWYVVGQAGNIRLREDKDPKMMATI YELKEDKSYDVTAVTFFDDKKCTYAISTFVPGSQPGEFTLGKIKSFPHTSSLVRV VSTNYNQHAMVFFKVFQNRREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENH IVFPVPIDQCIDG	41BB アンチカリ ン
202	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト 41BBL の 71~254
203	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAG VYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL PSRSE	ヒト 41BBL の 85~254
204	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGLPSRSE	ヒト 41BBL の 80~254
205	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト 4-1BBL の 52~254
206	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLS YKEDTKELVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGL	ヒト 41BBL の 71~248
207	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAG VYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト 41BBL の 85~248
208	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV VAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI	ヒト 41BBL の 80~248

10

20

30

40

【表 7 - 1 4】

#	配列	注釈
	PAGL	
209	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRVAVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFGRLHLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLFRVTPEIPAGL	ヒト 41BBL の 52~248
210	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMGWYRQAPGKRREFVAAIESGRNTVYAESVKGRFTISRDNKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCGLLKGNRVVSVAIWGQGTLLVTVKP	41BB sdAb
211	QVSHRYPRIQSIVKQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNSVIINCDGFYLIISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
212	QVSHRYPRFQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRVNSLMV ASLTYKDVY LVNVTDDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
213	QVSHRYPRIQSIVKQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNSVIINCDGFYLIISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
214	QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNISLHYQ KDEEPLFQLK KVRVNSLMV ASLTYKDVY LVNVTDDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	OX40 リガンド
215	VSHRYPRIQSIVKQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNSVIINCDGFYLIISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
216	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTDSYMSWVRQAPGQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVITITRDTSTAYLELSSLRSEDVAVYYCVLAPRWYFSVWGQGLTVTVSS	OX40 VH
217	DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQDINYNLWYQQKPKGKAPKLLIYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQGHSLPPTFGQGTKEIKRT	OX40 VL
218	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKLEWVGRIRSKANSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTSGIYDSSGYDYWGQGTLLVTVSS	OX40 VH
219	DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLHNSGYNLWDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYVYCMQALQTPITFGGGTKVEIK	OX40 VL
220	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAFMYWVRQAPGKLEWVSSISNRGLKTAYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCSRVDVGDVFRGQGTLLVTVKP	OX40 sdAb
221	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKKNDMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLLKNNYWGIIILLANPQFIS	GITR リガンド
222	QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVASISSGTTYYPDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGYDSDMDYWGQGTLLVTVSS	GITR VH
223	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASEVDNYGVSMNWYQQKPGQAPRLLIYAA	GITR VL

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 5】

#	配列	注釈
	SNQCSGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTKVEVTWTFGQGTKVEIK	
224	QVTLRESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSSTSGMVGWIRQPPGKALEWLAHIWW DDDKYYQPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCARTRRYFPFAYWG QGTLVTVSS	G1TR VH
225	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVGTNVAWYQQKPGQAPRLLIYSASYRY SGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNTDPLTFGGGTKVEIK	G1TR VL
226	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSISSGGYFWSWIRQPPGKLEWIGYIYY SGTTYNPSLKSRLTISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDLFYYDTSGPR GFDPWGQGLVTVSS	G1TR VH
227	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQTVSSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGSSTR ATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDSSPWTFGQGTKVEIK	G1TR VL
228	QVQLVESGGGVVQPGRSLRSLCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVIYWPG SNKYAASVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGELGRYYYYGM DVWGGQGLVTVSS	G1TR VH
229	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTCRASQGIKRDNLGWYQQKPKGKAPKRLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQHNYPWTFGQGTKVDIK	G1TR VL
230	EVQLLESGGGEVQPGGSLRSLCAASGSVFSIDAMGWYRQAPGKRELVAVLSGIS SAKYAASAPGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCYADVSTGWGRDAHGY WGQGLVTV	G1TR sdAb
231	UniProt 番号 P32970	CD70-ECD
232	QVQLVESGGGVVQPGRSLRSLCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKLEWVAVIYWDG SNKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGNWGFDDYWG QGTLVTVSS	CD70 VH
233	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTCRASQGISRWLAWYQQKPKGKAPKSLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGTKVEIK	CD70 VL
234	QVQLQESGGGLVQPGGSLRSLCAASGTFISINGMWYRQAPGKERELVAGLTSGG SVTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCRAEIFTRTGENYYG MDYWGKGTQVTVKP	ICOS sdAb
235	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLCAASGRMFSNYAMGWFRQAPGKEREFVAAINRR DAADYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRRDD YNYWGQGLVTVKP	CD28 sdAb
236	RVKFSRSADAPAYQQGQNLQYLNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDYDALHMQUALP PR	CD3 ゼータシグ ナル伝達ドメイ ン
237	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB 由来共刺 激ドメイン
238	SKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 由来共刺激 ドメイン
239	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 由来共刺激 ドメイン2
240	FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 由来共刺激 ドメイン3
241	KPTTTPAPRPPTAPTASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFASDIYIWAPLA GTCGVLLLSLVITLYC	CD8 由来ヒンジ および膜貫通ド メイン

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 6】

#	配列	注釈
242	AKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCG VLLLSLVIT	CD8 由来ヒンジ および膜貫通ド メイン
243	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLA GTCCVLLLSLVIT	CD8 ヒンジおよ び膜貫通ドメイ ン
244	GGSGGS	(GGS)2 リンカー
245	GGSGSGGS	(GGS)3 リンカー
246	GGSGSGGSGGS	(GGS)4 リンカー
247	GGSGSGGSGGSGGS	(GGS)5 リンカー
248	GGGG	グリシンリンカ ー
249	GGGGG	グリシンリンカ ー
250	GGSGGS	(GGS)2 リンカー
251	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKQRDLVSLIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT LVTVKP	hz18H10v1
252	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKQRDLVSLIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT LVTVKP	hz18H10v2
253	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKQRDLVSLIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT LVTVKP	hz18H10v3
254	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKQRDLVALIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT LVTVKP	hz18H10v4
255	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKQRDLVALIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT LVTVKP	hz18H10v5
256	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDLVALIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT LVTVKP	hz18H10v6
257	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLCAASGSITGANTMGWYRQAPGKQRDLVALIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT LVTVKP	hz18H10v7
258	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDLVSLIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT LVTVKP	hz18H10v8
259	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDLVSLIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT LVTVKP	hz18H10v9
260	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLCAASGSMGTGANTMGWYRQAPGKQRDLVSLIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT LVTVKP	hz18H10v10
261	EVQLVESGGGEVQPGGSLRSLCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDLVSLIGNYV	hz18H10v11

10

20

30

40

50

【表 7 - 17】

#	配列	注釈
	THYAESVKGRFTISRENAKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT VTVKP	
262	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDLVALIGNYV THYAESVKGRFTISRENAKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT VTVKP	hz18H10v12
263	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAPGKQRELVALIGNYV THYAESVKGRFTISRENAKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT VTVKP	hz18H10v13
264	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAPGKQRDLVALIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT VTVKP	hz18H10v14
265	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPGKQRDLVALIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT VTVKP	hz18H10v15
266	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPGKQRDLVALIGNYV THYAESVKGRFTISRENAKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT VTVKP	hz18H10v16
267	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPGKQRDLVALIGNYV THYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLLQMSSLRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT VTVKP	hz18H10v17
268	GSMTGANTMG	CDR1
269	GGSGGSGGS	(GGS)3 リンカー
270	GGSGGSGGSGGS	(GGS)4 リンカー
271	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGS)5 リンカー
272	GSVTGANTMG	CDR1
273	GSITGANTMG	CDR1
274	GGSGGS	(GGS)2 リンカー
275	GGSGGSGGS	(GGS)3 リンカー
276	GGSGGSGGSGGS	(GGS)4 リンカー
277	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGS)5 リンカー
278	LIGNYVTH	CDR2
279	GGSGGS	(GGS)2 リンカー
280	GGSGGSGGS	(GGS)3 リンカー
281	GGSGGSGGSGGS	(GGS)4 リンカー
282	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGS)5 リンカー
283	YTDNLGTS	CDR3
284	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGSMTGANTMGWYRQAPGKQRDLVALIGNYH YADSVKGRFTISRENAKNTVILQMNSLNPEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGT LTVK	18H10
285	QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAFRGLIGGTNK RAPGVPARFSGSLGKKAALTISGAQPEDEADYCALWYSNHWFVCGTKLTVL	抗 CD3 VL (CON)
286	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVEGDNATFTCS FSNTSEFVLNWRMSPNQTDKLAAPEDRSQPGQDCFRVTQLPNGRDFHMSV VRARRNDSTYLCGAIKSLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPPRPAQ FQTLVVGVVGLLGSLLVLLVWVLAIVCSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFS VDYGELDFQWREKTPPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSPGSGTSSPARRGSADGPRSAQ	PD-1

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 8】

#	配列	注釈
	PLRPEDGHCSWPL	
296	QVQLQQSGGGLVQAGGSLRVSCAASGRTFSSYGMGWRQAPGKEREFVAAISWSG GTQYYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCADYTDYVVYRPEI GYWGQGTQVTVKP	cPD1-8
297	QLQLQQSGGGLAQAGGSLRLSCAASGRTVSIYAMGWRQAPGKEREFVAGIGWNG GTTYADSVVEGRFTISRDHAKNTAYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYW GRGTQVTVKP	cPD1-14
298	QVTLKESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTEIYAMGWRQAPGKEREFVAGIGWNG GTTYADSVVEGRFTISRDSAKNTVYLMRSLKPEDTAVYYCAAQDSVAGTLGDYW GGGTQVTVKP	cPD1-13
299	QVTLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFGLYAMTWRQAPGKREGISCISSSD GSTIYADSVKGRFTASRDNAKDTMYLQMNLSLNPEDTAVYYCATDYETRCDYGLRL RDRTAYWGPGTQVTVKP	cPD1-5
300	GRTFSSY	cPD1-8 CDR1
301	GRTVSIY	cPD1-14 CDR1
302	GRTEIY	cPD1-13 CDR2
303	GLTFGLY	cPD1-5 CDR1
304	SWSGGT	cPD1-8 CDR2
305	GWNGGT	cPD1-14 CDR2
306	GWSGGT	cPD1-13 CDR2
307	SDGST	cPD1-5 CDR2
308	YTDYVVYRPEIGY	cPD1-8 CDR3
309	QESAAGTLGDY	cPD1-14 CDR3
310	QDSVAGTLGDY	cPD1-13 CDR3
311	DYETRCDYGLRLRDRTAY	cPD1-5 CDR3
312	QVQLQQSGGGLAQAGGSLRLSCAASGRTVSIYAMGWRQAPGKEREFVAGIGWNG GTTYADSVVEGRFTISRDHAKNTAYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAQESAAGTLGDYW GRGTQVTVKPGG	1-14
316	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVSGISWNS GSIYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGA	抗 CD3 VH 312557

10

20

30

40

50

【表 7 - 1 9】

#	配列	注釈
	YWGQGLTVTVSS	
317	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKCLEWVSGISWNS GSIQYADSVKGFITSRDIAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGA YWGQGLTVTVSS	抗 CD3 VH 312557 G44C
318	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRA TGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGTKVEIK	抗 CD3 VL 312557
319	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRA TGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGCGTKVEIK	抗 CD3 VL 312557 Q100C
320	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYSMHWVRQAPGKCLEWVSGISWNS GSKDYADSVKGRFTISRDNIAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKYSGYKGFYHYG LDVWGQGLTVTVSS	CD3-VH-G
321	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYSMHWVRQAPGKCLEWVSGISWNS GSKDYADSVKGRFTISRDNIAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKYSGYKGFYHYG LDVWGQGLTVTVSS	CD3-VH-G G44C
322	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIK	V <sub>K1</sub> -39J κ 5
323	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGRLEIK	V <sub>K1</sub> -39J κ 5 Q100C

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1 A】

一過性トランスフェクト 293 への結合

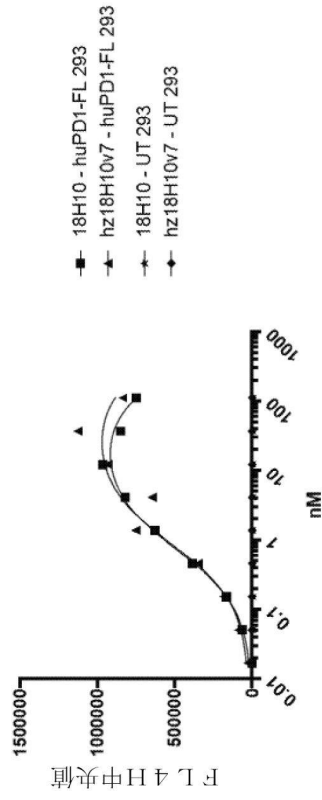


図 1 A

【図 1 B】

一過性トランスフェクト 293 への結合

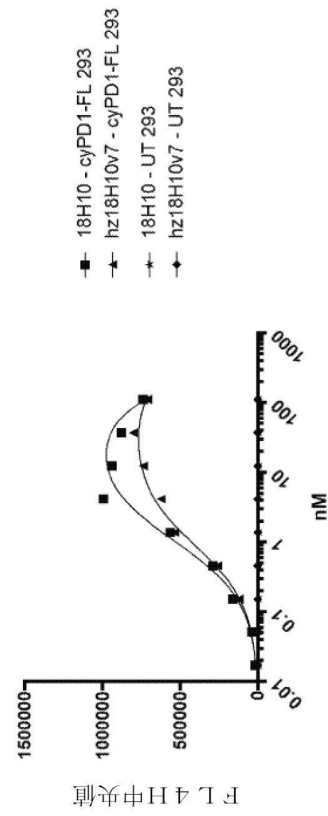


図 1 B

【図 1 C】

一過性トランスフェクト 293 への結合

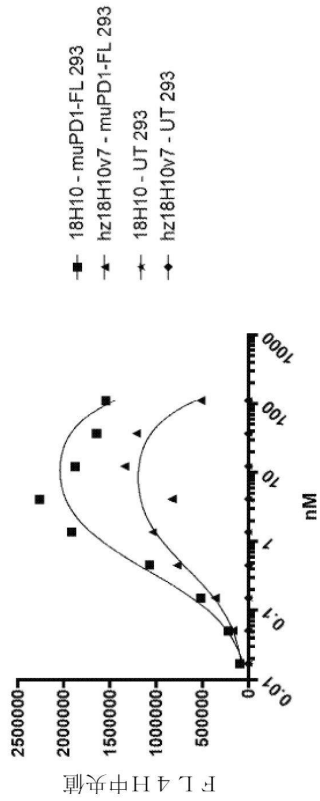


図 1 C

【図 1 D】

一過性トランスフェクト 293 への結合

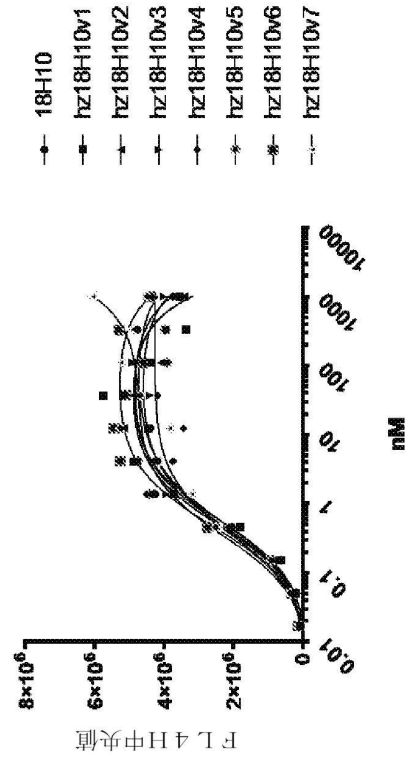


図 1 D

10

20

30

40

50

【 図 1 E 】

一過性トランスフェクト 293 への結合

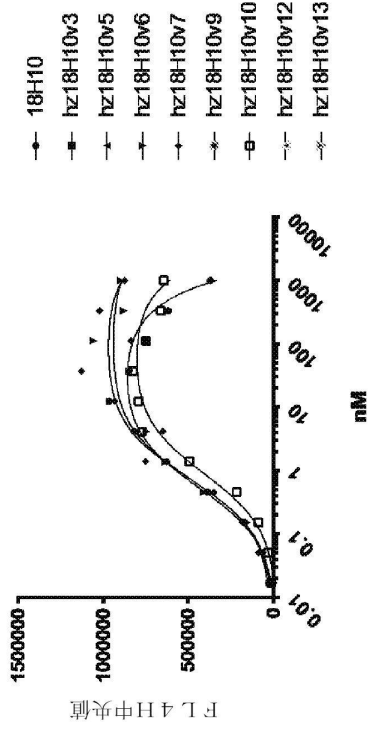


図 1 E

【 図 1 F 】

一過性トランスフェクト 293 への結合

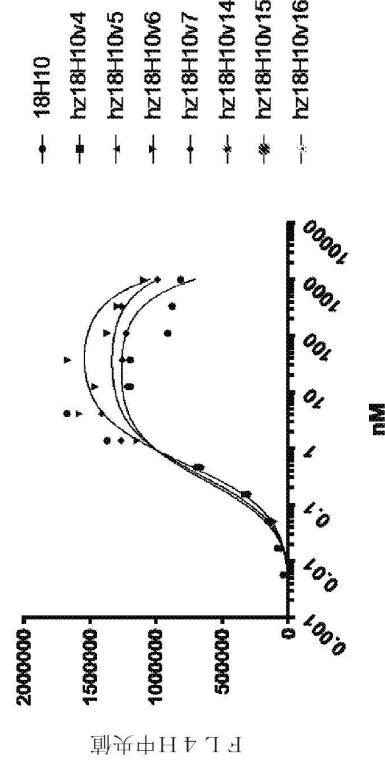


図 1 F

【 図 1 G 】

一過性トランスフェクト 293 への結合

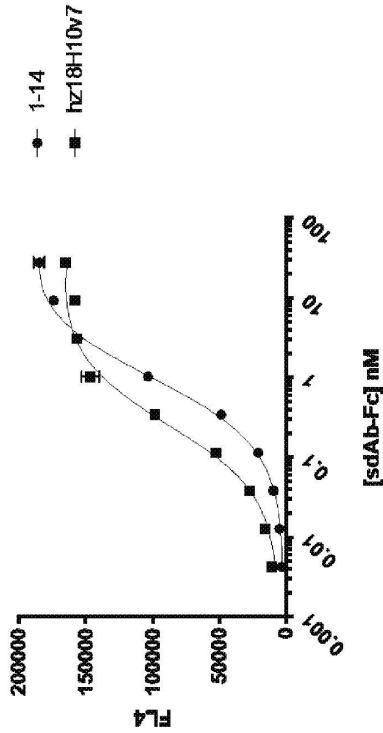


図 1 G

【 図 2 】

活性化ヒト T 細胞への結合

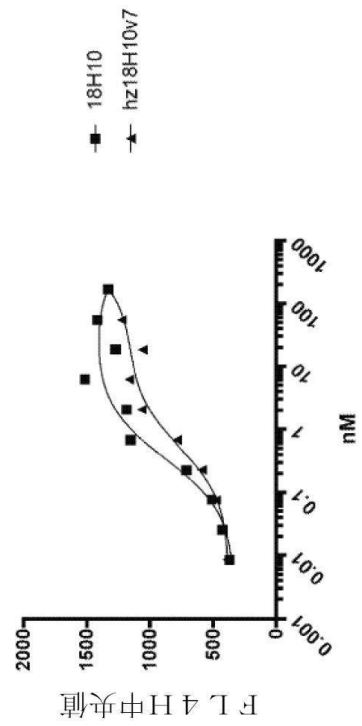


図 2

10

20

30

40

50

【 図 3 A 】

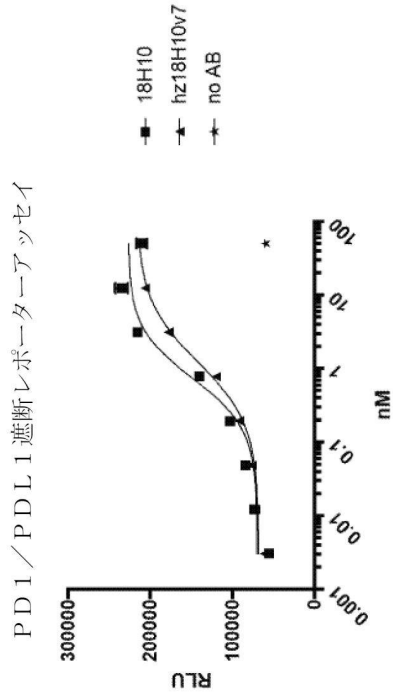


図 3 A

【 図 3 B 】

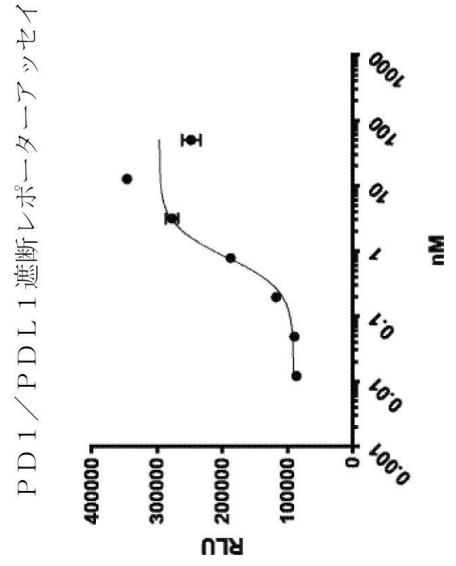


図 3 B

【 配列表 】

0007453219000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)  
 C 1 2 P 21/02 (2006.01)  
 C 0 7 K 19/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)  
 A 6 1 P 37/04 (2006.01)  
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)  
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)  
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)

## F I

C 1 2 N 5/10  
 C 1 2 P 21/02 C  
 C 0 7 K 19/00  
 A 6 1 P 35/00  
 A 6 1 P 37/04  
 A 6 1 K 39/395 G  
 A 6 1 K 39/395 U  
 A 6 1 K 39/395 E  
 A 6 1 K 39/395 T  
 A 6 1 K 47/68  
 C 1 2 N 15/13

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (74)代理人

230113332

弁護士 山本 健策

## (72)発明者

バンディット, ラジェイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7, ラ ホーヤ, ノース トーリー パインズ ロード  
 1 1 0 2 5, スイート 2 0 0, インヒブリックス, インコーポレイテッド 気付

## (72)発明者

ティマー, ジョン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7, ラ ホーヤ, ノース トーリー パインズ ロード  
 1 1 0 2 5, スイート 2 0 0, インヒブリックス, インコーポレイテッド 気付

## (72)発明者

サナブリア, アンジェリカ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7, ラ ホーヤ, ノース トーリー パインズ ロード  
 1 1 0 2 5, スイート 2 0 0, インヒブリックス, インコーポレイテッド 気付

## (72)発明者

サルズメイヤー, フロリアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7, ラ ホーヤ, ノース トーリー パインズ ロード  
 1 1 0 2 5, スイート 2 0 0, インヒブリックス, インコーポレイテッド 気付

## (72)発明者

エクケルマン, ブレندان

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 3 7, ラ ホーヤ, ノース トーリー パインズ ロード  
 1 1 0 2 5, スイート 2 0 0, インヒブリックス, インコーポレイテッド 気付

## 審査官

大西 隆史

## (56)参考文献

国際公開第 2 0 1 8 / 1 2 7 7 1 0 (WO, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 0 2 8 3 4 1 (US, A 1)

国際公開第 2 0 1 7 / 0 8 7 5 8 7 (WO, A 1)

中国特許出願公開第 1 0 7 4 7 4 1 3 5 (CN, A)

国際公開第 2 0 1 8 / 0 5 0 0 3 9 (WO, A 1)

中国特許出願公開第 1 0 8 2 8 5 4 8 5 (CN, A)

国際公開第 2 0 1 7 / 1 3 4 3 0 6 (WO, A 1)

## (58)調査した分野

(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 5 1 / 1 2

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(ST

N)