

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-504802

(P2022-504802A)

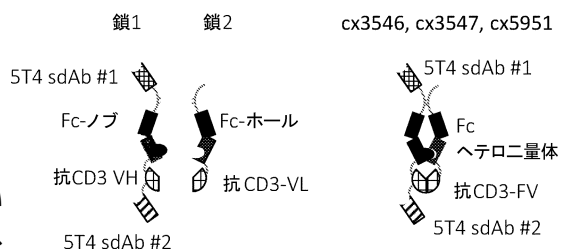
(43)公表日 令和4年1月13日(2022.1.13)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全269頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-520187(P2021-520187)	(71)出願人	514199744		
(86)(22)出願日	令和1年10月9日(2019.10.9)		インヒブルクス インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和3年6月8日(2021.6.8)		アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォル		
(86)国際出願番号	PCT/US2019/055454		ニア ラ ホーヤ ノース トーリー パイ		
(87)国際公開番号	WO2020/076992		ンズ ロード 1 1 0 2 5 スイート 2 0 0		
(87)国際公開日	令和2年4月16日(2020.4.16)	(74)代理人	100102978		
(31)優先権主張番号	62/744,631		弁理士 清水 初志		
(32)優先日	平成30年10月11日(2018.10.11)	(74)代理人	100102118		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 春名 雅夫		
(31)優先権主張番号	62/877,824	(74)代理人	100160923		
(32)優先日	令和1年7月23日(2019.7.23)		弁理士 山口 裕孝		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100119507		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		弁理士 刑部 俊		
	最終頁に続く	(74)代理人	100142929		
			弁理士 井上 隆一		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 5 T 4 シングルドメイン抗体およびその治療組成物

(57)【要約】

5T4に特異的に結合する結合ポリペプチドが、本明細書において提供される。より具体的には、5T4に結合する、多価および/または多重特異性の構築物およびキメラ抗原受容体を含む融合タンパク質が、本明細書において提供される。また、これらのポリペプチド、該ポリペプチドをコードする核酸分子、ならびにそのベクターおよび細胞を含有する薬学的組成物、ならびに、がんなどの疾患および状態を処置するための、提供される5T4結合ポリペプチドの使用法およびその使用も提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5T4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（5T4 VHHドメイン）と、5T4以外の標的に結合する1つまたは複数の追加の結合ドメインとを含む、5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項 2】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、

SEQ ID NO: 86～87、および288～292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）；

SEQ ID NO: 88～99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2（CDR2）；ならびに

SEQ ID NO: 100～102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3（CDR3）

を含む、請求項1記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項 3】

SEQ ID NO: 86～87、および288～292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）；

SEQ ID NO: 88～99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2（CDR2）；ならびに

SEQ ID NO: 100～102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3（CDR3）

を含む、少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン（5T4 VHHドメイン）

を含む、5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項 4】

前記5T4がヒト5T4である、請求項1～3のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項 5】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインがヒト化されている、請求項1～4のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項 6】

前記1つまたは複数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、請求項1、2、4、および5のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項 7】

前記免疫細胞がT細胞である、請求項6記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項 8】

前記活性化受容体がCD3（CD3）である、請求項6または7記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項 9】

5T4およびCD3に対して二重特異性である、請求項8記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項 10】

前記免疫細胞がナチュラルキラー（NK）細胞である、請求項6記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項 11】

前記活性化受容体がCD16（CD16a）である、請求項6または10記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項 12】

5T4およびCD16aに対して二重特異性である、請求項11記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項 13】

10

20

30

40

50

前記1つまたは複数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、請求項1、2、4、および5のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項14】

前記1つまたは複数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、請求項1、2、および4～13のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項15】

前記1つまたは複数の追加の結合ドメインが一価である、請求項1、2、および4～14のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項16】

前記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、シングルドメイン抗体(sdAb)である、請求項14または15記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項17】

前記1つまたは複数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できるその切断型断片もしくはバリエーションである、請求項13記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項18】

前記サイトカインが、インターフェロンであるか、またはその切断型断片もしくはバリエーションである、請求項17記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項19】

前記インターフェロンが、I型インターフェロンもしくはII型インターフェロン、またはI型インターフェロンの切断型断片もしくはバリエーション、またはII型インターフェロンの切断型断片もしくはバリエーションである、請求項18記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項20】

前記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、またはその切断型断片もしくはバリエーションであり、あるいは

前記II型インターフェロンが、IFN-ガンマであるか、またはその切断型断片もしくはバリエーションである、

請求項19記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項21】

免疫グロブリンFc領域を含む、請求項1～20のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項22】

前記ポリペプチドが、

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインと前記1つまたは複数の追加の結合ドメインとを連結する免疫グロブリンFc領域

を含む、請求項1、2、および4～21のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項23】

二量体である、請求項1～22のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項24】

前記Fc領域がホモ二量体Fc領域である、請求項21～23のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項25】

前記Fc領域が、SEQ ID NO: 8、10、11、12、もしくは13のいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 8、10、11、12、もしくは13のいずれかに対して少なくとも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、請求項21～24のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項26】

10

20

30

40

50

前記Fc領域がヒトIgG1である、請求項21～25のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項27】

前記Fc領域が、SEQ ID NO: 8に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 8に対して少なくとも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、請求項26記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項28】

前記Fc領域がヘテロ二量体Fc領域である、請求項21～23のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項29】

前記Fc領域がエフェクター機能を示す、請求項21～28のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項30】

前記Fc領域が、エフェクター機能を低減させ、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に対する結合を低減させる、1つまたは複数のアミノ酸改変を含むポリペプチドを含む、請求項21～29のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項31】

前記1つまたは複数のアミノ酸改変が、Glu233、Leu234、またはLeu235のうちの1つまたは複数の欠失である、請求項30記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項32】

前記Fc領域が、SEQ ID NO: 9に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 9に対して少なくとも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、請求項30または31記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項33】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 245～253、255～287、294、295、302、および360のいずれかに示される配列、またはSEQ ID NO: 245～253、255～287、294、295、302、および360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項1～32のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項34】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、ヒト5T4のエピトープに結合するが、マウス5T4との交差反応結合は示さない、請求項1～33のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項35】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382のアミノ酸60～112間のアミノ酸残基に結合する、請求項1～34のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項36】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382のアミノ酸173～224間のアミノ酸残基に結合する、請求項1～35のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項37】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 245に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 245のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 245に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%

10

20

30

40

50

、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、かつ5 T4に結合する、請求項1～36のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項38】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、
SEQ ID NO: 288および289からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;
SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびに
SEQ ID NO: 100に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、請求項1～37のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項39】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO: 288、88、および
100、またはそれぞれSEQ ID NO: 289、88、および100に示されるCDR1、CDR2、
およびCDR3を含む、請求項1～38のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

10

【請求項40】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 246～253、および360の
いずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 246～253、および360
に対して少なくとも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、
かつ5T4に結合する、請求項1～39のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項41】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 246～253、および360の
いずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項1～40記載の5T4結合ポリペプチ
ド構築物。

20

【請求項42】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 255に示される配列、
(ii) SEQ ID NO: 255のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 255に対し
て少なくとも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、かつ5
T4に結合する、請求項1～36のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項43】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、
SEQ ID NO: 86、290～292からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;
SEQ ID NO: 89～94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;および
SEQ ID NO: 101に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、請求項1～36および42のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

30

【請求項44】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO: 290、90、および
101;それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、92、
および101;それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101;それぞれSEQ ID NO: 290
、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101;それぞれSEQ ID NO
: 292、94、および101;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、94、および101に示され
るCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項1～36、42、および43のいずれか一項
記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

40

【請求項45】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 256～275のいずれか1つに
示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 256～275に対して少なくとも85%、8
6%、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、かつ5T4に結合する、請求
項1～36、および42～44のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項46】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 256～275のいずれか1つに

50

示されるアミノ酸の配列を含む、請求項1～36、および43～45のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項47】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 276に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 276のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 276に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項1～36のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項48】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、
SEQ ID NO: 86および87からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;
SEQ ID NO: 95～99からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびに
SEQ ID NO: 102に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項1～33、および47のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項49】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO: 87、95、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、96、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、97、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、99、および102;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、98、および102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項1～36、47、および48のいずれか一項記載の5T4結合

【請求項50】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 277～287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 277～287に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項1～36、および47～49のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項51】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 277～287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項1～36、および47～50記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項52】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 294に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項1～36のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項53】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、
SEQ ID NO: 296に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;
SEQ ID NO: 298に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および
SEQ ID NO: 300に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項1～36および52のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項54】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項1～36および52のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項55】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、
SEQ ID NO: 288、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むC

10

20

30

40

50

DR1;ならびに/または

SEQ ID NO: 88、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2を含む、請求項1~36、および52のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項56】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 295に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 295のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 295に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項1~36のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項57】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 297に示されるアミノ酸配列を含むCDR1; SEQ ID NO: 299に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および SEQ ID NO: 301に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項1~36、および56のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項58】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項1~36のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項59】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 288に示されるアミノ酸配列を含むCDR1; SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および SEQ ID NO: 303に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項1~36、および56のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項60】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項1~36のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項61】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO: 296、298、および300;それぞれSEQ ID NO: 297、299、および301;またはそれぞれSEQ ID NO: 288、88、および303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項1~36、および60のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項62】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 245、249、255、270、276、294、295、または302に示される、請求項1~36、60、および61のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物。

【請求項63】

(a) 第1のFcポリペプチドと第2のFcポリペプチドとを含むヘテロ二量体Fc領域を含む、第1の構成要素、および(b) 可変重鎖領域(VH)と可変軽鎖領域(VL)とを含む抗CD3抗体または抗原結合断片を含む、第2の構成要素を含む、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構成するVHおよびVLが、ヘテロ二量体Fcの相対するポリペプチドに連結されており;

10

20

30

40

50

第1および第2の構成要素が、リンカーによりカップリングされ、ヘテロ二量体Fc領域が、抗CD3抗体のN末端に位置づけられ;かつ

第1および第2の構成要素の一方または両方が、少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン(5T4 VHHドメイン)を含む、多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項64】

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;ならびに(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、任意で、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ドメインのもう一方を含む、第2のポリペプチド

10

を含み、

第1および第2のポリペプチドの一方または両方が、少なくとも1つの5T4 VHHドメインを含む、

請求項63記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項65】

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1および前記第2のFcポリペプチドの一方または両方が、ホモ二量体Fc領域のポリペプチドと比べて、任意で、SEQ ID NO: 8に示されるFcポリペプチドまたはその免疫活性断片と比べて、ヘテロ二量体化を誘導する少なくとも1つの改変を含む、請求項63または64記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【請求項66】

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1および前記第2のFcポリペプチドの各々が、独立して、少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、請求項65記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項67】

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1および前記第2のFcポリペプチドの各々が、ノブ-イントゥ-ホール(knob-into-hole)改変を含む、または該ポリペプチドの静電的相補性を増加させる電荷の変異を含む、請求項65または66記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項68】

前記アミノ酸改変がノブ-イントゥ-ホール改変である、請求項65~67記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

【請求項69】

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第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改変を含み、かつ前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、改変Thr366Trpを含む、請求項63~68のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項70】

前記第1および前記第2のFcポリペプチドが、非システイン残基のシステイン残基への改変をさらに含み、該第1のポリペプチドの改変が、位置Ser354およびTyr349のうちの一方にあり、かつ該第2のFcポリペプチドの改変が、位置Ser354およびTyr349のうちのもう一方にある、請求項69記載の多重特異性ポリペプチド。

40

【請求項71】

前記アミノ酸改変が、前記ポリペプチドの静電的相補性を増加させる電荷の変異である、請求項65~67のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項72】

前記第1および/もしくは前記第2のFcポリペプチド、または前記第1および前記第2のFcポリペプチドの各々が、相補的な位置にアミノ酸改変を含み、該改変が、もう一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換である、請求項63~67、および71のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

50

【請求項 73】

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1または前記第2のFcポリペプチドのうち的一方が、残基Ile253に改変をさらに含む、請求項63～72のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 74】

前記改変がIle253Argである、請求項73記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 75】

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1または前記第2のFcポリペプチドのうち的一方が、残基His435に改変をさらに含む、請求項63～74のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 76】

前記改変がHis435Argである、請求項75記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 77】

前記Fc領域が、Lys447を欠如しているポリペプチドを含む、請求項63～76のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 78】

前記Fc領域が、FcRn結合を増強する少なくとも1つの改変を含むポリペプチドを含む、請求項63～77のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 79】

前記少なくとも1つの改変が、Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される位置にある、請求項78記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 80】

前記少なくとも1つの改変が、Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項78または79記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 81】

前記少なくとも1つの改変が、位置Met252および位置Met428にある、請求項78～80のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 82】

前記少なくとも1つの改変が、Met252YおよびMet428Lである、請求項78～81のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 83】

前記少なくとも1つの改変が、Met252YおよびMet428Vである、請求項78～81のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 84】

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 103、107、115、117、328、または334のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつ前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 104、108、111、113、119、121、329、332、または336のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項63～83のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 85】

前記Fc領域が、エフェクター機能を低減させ、かつ/またはFcガンマ受容体およびC1qから選択されるエフェクター分子に対する結合を低減させる、少なくとも1つのアミノ酸改変を含むポリペプチド

を含む、請求項21～84のいずれか一項記載のポリペプチド構築物。

【請求項 86】

前記少なくとも1つのアミノ酸改変が、Glu233、Leu234、およびLeu235のうちの1つまたは複数の欠失である、請求項85記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

20

30

40

50

【請求項 87】

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 105、109、116、118、330、または335のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつ前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 106、110、112、114、120、122、331、333、または337のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項63～86のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 88】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が一価である、請求項63～87のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 89】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、一本鎖抗体ではなく、任意で、一本鎖可変断片(scFv)ではない、請求項63～88のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 90】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、Fv抗体断片である、請求項63～89のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 91】

前記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、請求項90記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 92】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、
アミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO: 29) を含むVH CDR1;
アミノ酸配列
RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30)

を含むVH CDR2;

アミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

を含むVH CDR3、

アミノ酸配列

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

を含むVL CDR1;

アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 33) を含むVL CDR2;および

アミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 34) を含むVL CDR3

を含む、請求項63～91のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 93】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、

SEQ ID NO: 27、35～65、341、343、および358のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 27、35～65、341、343、および358のいずれかに対して少なくとも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し、かつCD3に結合する、VH;

SEQ ID NO: 28、66～84、293、340、および342のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 28、66～84、293、340、および342、および293のいずれかに対して少なくとも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し、かつCD3に結合する、VL

を含む、請求項63～92のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 94】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列およびSEQ ID

10

20

30

40

50

NO: 75のアミノ酸配列を含む、請求項63～93のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項95】

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 293のアミノ酸配列を含む、請求項63～93のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項96】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、前記多重特異性ポリペプチド構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/または前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、請求項63～92のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【請求項97】

5T4に特異的に結合する第1の5T4 VHHドメインと、5T4に特異的に結合する第2の5T4 VHHドメインを含む、請求項63～96のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項98】

前記第1または前記第2の5T4 VHHドメインが、前記多重特異性構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端に位置づけられ、かつ該第1または該第2の5T4 VHHドメインのもう一方が、該多重特異性構築物の前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、請求項97記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

20

【請求項99】

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、5T4に結合する第1の5T4 VHHドメイン、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチド、前記リンカー、前記抗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5T4に結合する第2の5T4 VHHドメインを含み;かつ

前記第2の構成要素が、N末端からC末端への順序で、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチド、前記リンカー、任意で、前記第1の構成要素中に存在するのと同じリンカー、および前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方を含む、

請求項97または98記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

【請求項100】

前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインが同じである、請求項97～99のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項101】

前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインが異なっている、請求項97～99のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項102】

前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインが、5T4の別個のもしくは重複しないエпитープに結合し、かつ/または5T4に対する結合について競合しない、請求項101記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

【請求項103】

前記第1の5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 245～253、295、302、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO: 245～253、295、302、および360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合し;かつ

前記第2の5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 255～287、294、302のいずれか1つに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO: 255～287、294、302のいずれかに対して少なくとも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

50

ミノ酸の配列を含み、かつ5T4に結合する、
請求項102記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項104】

前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 294;SEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 276;SEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 255;SEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 295;SEQ ID NO: 295およびSEQ ID NO: 294;SEQ ID NO: 249およびSEQ ID NO: 270;SEQ ID NO: 302およびSEQ ID NO: 302;またはSEQ ID NO: 360およびSEQ ID NO: 287から選択される、請求項102記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項105】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 245~253、255~287、294、295、302、および360のいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO: 245~253、255~287、294、295、302、および360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項63~104のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項106】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、ヒト5T4のエピトープに結合するが、マウス5T4との交差反応結合は示さない、請求項63~105のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項107】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382のアミノ酸60~112間のアミノ酸残基に結合する、請求項63~106のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項108】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382のアミノ酸173~224間のアミノ酸残基に結合する、請求項63~107のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項109】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 245に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 245のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 245に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項63~108のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項110】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO: 86~87、および288~292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 88~99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびに

SEQ ID NO: 100~102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項63~109のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項111】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO: 288、88、および100;それぞれSEQ ID NO: 289、88、および100;それぞれSEQ ID NO: 290、89、および101;それ

10

20

30

40

50

それぞれSEQ ID NO: 290、90、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、92、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 292、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 86、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 87、95、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、96、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、97、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、99、および102;それぞれSEQ ID NO: 86、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 296、298、および300;それぞれSEQ ID NO: 297、299、および301;またはそれぞれSEQ ID NO: 288、88、および303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項63~110のいずれか一項記載の多重特異性構築物。 10

【請求項112】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 246~253、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 246~253、および360に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項63~111のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項113】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 246~253、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項63~112のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 20

【請求項114】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 255に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 255のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 255に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項63~108のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 30

【請求項115】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 86、290~292からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1; SEQ ID NO: 89~94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 101に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項63~108、および114のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項116】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO: 290、89、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、90、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、92、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 292、94、および101;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、94、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項63~108、114、および115のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 40

【請求項117】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 256~275のいずれか1つに示されるアミノ 50

酸の配列、またはSEQ ID NO: 256～275に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項63～108、および114～116のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項118】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 256～275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項63～108、および114～117記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項119】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 276に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 276のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 276に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項63～108のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項120】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO: 86および87からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 95～99からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびに

SEQ ID NO: 102に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項63～108、および119のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド。

【請求項121】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO: 87、95、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、96、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、97、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、99、および102;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、98、および102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項63～108、119、および120のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項122】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 277～287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 277～287に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項63～108、および119～121のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項123】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 277～287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項63～108、および119～122のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項124】

前記少なくとも1つの5T4 VHHDメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHDメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 294に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項63～108のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 5】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO: 296に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 298に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 300に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項63~108、および124のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 1 2 6】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 295に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 295のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 295に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項63~106のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 1 2 7】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO: 297に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 299に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 301に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項63~106、および126のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 1 2 8】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項63~106のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 1 2 9】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO: 288に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 303に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項63~106、および126のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 1 3 0】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302のヒト化バリエーション、または(iii)

(iii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項63~106のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 1 3 1】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO: 296、298、および300;それぞれSEQ ID NO: 297、299、および301;またはそれぞれSEQ ID NO: 288、88、および

10

20

30

40

50

303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項63～106、および130のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項132】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 245、249、255、270、276、294、295、302、または360に示される、請求項63～106、130、および131のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項133】

前記第1および前記第2の構成要素の一方または両方が、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(CRBR)を含む、請求項63～132のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 10

【請求項134】

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、前記多重特異性ポリペプチド構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/または前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、請求項133記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項135】

共刺激受容体結合領域(CRBR)を1つだけ含む、請求項133または134記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項136】

同じであっても異なってもよい2つの共刺激受容体結合領域(CRBR)を含む、請求項133～135のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 20

【請求項137】

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、前記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、または前記共刺激受容体に対する結合活性を示すそのバリエーションである、あるいはそれを含む、請求項133～136のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項138】

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片である、請求項133～136のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 30

【請求項139】

前記抗体またはその抗原結合断片が、Fv、scFv、Fab、またはシングルドメイン抗体(sdAb)である、請求項138記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項140】

前記抗体または抗原結合断片がsdAbである、請求項138または139記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項141】

前記sdAbが、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、請求項140記載の多重特異性ポリペプチド構築物。 40

【請求項142】

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)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CAMLインタラクタ(Transmembrane activator and CAML interactor)(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、請求項133～141のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項143】

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、41BB(CD137)、OX40(C 50

CD134)、およびグルココルチコイド誘導性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、請求項133~142のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項144】

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、SEQ ID NO: 210に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 210に示される配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する配列、を含み、かつ4-1BBに結合する、請求項133~143のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項145】

前記第1および前記第2の構成要素の一方または両方が、抑制性受容体に結合する少なくとも1つの抑制性受容体結合領域(IRBR)を含む、請求項63~144のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項146】

前記少なくとも1つの抑制性受容体結合領域(IRBR)が、前記多重特異性ポリペプチド構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/または前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、請求項145記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項147】

抑制性受容体結合領域(IRBR)を1つだけ含む、請求項145または146記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項148】

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、5T4に結合する第1の5T4 VHHドメイン、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチド、前記リンカー、前記抗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5T4に結合する第2の5T4 VHHドメインを含み;かつ

前記第2の構成要素が、IRBRを含み、かつ、N末端からC末端への順序で、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチド、前記リンカー、任意で、前記第1の構成要素に存在するのと同じリンカー、前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方を含み、

該IRBRが、該第2の構成要素の該Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/または該抗CD3抗体または抗原結合断片に対してカルボキシ末端に位置づけられた、請求項145~147のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項149】

前記少なくとも1つのIRBRが、

前記抑制性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、または前記抑制性受容体に対する結合活性を示すそのバリエーション

である、あるいはそれを含む、請求項145~148のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項150】

前記少なくとも1つのIRBRが、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片である、請求項139~142のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項151】

前記抗体またはその抗原結合断片が、Fv、scFv、Fab、シングルドメイン抗体(sdAb)である、請求項150記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項152】

前記抗体または抗原結合断片がsdAbである、請求項150または151記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項153】

10

20

30

40

50

前記sdAbが、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、請求項152記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項153】

前記少なくとも1つのIRBRが、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、およびTIM3の中から選択される抑制性受容体に結合する、請求項145～153のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項155】

前記少なくとも1つのIRBRが、PD-1に結合する、請求項145～154のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項156】

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、5T4に結合する第1の5T4 VHHドメイン、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチド、前記リンカー、前記抗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5T4に結合する第2の5T4 VHHドメインを含み;かつ

前記第2のポリペプチドが、N末端からC末端への順序で、前記IRBRまたは前記CRBRの一方、前記ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、前記リンカー、任意で、前記第1の構成要素に存在するのと同じリンカー、前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方、および前記CRBRまたは前記IRBRのもう一方を含む、請求項145～155のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項157】

前記リンカーが、ペプチドリinkerまたはポリペプチドリinkerであり、任意で、該リンカーが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、請求項63～156のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項158】

前記リンカーが、切断不可能なリンカーである、請求項63～157のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項159】

前記切断不可能なリンカーが、GGである、またはGGを含む、請求項158記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項160】

前記切断不可能なリンカーが、GS, GGS, GGGGS (SEQ ID NO:125), GGGGGS (SEQ ID NO:126)

、またはそれらの組み合わせを含む、請求項158記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項161】

前記リンカーが、配列GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:127)

である、またはそれを含む、請求項63～158のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項162】

前記リンカーが、切断可能リンカーである、請求項63～157のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項163】

前記切断可能リンカーが、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、請求項162記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項164】

前記プロテアーゼが、免疫エフェクター細胞により、腫瘍細胞により、または腫瘍微小環境に存在する細胞により産生される、請求項163記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

20

30

40

50

【請求項 165】

前記プロテアーゼが、免疫エフェクター細胞により産生され、該免疫エフェクター細胞が、活性化したT細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、またはNK T細胞である、請求項163または164記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 166】

前記プロテアーゼが、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の中から選択される、請求項163～165のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 167】

前記プロテアーゼがグランザイムBである、請求項166記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

【請求項 168】

前記切断可能リンカーが、アミノ酸配列
GGSGGGGIEPDIGGSGGS (SEQ ID NO:171)

を含む、請求項163～167のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物。

【請求項 169】

SEQ ID NO: 86～87および288～292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）；

SEQ ID NO: 88～99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2（CDR2）；ならびに

20

SEQ ID NO: 100～102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3（CDR3）

を含む、5T4に結合する単離されたシングルドメイン抗体（sdAb）。

【請求項 170】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、ヒト5T4のエピトープに結合するが、マウス5T4との交差反応結合は示さない、請求項169記載の単離されたシングルドメイン抗体（sdAb）。

【請求項 171】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382のアミノ酸60～112間のアミノ酸残基に結合する、請求項169または170記載の単離されたシングルドメイン抗体（sdAb）。

30

【請求項 172】

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382のアミノ酸173～224間のアミノ酸残基に結合する、請求項169～171のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体（sdAb）。

【請求項 173】

SEQ ID NO: 245～253、255～287、294、295、302、および360のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 245～253、255～287、294、295、302、および360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項169記載の単離されたシングルドメイン抗体。

40

【請求項 174】

前記シングルドメイン抗体が、(i) SEQ ID NO: 245に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 245のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 245に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項169～173のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 175】

50

前記sdAbが、
SEQ ID NO: 288および289からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;
SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびに
SEQ ID NO: 100に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、請求項169~174のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項176】

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO: 288、88、および100;またはそれぞれSEQ ID NO: 289、88、および100に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項169~175のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項177】

前記sdAbが、SEQ ID NO: 246~253、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 246~253、および360に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項169~176のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項178】

前記sdAbが、SEQ ID NO: 246~253、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項169~177のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項179】

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 255に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 255のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 255に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項169~173のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項180】

前記sdAbが、
SEQ ID NO: 86、290~292に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;
SEQ ID NO: 89~94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;および
SEQ ID NO: 101に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、請求項169~173、および179のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項181】

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO: 290、89、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、90、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、92、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 292、94、および101;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、94、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項169~173、179、および180のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項182】

前記sdAbが、SEQ ID NO: 256~275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 256~275に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項169~173、および179~181のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項183】

前記sdAbが、SEQ ID NO: 256~275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項169~173、および179~182のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 184】

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 276に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 276のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 276に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項169~173のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 185】

前記sdAbが、

SEQ ID NO: 86および87からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 95~99からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびに

SEQ ID NO: 102に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項169~173、または184のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 186】

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO: 87、95、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、96、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、97、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、99、および102;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、98、および102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項169~173、184、および185のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 187】

前記sdAbが、SEQ ID NO: 277~287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 277~287に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項169~173、および184~186のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 188】

前記sdAbが、SEQ ID NO: 277~287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、請求項169~173、および184~187のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 189】

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 294に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項169~173のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 190】

前記sdAbが、

SEQ ID NO: 296に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 298に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 300に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項169~173、または189記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 191】

前記sdAbが、SEQ ID NO: 300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、請求項169~173、または189記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項 192】

前記sdAbが、

SEQ ID NO: 288、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;ならびに / または

SEQ ID NO: 88、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2

10

20

30

40

50

を含む、請求項169～173、または189記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項193】

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 295に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 295のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 295に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項169～173のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項194】

前記sdAbが、

SEQ ID NO: 297に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;

10

SEQ ID NO: 299に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 301に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項169～173、および193のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項195】

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項169～173のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

20

【請求項196】

前記sdAbが、

SEQ ID NO: 288に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 303に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、請求項169～173、および193のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項197】

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、請求項169～173のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

30

【請求項198】

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO: 296、298、および300;それぞれSEQ ID NO: 297、299、および301;またはそれぞれSEQ ID NO: 288、88、および303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、請求項169～173、および197のいずれか一項記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項199】

40

請求項1～62のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項200】

請求項63～168のいずれか一項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。

【請求項201】

請求項63～168のいずれか一項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、該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、

該第1の核酸配列と該第2の核酸配列とが、配列内リボソーム進入部位(IRES)、または

50

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り、隔てられている、
ポリヌクレオチド。

【請求項 202】

前記第1の核酸配列および前記第2の核酸配列が、同じプロモーターに機能的に連結されている、請求項201記載のポリヌクレオチド。

【請求項 203】

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前記核酸が、T2A、P2A、E2A、またはF2Aから選択される、請求項201または202記載のポリヌクレオチド。

【請求項 204】

請求項169～198のいずれか一項記載のシングルドメイン抗体をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 205】

請求項199～204のいずれか一項記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 206】

発現ベクターである、請求項205記載のベクター。

【請求項 207】

ウイルスベクターまたは真核生物ベクターであり、任意で、該真核生物ベクターが哺乳類ベクターである、請求項205または206記載のベクター。

【請求項 208】

請求項199～204のいずれか一項記載の1つもしくは複数のポリヌクレオチド、または請求項205～207のいずれか一項記載の1つもしくは複数のベクターを含む、細胞。

【請求項 209】

組換えであるかまたは単離されている、請求項208記載の細胞。

【請求項 210】

哺乳類細胞である、請求項209記載の細胞。

【請求項 211】

ポリペプチドを産生する方法であって、

請求項199～204のいずれか一項記載の1つもしくは複数のポリヌクレオチド、または請求項205～207のいずれか一項記載の1つもしくは複数のベクターを細胞中に導入する工程、および

多重特異性ポリペプチド構築物を産生する条件で該細胞を培養する工程を含む、方法。

【請求項 212】

前記ポリペプチドを前記細胞から単離する工程または精製する工程をさらに含む、請求項211記載の方法。

【請求項 213】

請求項211または212記載の方法により産生される、ポリペプチド。

【請求項 214】

請求項169～198のいずれか一項記載のシングルドメイン抗体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
を含むキメラ抗原受容体を含む、操作された免疫細胞。

【請求項 215】

前記細胞がリンパ球である、請求項214記載の操作された免疫細胞。

【請求項 216】

前記細胞が、T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞である、請求項214または215記載の操作された免疫細胞。

【請求項 217】

10

20

30

40

50

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM）シグナル伝達ドメインを含む、請求項214～216のいずれか一項記載の操作された免疫細胞。

【請求項218】

前記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、任意で、ヒトCD3ゼータシグナル伝達ドメインである、またはそれを含む、請求項214～217のいずれか一項記載の操作された免疫細胞。

【請求項219】

前記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、請求項214～218記載の操作された免疫細胞。

【請求項220】

前記共刺激分子が、CD28、ICOS、41BB、またはOX40、任意で、ヒトCD28、ヒトICOS、ヒト41BB、またはヒトOX40である、請求項219記載の操作された免疫細胞。

【請求項221】

請求項1～62のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物、請求項63～168のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物、請求項169～198のいずれか一項記載のシングルドメイン抗体、または請求項214～220のいずれか一項記載の操作された免疫細胞を含む、薬学的組成物。

【請求項222】

薬学的に許容される担体を含む、請求項221記載の薬学的組成物。

【請求項223】

無菌である、請求項221または222記載の薬学的組成物。

【請求項224】

対象において免疫応答を刺激するかまたは誘導する方法であって、それを必要とする対象に、請求項1～62のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物、請求項63～168のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物、請求項169～198のいずれか一項記載のシングルドメイン抗体、または請求項214～220のいずれか一項記載の操作された免疫細胞、または請求項221～223記載の薬学的組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項225】

前記免疫応答が、腫瘍またはがんに対して、任意で、5T4を発現する腫瘍またはがんに対して、増加する、請求項224記載の方法。

【請求項226】

前記対象において疾患または状態を治療する、請求項224または請求項225記載の方法。

【請求項227】

対象において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、請求項1～59のいずれか一項記載の5T4結合ポリペプチド構築物、請求項60～161のいずれか一項記載の多重特異性ポリペプチド構築物、請求項162～188のいずれか一項記載のシングルドメイン抗体、または請求項214～220のいずれか一項記載の操作された免疫細胞、または請求項221～223記載の薬学的組成物を投与する工程を含む、方法。

【請求項228】

前記疾患または状態が、腫瘍またはがんである、請求項226または227記載の方法。

【請求項229】

前記対象がヒトである、請求項224～228のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

10

20

30

40

50

本願は、2018年10月11日出願の“5T4 SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND THE RAPEUTIC COMPOSITIONS THEREOF”という名称の米国特許仮出願第62/744,631号、および2019年7月23日出願の“5T4 SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND TH ERAPEUTIC COMPOSITIONS THEREOF”という名称の同第62/877,824号の優先権を主張するものであり、それらの内容の全てがあらゆる目的で参照により組み入れられる。

【0002】

配列表の参照による組み入れ

本願は電子形式の配列表とともに出願される。配列表は、744952000540SeqList.TXTというファイル名で提供され、作成日は2019年10月8日、容量は368キロバイトである。この電子形式の配列表の全ての情報が参照により組み入れられる。

10

【0003】

発明の分野

本開示は、概して、5T4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5T4に結合する、多価および/または多重特異性構築物ならびにキメラ抗原受容体を含む、融合タンパク質に関する。本開示はまた、これらのポリペプチドをコードする核酸分子、ならびにそのベクターおよび細胞、ならびに、がんなどの疾患および状態を治療するための、提供される5T4結合ポリペプチドの使用方法およびその使用を提供する。

20

【背景技術】

【0004】

背景

栄養膜細胞糖タンパク質(TPBG)としても知られる5T4は、多種多様な腫瘍細胞の表面に発現する膜貫通糖タンパク質であり、その発現は多くのがんの悪い予後と関連付けられている。ヒトのさまざまながんでの5T4の発現は、それが正常な成人の組織では稀にしか発現しないことと合わさって、5T4を望ましい治療標的としている。5T4を標的とする、改良された治療分子および治療剤が必要とされている。本明細書では、そのような需要を満たす態様が提供される。

【発明の概要】

【0005】

概要

本明細書では、5T4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(5T4 VHHドメイン)と、5T4以外の標的に結合する1つまたは複数の追加の結合ドメインとを含む、5T4結合ポリペプチド構築物が提供される。いくつかの態様では、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 86~87および288~292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1);SEQ ID NO: 88~99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2);ならびにSEQ ID NO: 100~102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)を含む。

30

【0006】

本明細書では、SEQ ID NO: 86~87および288~292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1);SEQ ID NO: 88~99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2);ならびにSEQ ID NO: 100~102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)を含む、少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン(5T4 VHHドメイン)を含む、5T4結合構築物が提供される。

40

【0007】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4はヒト5T4である。いくつかの態様では、少なくとも1つの5T4 VHHドメインはヒト化されている。いくつかの態様では、5T4は、SEQ ID NO: 244に示される配列、またはシグナル配列を欠いたその成熟型を有

50

する。

【 0 0 0 8 】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、1つまたは複数の追加の結合ドメインは、免疫細胞上の活性化受容体に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、免疫細胞はT細胞である。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、活性化受容体はCD3 (CD3) である。いくつかの例では、5T4結合ポリペプチド構築物は5T4およびCD3に対して二重特異性である。いくつかの態様では、免疫細胞はナチュラルキラー (NK) 細胞である。

【 0 0 0 9 】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、活性化受容体はCD16 (CD16a) である。いくつかの例では、5T4結合ポリペプチド構築物は5T4およびCD16aに対して二重特異性である。

10

【 0 0 1 0 】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、1つまたは複数の追加の結合ドメインは、サイトカイン受容体に結合する。

【 0 0 1 1 】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、1つまたは複数の追加の結合ドメインは、抗体またはその抗原結合断片を含む。いくつかの態様では、1つまたは複数の追加の結合ドメインは一価である。いくつかの態様では、抗体またはその抗原結合断片は、Fv、ジスルフィド安定化Fv (dsFv)、scFv、Fab、シングルドメイン抗体 (sdAb)、VNAR、またはVHHである。いくつかの態様では、シングルドメイン抗体 (sdAb) はVNARまたはVHHである。いくつかの態様では、シングルドメイン抗体 (sdAb) はラクダ科VHHである。いくつかの態様では、シングルドメイン抗体 (sdAb) はラクダ科VHHのヒト化型である。

20

【 0 0 1 2 】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、1つまたは複数の追加の結合ドメインは、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できるその切断型断片もしくはバリエーションである。いくつかの局面では、サイトカインは、インターフェロンであるか、またはインターフェロンの切断型断片もしくはバリエーションである。いくつかの例では、インターフェロンは、I型インターフェロンもしくはII型インターフェロン、I型インターフェロンの切断型断片もしくはバリエーション、またはII型インターフェロンの切断型断片もしくはバリエーションである。いくつかの態様では、I型インターフェロンは、IFN-アルファもしくはIFN-ベータであるか、またはその切断型断片もしくはバリエーションであり；あるいはII型インターフェロンは、IFN-ガンマであるか、またはその切断型断片もしくはバリエーションである。

30

【 0 0 1 3 】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、ポリペプチドは、免疫グロブリンFc領域を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、ポリペプチドは、少なくとも1つのシングルドメイン抗体と1つまたは複数の追加の結合ドメインとを連結する免疫グロブリンFc領域を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4結合ポリペプチド構築物は二量体である。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、Fc領域はホモ二量体Fc領域である。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、Fc領域は、SEQ ID NO: 8、10、11、12、もしくは13のいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 8、10、11、12、もしくは13のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、Fc領域はヒトIgG1である。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、Fc領域は、SEQ ID NO: 8に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 8に対して少なくとも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。提

40

50

供されるいずれかの態様のいくつかでは、Fc領域はヘテロ二量体Fc領域である。

【0014】

いくつかの態様では、Fc領域は、エフェクター機能を示す。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、Fc領域は、エフェクター機能を低減させ、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に対する結合を低減させる、1つまたは複数のアミノ酸改変を含むポリペプチドを含む。いくつかの例では、1つまたは複数のアミノ酸改変は、Glu233、Leu234、またはLeu235のうちの1つまたは複数の欠失である。いくつかの場合では、Fc領域は、SEQ ID NO: 9に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 9に対して少なくとも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。

10

【0015】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 245~287、294、295、302、360のいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO: 245~287、294、295、302、360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。

【0016】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、ヒト5T4のエピトープに結合するが、マウス5T4との交差反応結合は示さない。

20

【0017】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 382のアミノ酸60~112間のアミノ酸残基に結合する。

【0018】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 382のアミノ酸173~224間のアミノ酸残基に結合する。

【0019】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO: 245に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 245のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 245に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 288および289からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびにSEQ ID NO: 100に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの例では、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 288、88、および100に示される;またはそれぞれSEQ ID NO: 289、88、および100に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

30

【0020】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 245に示されるVHHドメイン配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 249に示されるVHHドメイン配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 254に示されるVHHドメイン配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 255に示されるVHHドメイン配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 270に示されるVHHドメイン配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 276に示されるVHHドメイン配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 287に示されるVHHドメイン配列を含む

40

50

。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 294に示されるVHHドメイン配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 302に示されるVHHドメイン配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 360に示されるVHHドメイン配列を含む。

【0021】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 246~254もしくは360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 246~254もしくは360に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 246~254または360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO: 255に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 255のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 255に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 86、290~292からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 89~94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 101に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの例では、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 290、90、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、92、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 292、94、および101;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、94、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含み、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 256~275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 256~275に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 256~275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO: 276に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 276のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 276に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 86および87からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 95~99からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびにSEQ ID NO: 102に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの例では、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 87、95、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、96、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、97、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、99、および102;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、98、および102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

【0022】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 277~287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 277~287に対して少なくとも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

10

20

30

40

50

配列を含み、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 277~287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO: 294に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 296に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 298に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 300に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの例では、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

10

【0023】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 288、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;ならびに/またはSEQ ID NO: 88、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2を含む。

【0024】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO: 295に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 295のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 295に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 297に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 299に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 301に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

20

【0025】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO: 302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 288に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 303に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

30

【0026】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、(i) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 296、298、および300;それぞれSEQ ID NO: 297、299、および301;またはそれぞれSEQ ID NO: 288、88、および303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

40

【0027】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 411に示される5T4細胞外ドメインのアミノ酸残基60~112間に位置するエピトープに結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 412に示される5T4細胞外ドメインのアミノ酸残基173~224間に位置するエピトープ

50

に結合する。

【0028】

いくつかの態様では、5T4 VHHは、マウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 245に示されるアミノ酸配列を含む5T4 VHH、またはそのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 255に示されるアミノ酸配列を含む5T4 VHH、またはそのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 276に示されるアミノ酸配列を含む5T4 VHH、またはそのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。

【0029】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 245、249、255、270、276、294、295、または302に示される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 254または360に示される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 360に示される。

【0030】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインが、別のポリペプチドなどの別のアミノ酸配列との連結などのために、そのN末端および/またはC末端に追加のアミノ酸を含み得る。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインが、グリシンリンカーまたは本明細書ではGSリンカーと呼ばれる主にアミノ酸のグリシンおよびセリンで構成されるリンカーなどの、可動性リンカーを含み得る。そのような本開示のリンカーは、さまざまな長さであり得、たとえば、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。いくつかの態様では、リンカーは、

GGSGGS,すなわち,(GGG)₂ (SEQ ID NO: 1); GGSGGGSGGS,すなわち,(GGG)₃ (SEQ ID NO: 2);

GGSGGGSGGGSGGS,すなわち,(GGG)₄ (SEQ ID NO: 3);および GGSGGGSGGGSGGGSGGS,すなわち,(GGG)₅ (SEQ ID NO: 4), Gly-Gly (GG), GGG, GGGG (SEQ ID NO: 5), GGGGG (SEQ ID NO: 6),および GGGGGG (SEQ ID NO: 7)

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、リンカーは(GGGGS)_nであり、nは1~5であり(SEQ ID NO: 123);(GGGGGS)_nであり、nは1~4であり(SEQ ID NO: 124); GGGGS (SEQ ID NO:125); GGGGGS (SEQ ID

NO:126); GGGGGSGGGGGSGGGGGGS (SEQ ID NO:127); GGGGGSGGGGGSGGGGGGS (SEQ ID NO:128); GGSGGGGGSGGGGGSGGGGGGS (SEQ ID NO:129);または PGGGG (SEQ ID NO:327)

である。いくつかの態様では、リンカーはGGリンカーである。いくつかの態様では、5T4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。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、別のポリペプチドなどの別のアミノ酸配列との連結などのために、追加のリンカーをそのC末端に含み得る。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、別のポリペプチドなどの別のアミノ酸配列との連結などのために、追加のリンカーをそのN末端に含み得る。

【0031】

本明細書では、第1のFcポリペプチドと第2のFcポリペプチドとを含むヘテロ二量体Fc領域を含む、第1の構成要素、ならびに可変重鎖領域(VH)と可変軽鎖領域(VL)とを含む抗CD3抗体または抗原結合断片、を含む第2の構成要素、を含む、多重特異性ポリペプチド構築物が提供され、ここで抗CD3抗体または抗原結合断片を構成するVHおよびVLは、ヘテロ二量体Fcの相対するポリペプチドに連結され;第1の構成要素と第2の構成要素とはリンカーによりカップリングされ、ヘテロ二量体Fc領域は抗CD3抗体のN末端に

位置づけられ;第1および第2の構成要素の一方または両方は、5T4に特異的に結合する重鎖のみの可変ドメイン(5T4 VHHドメイン)を含む少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。いくつかの態様では、多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも、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;ならびにヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意で、第1のポリペプチド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ドメインのもう一方を含む第2のポリペプチドを含み、第1および第2のポリペプチドの一方または両方は、少なくとも1つの5T4 VHHドメインを含む。

【0032】

10

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、ヘテロ二量体Fc領域の第1および第2のFcポリペプチドの一方または両方は、ホモ二量体Fc領域のポリペプチドと比べて、任意で、SEQ ID NO: 8に示されるFcポリペプチドまたはその免疫活性断片と比べて、ヘテロ二量体化を誘導する少なくとも1つの改変を含む。いくつかの態様では、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つのアミノ酸改変を含む。いくつかの態様では、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は、ノブ-イントゥ-ホール(knob-into-hole)改変を含む、またはポリペプチドの静電的相補性を増加させる電荷の変異を含む。いくつかの例では、アミノ酸改変はノブ-イントゥ-ホール改変である。

【0033】

20

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、ヘテロ二量体Fcの第1のFcポリペプチドは、Thr366Ser、Leu368Ala、Tyr407Val、およびそれらの組み合わせから選択される改変を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のFcポリペプチドは、改変Thr366Trpを含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2のFcポリペプチドは、非システイン残基のシステイン残基への改変をさらに含み、ここで第1のポリペプチドの改変は位置Ser354およびTyr349のうちの一方にあり、第2のFcポリペプチドの改変は位置Ser354およびTyr349のもう一方にある。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、抗CD3抗体または抗原結合断片のVLドメインがヘテロ二量体Fcの第1のFcポリペプチドに連結され、抗CD3抗体または抗原結合断片のVHドメインがヘテロ二量体Fcの第2のFcポリペプチドに連結される。

30

【0034】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、アミノ酸改変は、ポリペプチドの静電的相補性を増加させる電荷の変異である。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、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は、相補的な位置における改変を含み、改変は、他方のポリペプチドの相補的なアミノ酸と反対の電荷を有するアミノ酸での置換である。

【0035】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、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方は、残基Ile253に改変をさらに含む。いくつかの例では、改変はIle253Argである。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、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方は、残基His435の改変をさらに含む。いくつかの例では、改変はHis435Argである。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、Fc領域は、Lys447を欠如しているポリペプチドを含む。

40

【0036】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、Fc領域は、FcRn結合を増強する少なくとも1つの改変を含むポリペプチドを含む。いくつかの態様では、改変は、Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される位置にある。いくつかの場合では、改変は、Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される位置にある。いくつかの例では、改変は、位置Met252および位置Met428にある。い

50

くつかの態様では、改変はMet252YおよびMet428Lである。いくつかの場合では、改変はMet252YおよびMet428Vである。

【0037】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、ヘテロ二量体Fcの第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 103、107、115、または117のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 104、108、111、113、119、または121のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

【0038】

いくつかの態様では、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 103、107、115、117、328、または334のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 104、108、111、113、119、121、329、332、または336のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

10

【0039】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、Fc領域は、エフェクター機能を低減させ、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に対する結合を低減させる、少なくとも1つのアミノ酸改変を含むポリペプチドを含む。いくつかの例では、1つまたは複数のアミノ酸改変は、Glu233、Leu234、またはLeu235のうちの1つまたは複数の欠失である。

【0040】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、ヘテロ二量体Fcの第1のポリペプチドは、SEQ ID NO: 105、109、116、または118のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcの第2のポリペプチドは、SEQ ID NO: 106、110、112、114、120、または122のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

20

【0041】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、ヘテロ二量体Fc領域の第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 105、109、116、118、330、または335のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 106、110、112、114、120、122、331、333、または337のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

30

【0042】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、抗CD3抗体または抗原結合断片は一価である。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、抗CD3抗体または抗原結合断片は一本鎖抗体ではなく、任意で、一本鎖可変断片(scFv)ではない。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、抗CD3抗体または抗原結合断片はFv抗体断片である。いくつかの例では、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。

【0043】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、抗CD3抗体または抗原結合断片は、アミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO: 29) を含むVH CDR1;

アミノ酸配列

RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30)

40

を含むVH CDR2;

アミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

を含むVH CDR3、

アミノ酸配列

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

50

を含むVL CDR1;

アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 33) を含むVL CDR2;および

アミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 34) を含むVL CDR3

を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、抗CD3抗体または抗原結合断片は

、SEQ ID NO: 27、35～65、341、343、および358のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 27、35～65、341、343、および358のいずれかに対して少なくとも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し、かつCD3に結合するVH;ならびにSEQ ID NO: 28、66～84、293、340、および342のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 28、66～84、293、340、および342のいずれかに対して少なくとも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し、かつCD3に結合するVLを含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、抗CD3抗体または抗原結合断片は、SEQ ID NO: 27、35～65、341、343、358、388、389、392、393のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 27、35～65、341、343、358、388、389、392、393のいずれかに対して少なくとも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し、かつCD3に結合するVH;ならびにSEQ ID NO: 28、66～84、293、340、342、390、391、394、395のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 28、66～84、293、340、342、390、391、394、395のいずれかに対して少なくとも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し、かつCD3に結合するVLを含む。上記のVHおよびVL配列はどれでも、本明細書で提供される構築物の抗CD3抗体または抗原結合断片において、あらゆる組み合わせとして組み合わせることができる。

【0044】
提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、ヒト5T4のエピトープに結合するが、マウス5T4との交差反応結合は示さない。

【0045】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO: 382のアミノ酸60～112間のアミノ酸残基に結合する。

【0046】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO: 382のアミノ酸173～224間のアミノ酸残基に結合する。

【0047】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの抗原結合ドメインは、SEQ ID NO: 382のアミノ酸173～224間のアミノ酸残基に結合する。

【0048】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、抗CD3抗体または抗原結合断片は、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 75のアミノ酸配列を含む。いくつかの例では、抗CD3抗体または抗原結合断片は、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 293のアミノ酸配列を含む。いくつかの例では、抗CD3抗体または抗原結合断片は、SEQ ID NO: 341のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 342のアミノ酸配列を含む。

【0049】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4シングルドメイン抗体は、多重特異性ポリペプチド構築物の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づけられる。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、多重特異性ポリペプチド構築物は、5T4に特異的に結合する第1の5T4 VHHドメイン、および5T4に特異的に結合する第2の5T4 VHHドメインを含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1または第2の5T4 VHHドメインは、多重特異性構築物のFc領域に対してアミノ末端に位置づけられ、第1または第2の5T4 VHHドメインのもう一方は、多重特異性構築物のCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられる。

【0050】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1のポリペプチドは、N末端からC末端へ

の順序で、5T4に結合する第1の5T4 VHH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5T4に結合する第2の5T4 VHHドメインを含み;第2のポリペプチドは、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、任意で、第1のポリペプチド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ドメインのもう一方を含む。

【0050】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、同じである。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、異なっている。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、5T4の別個のもしくは重複しないエピトープに結合し、かつ/または5T4に対する結合について競合しない。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 382に示される残基に対応する5T4細胞外ドメインのアミノ酸残基60~112間に位置するエピトープに結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、5T4 VHHドメインは、5T4細胞外ドメインSEQ ID NO: 382に示される残基に対応するアミノ酸残基173~224間に位置するエピトープに結合する。

10

【0051】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、5T4細胞外ドメインの同じまたは重複するエピトープに結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメイン両方が、SEQ ID NO: 382に示される残基に対応する5T4細胞外ドメインのアミノ酸残基60~112間に位置するエピトープに結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメイン両方が、SEQ ID NO: 382に示される残基に対応する5T4細胞外ドメインのアミノ酸残基173~224間に位置するエピトープに結合する。

20

【0052】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、5T4細胞外ドメインの異なるエピトープに結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1の5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 382に示される残基に対応する5T4細胞外ドメインのアミノ酸残基60~112間に位置するエピトープに結合し、第2の5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 382に示される残基に対応する5T4細胞外ドメインのアミノ酸残基173~224間に位置するエピトープに結合する。

30

【0053】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1のVHHドメインまたはsdAbは、SEQ ID NO: 245~254、295、302のいずれか1つに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO: 245~254、295、302のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合し;第2のVHHドメインまたはsdAbは、SEQ ID NO: 255~287、294のいずれか1つに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO: 255~287、294のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。

40

【0054】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1のVHHドメインまたはsdAbは、SEQ ID NO: 245~254、295、302、360のいずれか1つに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO: 245~254、295、302、360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合し;第2のVHHドメインまたはsdAbは、SEQ ID NO: 255~287、294のいずれか1つに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO: 255

50

~287、294のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。

【0055】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の抗体(5T4 VHHドメイン)は、それぞれSEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 294から選択される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 276から選択される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 255から選択される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 294から選択される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 295およびSEQ ID NO: 294から選択される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 249およびSEQ ID NO: 270から選択される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 254およびSEQ ID NO: 287から選択される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 302およびSEQ ID NO: 302から選択される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 360およびSEQ ID NO: 287から選択される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 245~287、294、295、302、もしくは360のいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO: 245~287、294、295、302、もしくは360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。

【0056】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 360に示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO: 360に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。

【0057】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、(i) SEQ ID NO: 245に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 245のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 245に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 86~87および288~292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1; SEQ ID NO: 88~99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2; ならびにSEQ ID NO: 100~102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、それぞれSEQ ID NO: 288、88、および100; それぞれSEQ ID NO: 289、88、および100; それぞれSEQ ID NO: 290、90、および101; それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101; それぞれSEQ ID NO: 290、92、および101; それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101; それぞれSEQ ID

NO: 290、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 292、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 86、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 87、95、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、96、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、97、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、99、および102;それぞれSEQ ID NO: 86、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 296、298、および300;それぞれSEQ ID NO: 297、299、および301;またはそれぞれSEQ ID NO: 288、88、および303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

【0058】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 246~254のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 246~254に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 246~254のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。

10

【0059】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 360に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 360に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 360に示されるアミノ酸の配列を含む。

20

【0060】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、(i) SEQ ID NO: 255に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 255のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 255に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 86、290~292からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 89~94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 101に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの例では、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、それぞれSEQ ID NO: 290、90、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、92、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 292、94、および101;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、94、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

30

40

【0061】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 256~275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 256~275に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイ

50

ン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 256 ~ 275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。いくつかの例では、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、(i) SEQ ID NO: 276に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 276のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 276に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2のsdAbの各々は、独立して、SEQ ID NO: 86および87からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 95 ~ 99からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびにSEQ ID NO: 102に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、それぞれSEQ ID NO: 87、95、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、96、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、97、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、99、および102;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、98、および102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 277 ~ 287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 277 ~ 287に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 277 ~ 287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、(i) SEQ ID NO: 294に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立してSEQ ID NO: 296に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 298に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 300に示されるアミノ酸配列を含むCDR3、を含む。

【0062】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、(i) SEQ ID NO: 295に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 295のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 295に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 297に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 299に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 301に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、(i) SEQ ID NO: 302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかで

は、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 288に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 303に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0063】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2のsdAbの各々は、独立して、(i) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に示される配列(ii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。

10

【0064】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、それぞれSEQ ID NO: 296、298、および300;それぞれSEQ ID NO: 297、299、および301;またはそれぞれSEQ ID NO: 288、88、および303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

【0065】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 245、249、255、270、276、294、295、または302に示される。

20

【0066】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または第1および第2の5T4 VHHドメインの各々は、独立して、SEQ ID NO: 245、249、254、255、270、276、287、294、295、302、または360に示される。

【0067】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の構成要素の一方または両方は、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(CRBR)を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)は、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端に、かつ/またはCD3結合領域にて対しカルボキシ末端に位置づけられる。いくつかの態様では、多重特異性ポリペプチド構築物は、共刺激受容体結合領域(CRBR)を1つだけ含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)は、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端に位置づけられる。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)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づけられる。

30

【0068】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1のポリペプチドは、N末端からC末端への順序で、5T4に結合する第1の5T4 VHH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5T4に結合する第2の5T4 VHHドメインを含み;第2のポリペプチドは、CRBRを含み、かつ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、任意で、第1のポリペプチド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ドメインのもう一方を含み、ここでCRBRは、第2のポリペプチドのFc領域に対してアミノ末端に、あるいは抗CD3抗体または抗原結合断片に対してカルボキシ末端に位置づけられる。

40

【0069】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)は、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に対する結合活性を示すそのバリエーションである、あるいはそれ

50

を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）は、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される、抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの例では、抗体またはその抗原結合断片は、Fv、scFv、Fab、シングルドメイン抗体（sdAb）、VNAR、またはVHHである。いくつかの場合では、抗体または抗原結合断片はsdAbである。いくつかの態様では、sdAbはヒトsdAbまたはヒト化sdAbである。いくつかの態様では、sdAbはVNARまたはVHHである。

【0070】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）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CAMLインタラクタ（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。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）は、41BB（CD137）、OX40（CD134）、およびグルコシルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質（GITR）の中から選択される共刺激受容体に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）は、SEQ ID NO: 210に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 210に示される配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する配列を含み、かつ4-1BBに結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）は、SEQ ID NO: 210に示されるアミノ酸の配列、を含み、かつ4-1BBに結合する。

【0071】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1および第2の構成要素の一方または両方は、抑制性受容体に結合する少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）は、多重特異性ポリペプチド構築物の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づけられる。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、多重特異性ポリペプチド構築物は、抑制性受容体結合領域（IRBR）を1つだけ含む。

【0072】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1のポリペプチドは、N末端からC末端への順序で、5T4に結合する第1の5T4 VHH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5T4に結合する第2の5T4 VHHドメインを含み、第2のポリペプチドは、IRBRを含み、かつ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、任意で、第1のポリペプチド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ドメインのもう一方を含み、ここでIRBRは、第2のポリペプチドのFc領域に対してアミノ末端に、あるいは抗CD3抗体または抗原結合断片に対してカルボキシ末端に位置づけられる。

【0073】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つのIRBRは、抑制性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、または抑制性受容体に対する結合活性を示すそのバリエーションである、あるいはそれを含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つのIRBRは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片である。いくつかの態様では、抗体またはその抗原結合断片は、Fv、scFv、Fab、シングルドメイン抗体（sdAb）、VNAR、またはVHHである。いくつかの場合では、抗体または抗原結合断片はsdAbである。い

10

20

30

40

50

くつかの態様では、sdAbはヒトsdAbまたはヒト化sdAbである。

【0074】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つのIRBRは、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、およびTIM3の中から選択される抑制性受容体に結合する。いくつかの例では、少なくとも1つのIRBRはPD-1に結合する。

【0075】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、第1のポリペプチドは、N末端からC末端への順序で、5T4に結合する第1の5T4 VHH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5T4に結合する第2の5T4 VHHドメインを含み;第2のポリペプチドは、N末端からC末端への順序で、IRBRまたはCRBRのうちの一方、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、任意で、第1のポリペプチド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ドメインのもう一方、およびCRBRまたはIRBRのもう一方を含む。

10

【0076】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、リンカーはペプチドリinkerまたはポリペプチドリinkerであり、任意で、リンカーは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。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、リンカーは切断不可能なリンカーである。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、切断不可能なリンカーはGGである、またはGGを含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、切断不可能なリンカーは、GS, GGS, GGGGS (SEQ ID NO:125),

20

GGGGGS (SEQ ID NO:126)

、およびそれらの組み合わせを含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、リンカーは、配列

GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:127)

である、またはそれを含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、リンカーは切断可能なリンカーである。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、切断可能なリンカーは、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。

30

【0077】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、プロテアーゼは、免疫エフェクター細胞により、腫瘍により、または腫瘍微小環境に存在する細胞により生産される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、プロテアーゼは、免疫エフェクター細胞により生産され、免疫エフェクター細胞は、活性化したT細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、またはNK T細胞である。いくつかの例では、プロテアーゼは、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の中から選択される。いくつかの場合では、プロテアーゼはグランザイムBである。

【0078】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列GGSGGGIEPDI GGSGGS (SEQ ID NO:171)

40

を含む。

【0079】

本明細書では、SEQ ID NO: 86~87および288~292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1);SEQ ID NO: 88~99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2);ならびにSEQ ID NO: 100~102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)を含む、5T4に結合する、単離

50

されたシングルドメイン抗体が提供される。いくつかの態様では、単離されたシングルドメイン抗体は、SEQ ID NO: 245~287、294、295、302のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 245~287、294、295、302のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。

【0080】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、単離されたシングルドメイン抗体は、ヒト5T4のエピトープに結合するが、マウス5T4との交差反応結合は示さない。

【0081】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、単離されたシングルドメイン抗体は、SEQ ID NO: 382のアミノ酸60~112間のアミノ酸残基に結合する。

【0082】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、単離されたシングルドメイン抗体は、SEQ ID NO: 382のアミノ酸173~224間のアミノ酸残基に結合する。

【0083】

本明細書では、SEQ ID NO: 86~87および288~292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1);SEQ ID NO: 88~99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2);ならびにSEQ ID NO: 100~102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)を含む、5T4に結合する、単離されたシングルドメイン抗体が提供される。いくつかの態様では、単離されたシングルドメイン抗体は、SEQ ID NO: 245~287、294、295、302、360のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 245~287、294、295、302、360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。

【0084】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、シングルドメイン抗体は、(i) SEQ ID NO: 245に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 245のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 245に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 288および289からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびにSEQ ID NO: 100に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、それぞれSEQ ID NO: 288、88、および100;またはそれぞれSEQ ID NO: 289、88、および100に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 246~254のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 246~254に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 246~254のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。

【0085】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、シングルドメイン抗体は、(i) SEQ ID NO: 245に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 245のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 245に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sd

10

20

30

40

50

Abは、SEQ ID NO: 288および289からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびにSEQ ID NO: 100に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、それぞれSEQ ID NO: 288、88、および100;またはそれぞれSEQ ID NO: 289、88、および100に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 246~254、もしくは360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 246~254に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 246~254、または360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。

10

【0086】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、(i) SEQ ID NO: 255に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 255のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 255に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 86、290~292に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 89~94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 101に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、それぞれSEQ ID NO: 290、90、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、92、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 292、94、および101;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、94、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

20

【0087】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 256~275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 256~275に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 256~275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、(i) SEQ ID NO: 276に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 276のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 276に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 86および87からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 95~99からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびにSEQ ID NO: 102に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。いくつかの例では、sdAbは、それぞれSEQ ID NO: 87、95、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、96、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、97、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、99、および102;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、98、および102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

30

40

【0088】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 277~287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 277~287に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは

50

、SEQ ID NO: 277～287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む。

【0089】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、(i) SEQ ID NO: 294に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 296に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 298に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 300に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。

【0090】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 288、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;ならびに/またはSEQ ID NO: 88、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2を含む。

【0091】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、(i) SEQ ID NO: 295に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 295のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 295に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 297に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 299に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 301に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、(i) SEQ ID NO: 302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、SEQ ID NO: 288に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 303に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、sdAbは、(i) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 296、298、および300;それぞれSEQ ID NO: 297、299、および301;またはそれぞれSEQ ID NO: 288、88、および303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

【0092】

本明細書では、本明細書で提供されるいずれかの5T4結合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが提供される。

【0093】

本明細書では、本明細書で提供されるいずれか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が提供される。

【0094】

本明細書では、本明細書で提供されるいずれか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、および該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の核酸配列を含む、ポリヌクレオチドが提供され、第1の核酸配列と第2の核酸配列とは、配列内リボソーム進入部位(IRES)、または自己切断ペプチドもしくはリボ

10

20

30

40

50

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り、隔てられている。いくつかの態様では、第1の核酸配列および第2の核酸配列は、同じプロモーターに機能的に連結されている。

【0095】

提供されるいずれかの態様のいくつかでは、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は、T2A、P2A、E2A、またはF2Aから選択される。

【0096】

本明細書では、提供されるいずれかのシングルドメイン抗体をコードするポリヌクレオチドが提供される。

10

【0097】

本明細書では、提供されるいずれかのポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、ベクターは発現ベクターである。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、ベクターはウイルスベクターまたは真核生物ベクターであり、任意で、真核生物ベクターは哺乳類ベクターである。

【0098】

本明細書では、提供されるいずれかの1つもしくは複数のポリヌクレオチド、または提供されるいずれかの1つもしくは複数のベクターを含む、細胞が提供される。いくつかの態様では、細胞は組換えであるかまたは単離されている。いくつかの態様では、細胞は哺乳類細胞である。

20

【0099】

本明細書では、ポリペプチドを生産する方法が提供され、方法は、提供されるいずれかの1つもしくは複数のポリヌクレオチドまたは提供されるいずれかの1つもしくは複数のベクターを細胞に導入する工程、および多重特異性ポリペプチド構築物を生産する条件で該細胞を培養する工程を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、方法は、該細胞からポリペプチドを単離または精製する工程をさらに含む。

【0100】

本明細書では、提供されるいずれかの方法により生産されるポリペプチドが提供される。

【0101】

本明細書では、提供されるいずれかのシングルドメイン抗体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、キメラ抗原受容体を含む、操作された免疫細胞が提供される。いくつかの態様では、細胞はリンパ球である。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、細胞はT細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞である。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM）シグナル伝達ドメインを含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータシグナル伝達ドメイン、任意で、ヒトCD3ゼータシグナル伝達ドメインである、またはそれを含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激分子のシグナル伝達ドメインをさらに含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、共刺激分子は、CD28、ICOS、41BB、またはOX40、任意で、ヒトCD28、ヒトICOS、ヒト41BB、またはヒトOX40である。

30

40

【0102】

本明細書では、提供されるいずれかの5T4結合ポリペプチド、多重特異性ポリペプチド構築物、シングルドメイン抗体、または操作された免疫細胞を含む、薬学的組成物が提供される。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を含む。いくつかの態様では、薬学的組成物は無菌である。

【0103】

本明細書では、対象内で免疫応答を刺激または誘導する方法が提供され、方法は、それが必要とする対象に、提供されるいずれかの5T4結合ポリペプチド、多重特異性ポリペプチド構築物、シングルドメイン抗体、もしくは操作された免疫細胞、または薬学的組成物

50

を投与する工程を含む。いくつかの態様では、免疫応答は、腫瘍またはがんに対して、任意で、5T4を発現する腫瘍またはがんに対して、増加する。いくつかの態様では、方法は、対象の疾患または状態を治療する。

【0104】

本明細書では、対象の疾患または状態を治療する方法が提供され、方法は、それを必要とする対象に、治療有効量の提供されるいずれかの5T4結合ポリペプチド、多重特異性ポリペプチド構築物、シングルドメイン抗体、もしくは操作された免疫細胞、または薬学的組成物を投与する工程を含む。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、疾患または状態は腫瘍またはがんである。提供されるいずれかの態様のいくつかでは、該対象はヒトである。

10

【図面の簡単な説明】

【0105】

【図1A】図1A～Bは、5T4を標的とするさまざまなシングルドメイン抗体が細胞表面5T4に結合する能力を表す。結合は、内在的に5T4を発現するHEK-293 freestyle細胞のフローサイトメトリーにより評価した。

【図1B】図1Aの説明を参照のこと。

【図2A】図2A～2Fは、5T4を標的とするsdAbおよびそのヒト化バリエーションがT47D細胞の細胞表面5T4に結合する能力を表す。結合は、5T4陽性細胞株T47Dのフローサイトメトリーにより評価した。図2A～2Cは、T47D上での12E9およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。図2D～2Eは、T47D上での14B5およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。図2Fは、T47D上での16G10およびそのヒト化バリエーションの結合を示す。ここで5T4 sdAbはヒトFcと機能的に連結されていた。

20

【図2B】図2Aの説明を参照のこと。

【図2C】図2Aの説明を参照のこと。

【図2D】図2Aの説明を参照のこと。

【図2E】図2Aの説明を参照のこと。

【図2F】図2Aの説明を参照のこと。

【図3A】図3A～Eは、41BB結合ドメインなし（図3A、3C、3E）および41BB結合ドメインあり（図3B、3D）の、代表的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージャーを表す。cx3546およびcx3547は、ヘテロ二量体の一方の鎖のN末端に位置づけられた同じ5T4標的sdAb（12E9）、およびヘテロ二量体の一方の鎖のC末端に位置づけられた別個の5T4標的sdAb（それぞれ14B5または16G10）を有する。cx3499およびcx3497は、それぞれcx3546およびcx3547と同一であるが、ヘテロ二量体の相対する鎖のC末端に位置づけられた41BB標的sdAbを有する。cx3546、cx3547、cx3499、およびcx3497の各々が、Fc領域とCD3結合領域との間に切断可能なリンカーを含有している。cx5185とcx5951とは同じであるが、前者はCD3結合領域のC末端に位置づけられた、41BBを標的とするsdAbを含み、両方が、Fc領域とCD3結合領域との間に切断可能なリンカーを含有しており、かつFcヘテロ二量体のN末端およびC末端に位置づけられたヒト化バージョンの5T4標的sdAb、hz12E9v9およびhz16G10v11を含有している。これらの、代表的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージャーは、5T4に対して二価の結合を示し、41BB結合ドメインを含有する構築物では、41BBに対して一価の結合を示す。

30

40

【図3B】図3Aの説明を参照のこと。

【図3C】図3Aの説明を参照のこと。

【図3D】図3Aの説明を参照のこと。

【図3E】図3Aの説明を参照のこと。

【図4A】図4A～4Mは、さまざまな5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が、5T4陽性Ovcar-5細胞株と結合すること（左上）、および初代ヒトT細胞と結合しないこと（右上）を表す。下のパネルは、Ovcar-5および初代ヒトT細胞に対する結合を比較するための、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の滴定を示

50

す。結合は、抗ヒトIgG APC二次抗体を用いてフローサイトメトリーにより評価した。ヒストグラムは、各構築物200 nMでの正規化細胞数対蛍光を示す。

【図4B】図4Aの説明を参照のこと。

【図4C】図4Aの説明を参照のこと。

【図4D】図4Aの説明を参照のこと。

【図4E】図4Aの説明を参照のこと。

【図4F】図4Aの説明を参照のこと。

【図4G】図4Aの説明を参照のこと。

【図4H】図4Aの説明を参照のこと。

【図4I】図4Aの説明を参照のこと。

【図4J】図4Aの説明を参照のこと。

【図4K】図4Aの説明を参照のこと。

【図4L】図4Aの説明を参照のこと。

【図4M】図4Aの説明を参照のこと。

10

【図5A】図5A～5Fは、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が5T4依存性T細胞活性化を惹起する能力を表す。Jurkat CD3 NFAT-GFPレポーター細胞株を用いてT細胞活性化を観察した。Ovcar-5細胞を抗原陽性細胞として用い（図5A、5C、5E）、CCRF-CEM細胞を抗原陰性細胞として用いた（図5B、5D、5F）。

【図5B】図5Aの説明を参照のこと。

【図5C】図5Aの説明を参照のこと。

【図5D】図5Aの説明を参照のこと。

【図5E】図5Aの説明を参照のこと。

【図5F】図5Aの説明を参照のこと。

20

【図6A】図6Aおよび6Bは、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の、5T4陽性細胞株Ovcar-5に対して抗原特異的T細胞細胞傷害性を媒介する能力（図6A）、および5T4陰性細胞株CCRF-CEMに対する細胞傷害性の欠如（図6B）を表す。

【図6B】図6Aの説明を参照のこと。

【図7A】図7A～7Dは、フローサイトメトリーにより、活性化マーカーCD25の分析により評価した、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物がCD4 T細胞（図7A～7B）およびCD8 T細胞（図7C～7D）に対して抗原特異的T細胞活性化を媒介する能力を表す。5T4陽性細胞株Ovcar-5、または5T4陰性細胞株CCRF-CEMを用いて、例示的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が媒介する細胞活性化を評価した。

30

【図7B】図7Aの説明を参照のこと。

【図7C】図7Aの説明を参照のこと。

【図7D】図7Aの説明を参照のこと。

【図8A】図8A～8Dは、フローサイトメトリーにより、活性化マーカーCD69の分析により評価した、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物がCD4 T細胞（図8A～8B）およびCD8 T細胞（図8C～8D）に対して抗原特異的T細胞活性化を媒介する能力を表す。5T4陽性細胞株Ovcar-5、または5T4陰性細胞株CCRF-CEMを用いて、例示的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が媒介する細胞活性化を評価した。

40

【図8B】図8Aの説明を参照のこと。

【図8C】図8Aの説明を参照のこと。

【図8D】図8Aの説明を参照のこと。

【図9A】図9A～9Dは、フローサイトメトリーにより、活性化マーカーCD71の分析により評価した、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物がCD4 T細胞（図9A～9B）およびCD8 T細胞（図9C～9D）に対して抗原特異的T細胞活性化を媒介する能力を表す。5T4陽性細胞株Ovcar-5、または5T4陰性細胞株CCRF-CEMを用いて、例示的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が媒介する細胞活性化を評

50

価した。

【図 9 B】図 9 A の説明を参照のこと。

【図 9 C】図 9 A の説明を参照のこと。

【図 9 D】図 9 A の説明を参照のこと。

【図 10】図 10 A ~ 10 C は、5 T 4 を標的とする制約付き CD 3 エンゲージング構築物が T 細胞から抗原依存性様式で IFN ガンマ (図 10 A および 10 B) または TNF アルファ (図 10 C) の生産を惹起する能力を示す。サイトカイン生産は、ELISA 法 (図 10 A) または FluoroSpot アッセイ (図 10 B および 10 C) を用いて観察した。

【図 11 A】図 11 A は、フローサイトメトリーにより、CD 107 a 発現により評価した、s dAb-Fc としてフォーマットされた 5 T 4 s dAb、12 E 9 および 4 D 3 が、NK 細胞活性化を媒介する能力を示す。図 11 B ~ 11 D は、NFAT 駆動ルシフェラーゼレポーター遺伝子を有する、CD 16 a を安定発現するように操作された Jurkat レポーター細胞株を用いての、ADCC 活性の代用の CD 16 レポーター活性化アッセイの結果を表す。図 11 B は、5 T 4 + 細胞の存在下または非存在下の、かつ 50 nM の図示の s dAb-Fc または h z s dAb-Fc で処理された、ルシフェラーゼレポーターの相対発光ユニット (RLU) を表す。図 11 C および 11 D は、5 T 4 + 細胞の存在下 (図 11 C) または非存在下 (図 11 D) の、かつ図示の滴定 h z s dAb-Fc で処理された、ルシフェラーゼレポーターの RLU を表す。

【図 11 B】図 11 A の説明を参照のこと。

【図 11 C】図 11 A の説明を参照のこと。

【図 11 D】図 11 A の説明を参照のこと。

【図 12 A】図 12 A ~ 12 D は、代表的な 5 T 4 を標的とする制約付き CD 3 エンゲージング構築物 c x 3 4 9 7 (41BB 結合ドメインあり) および c x 3 5 4 7 (41BB 結合ドメインなし) の細胞結合を表す。図 12 A および図 12 B は、Ovcar-5 細胞 (5 T 4 陽性メラノーマ細胞株) に対する結合を示す。図 12 C および図 12 D は T 細胞に対する結合を表し、試験構築物が単離状態の T 細胞に結合しないことを示している。図 12 A および図 12 C は、各構築物 200 nM での正規化細胞数対蛍光のヒストグラムを示す。さまざまな細胞型に対する各構築物の全滴定を図 12 B および図 12 D に示す。図 12 A および 12 C では、二次抗ヒト APC 抗体のみの対照を黒塗りトレースに示し、陽性対照の抗 CD 3 結合をオープントレースに示し、c x 3 5 4 7 および c x 3 4 9 7 をグレーの網掛けトレースに示す。

【図 12 B】図 12 A の説明を参照のこと。

【図 12 C】図 12 A の説明を参照のこと。

【図 12 D】図 12 A の説明を参照のこと。

【図 13 A】図 13 A および 13 B は、代表的な 5 T 4 を標的とする制約付き CD 3 エンゲージング構築物 c x 3 4 9 7 (41BB 結合ドメインあり) および c x 3 5 4 7 (41BB 結合ドメインなし) により媒介される、5 T 4 陽性細胞株 Ovcar-5 (図 13 A) に対する、および 5 T 4 陰性細胞株 CCRF-CEM (図 13 B) に対する、T 細胞細胞傷害性の動態を表す。合計の重複面積は、蛍光標識標的細胞における二重陽性：切断型カスパーゼ-3/7 基質を表す。抗原陰性細胞株に対して当初観測された細胞傷害性は、標的細胞と T 細胞との MHC ミスマッチにより媒介された可能性が高い。注目すべきことに、41BB 結合ドメインを含有する c x 3 4 9 7 だけが、細胞傷害性を誘導することができ、その動態は TCR シグナル伝達後の 41BB 上方制御に一致する。

【図 13 B】図 13 A の説明を参照のこと。

【図 14】5 T 4 陽性 Ovcar-5 細胞および 5 T 4 陰性 CCRF-CEM 細胞の存在下、41BB 結合ドメインありの c x 3 4 9 9 および c x 3 4 9 7 ならびに 41BB 結合ドメインなしの c x 3 5 4 6 および c x 3 5 4 7 の、代表的な 5 T 4 を標的とする制約付き CD 3 エンゲージング構築物で処理した T 細胞による IFN 生産の比較を示す。サイトカイン生産は、ELISA により観察した。c x 3 5 4 6 と c x 3 4 9 9 とは同じ 5 T 4 標的 s dAb を含有し、c x 3 5 4 7 と c x 3 4 9 7 とは同じ 5 T 4 標的 s dAb を含有した。したがって、これらの構築物のセット間の唯一の違いは、41BB 結合ドメインの付加である。41BB 結合ドメインが組み込まれた、5 T 4 を標的とする制約付き CD 3 エンゲージング構築物は、抗原依存性様式で T 細胞から IFN 生産を誘導する増

10

20

30

40

50

大した能力を示す。

【図15】図15Aおよび15Bは、41BB結合ドメインありのcx5185および41BB結合ドメインなしのcx5951の、例示的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物に誘発されるT細胞媒介性細胞傷害性の効力を表す。5T4陽性Ovcar5細胞株および5T4陰性CCRF-CEM細胞株に対する200 nM ~ 3.1 pMの滴定範囲のCD3エンゲージング構築物について、それぞれ図15Aおよび図15Bに示す。

【図16A】図16Aおよび図16Bは、5T4陽性細胞、A375、Ovcar-5、およびSHP-77の存在下、41BB結合ドメインありのcx5185および41BB結合ドメインなしのcx5951の、代表的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物とのインキュベーションに続いての、CD4（図16A）細胞およびCD8（図16B）細胞上のCD25発現により評価した、T細胞活性化を表す。T細胞活性化は、フローサイトメトリーにより細胞表面のCD25発現を観察して評価した。

10

【図16B】図16Aの説明を参照のこと。

【図17】5T4陽性細胞株、A375、SHP-77、およびOvcar5の存在下、滴定された41BB結合ドメインありのcx5185および41BB結合ドメインなしのcx5951の、代表的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物で処理したT細胞によるIFN 産生の比較を示す。

【図18】5T4陽性細胞株A375、Ovcar-5、およびSHP-77の存在下、41BB結合ドメインありのcx5185および41BB結合ドメインなしのcx5951の、代表的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物とのインキュベーションに続いての、CD4 T細胞の、T細胞増殖を表す。T細胞増殖は、CellTrace（商標）色素の希釈で観察した。結果は、CellTrace（商標）Violet色素の希釈により観察した増殖細胞のパーセントを表す。

20

【図19】5T4陽性細胞株A375、Ovcar-5、およびSHP-77の存在下、41BB結合ドメインありのcx5185および41BB結合ドメインなしのcx5951の、代表的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物とのインキュベーションに続いての、CD8 T細胞の、T細胞増殖を表す。T細胞増殖は、CellTrace（商標）色素の希釈で観察した。結果は、CellTrace（商標）Violet色素の希釈により観察した増殖細胞のパーセントを表す。

【図20】5T4陽性細胞A375、Ovcar-5、およびSHP-77の存在下、41BB結合ドメインありのcx5185および41BB結合ドメインなしのcx5951の、代表的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物とのインキュベーションに続いての、CD4 T細胞におけるミトコンドリア機能の評価を表す。ミトコンドリア機能を、フローサイトメトリーにより、活性ミトコンドリア内に蓄積するミトコンドリア選択性蛍光プローブMitoTracker Greenにより評価した。

30

【図21】5T4陽性細胞A375、Ovcar-5、およびSHP-77の存在下、41BB結合ドメインありのcx5185および41BB結合ドメインなしのcx5951の、代表的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物とのインキュベーションに続いての、CD8 T細胞におけるミトコンドリア機能の評価を表す。ミトコンドリア機能を、フローサイトメトリーにより、活性ミトコンドリア内に蓄積するミトコンドリア選択性蛍光プローブMitoTracker Greenにより評価した。

40

【図22】41BB結合ドメインなしの同じ構築物のcx5951ではなく、41BB結合ドメインありの、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物cx5185が、41BBシグナル伝達を媒介する能力を示す。Jurkat 41BB NFkB-ルシフェラーゼレポーター細胞、および抗原ソースとして組換えプレート結合5T4を用いて、41BBシグナル伝達を観察した。

【図23】図23A~Bは、共刺激受容体結合領域（CRBR）を有する、例示的なTAAを標的とする制約付きCD3エンゲージャーを表す。構築物は、ヘテロ二量体の一方の鎖であるFcノブ（knob）のN末端およびC末端に位置づけられた抗原標的sdAbを有し、かつヘテロ二量体の相対する鎖であるFcホール（hole）のC末端に位置づけられた共刺激受容

50

体結合領域（CRBR）を有するが、互いに対して相対して位置づけられたCD3結合FvのVHおよびVLを有する。

【図24A】図24は、図23A～Bに記載される例示的な構築物のT細胞レポーターアッセイの結果を表す。図24Aおよび24Bは、TAA陽性細胞株A375またはTAA陰性細胞株CCRF-CEMのそれぞれをJurkat CD3 NFAT-GFPレポーター細胞と共培養した場合のGFPレポーターの平均蛍光強度（MFI）を表す。図24Cおよび24Dは、TAA陽性細胞株A375またはTAA陰性細胞株CCRF-CEMのそれぞれをJurkat CD3 NFAT-ルシフェラーゼレポーター細胞と共培養した場合の、ルシフェラーゼレポーターの相対発光ユニット（RLU）を表す。

【図24B】図24Aの説明を参照のこと。

【図24C】図24Aの説明を参照のこと。

【図24D】図24Aの説明を参照のこと。

【図25】エピトープマッピングに用いたさまざまなハイブリッドマウス/ヒト5T4構築物の概略図である。ヒト5T4細胞外ドメイン（ECD）の領域を、マウス5T4全長構築物の対応する領域の代わりとして移植した。sdAbは、ヒト5T4とは結合できるが、マウス5T4とは結合できない。sdAbの、ハイブリッドマウス/ヒト5T4に対する結合は、sdAbが結合したエピトープが移植領域内にあったことを示した。

【図26】図26Aは、12E9v9の、さまざまなハイブリッドマウス/ヒト5T4構築物に対する結合を表し、このsdAbが認識するエピトープが、おそらくアミノ酸残基60～112間（SEQ ID NO: 411）にあることを実証している。図26Bは、16G10v11の、さまざまなハイブリッドマウス/ヒト5T4構築物に対する結合を表し、このsdAbが認識するエピトープが、おそらくアミノ酸残基173～224間（SEQ ID NO: 412）にあることを実証している。図26Cは、14B5v17の、さまざまなハイブリッドマウス/ヒト5T4構築物に対する結合を表し、このsdAbが認識するエピトープが、おそらくアミノ酸残基173～224間（SEQ ID NO: 412）にあることを実証している。HuおよびMuは、それぞれ全長ヒトおよびマウス5T4細胞外ドメイン構築物を表す。

【図27】図27A～27Bは、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が5T4依存性T細胞活性化を惹起する能力を表す。Jurkat CD3 NFAT-GFPレポーター細胞株を用いてT細胞活性化を観察した。SKOV-3（図27A）細胞を抗原陽性細胞として用い、CCRF-CEM（図27B）を抗原陰性細胞として用いた。

【発明を実施するための形態】

【0106】

詳細な説明

本明細書では、5T4に特異的に結合する、以後5T4結合ポリペプチドとも呼ばれるポリペプチドが提供される。いくつかの態様では、提供される結合ポリペプチドは、5T4に結合する少なくとも1つのVHHドメインを含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4結合ポリペプチドは、それぞれ個別に5T4に結合する1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのVHHドメインを含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4結合ポリペプチドは、5T4に結合する1つ、2つ、3つ、または4つのVHHドメインを含む。いくつかの態様では、5T4結合ポリペプチドは一特異性である。いくつかの態様では、5T4結合ポリペプチドは多重特異性である。たとえば、提供される5T4結合ポリペプチドは、5T4に結合する少なくとも1つのVHHドメイン、および5T4以外の1つまたは複数の標的タンパク質に結合する、1つまたは複数の追加のVHHドメインなどの、1つまたは複数の追加の結合ドメインを含み得る、ポリペプチドを含む。

【0107】

いくつかの態様では、5T4結合ポリペプチドは、5T4に結合する少なくとも1つのVHHドメイン、およびFcドメインを含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4結合ポリペプチドは、5T4に結合する1つ、2つ、3つ、または4つのVHHドメイン、およびFcドメインを含む。いくつかの態様では、Fcドメインは、生理条件で5T4結合ポリペプチドの二量体化を媒介するので、二量体が形成され、5T4結合部位の数が倍増する

10

20

30

40

50

。たとえば、5T4に結合する3つのVHHドメイン、およびFc領域を含む5T4結合ポリペプチドは、単量体として三価であるが、Fc領域が生理条件で二量体化を媒介できるので、そのような条件下では該5T4結合ポリペプチドは六価の二量体として存在する。

【0108】

5T4がん胎児性抗原（栄養膜細胞糖タンパク質、TPBG;5T4がん胎児性栄養膜細胞糖タンパク質;およびWnt活性化阻害因子1、WAI F1としても知られる）は、合胞体栄養細胞マイクロウイルス膜糖タンパク質で免疫されたマウス脾細胞由来のハイブリドーマにより産生される、マウスのモノクローナル抗体により同定される72kDaの糖タンパク質である。5T4は、限定ではないが、腎細胞がん、頭頸部扁平細胞がん、結腸直腸がん、卵巣がん、および胃がんなどの、多種多様な腫瘍細胞および腫瘍脈管構造の表面に発現する。5T4のcDNAを細胞株に形質導入すると、細胞運動性が増大し、かつ細胞間接触が減少し、それが機構的に悪性表現型に関与し得ることが示唆されている（Carsberg et al., 1996, Int J Cancer. 68 1:84-92）。それに加えて、5T4発現の上方制御は胚性幹（ES）細胞の分化初期における多能性喪失のマーカーであり、胚の発育中も上皮腫瘍の転移伝播時にも重要なプロセスである、上皮間葉転換の一体化コンポーネントが形成される（Southgate et al., 2010, PLoS One. 5(4):e9982）。5T4の発現は、正常組織では極めて限定的であるが、形質転換細胞株ならびに悪性腫瘍ではその発生全体に及び広く見られる（Hole & Stern, 1988, Br. J. Cancer, 57, 239-246; Southall et al., 1990, Br. J. Cancer, 61, 89-95.; Jones et al., 1990, Br. J. Cancer, 61, 96-100.; Starzynska et al. 1992, Br. J. Cancer 66: 867-869）。それに加えて、腫瘍組織上の5T4の高レベルな発現は、結腸直腸がん（Starzynska et al., 1992, Br. J. Cancer 66: 867-869）、胃がん（Starzynska et al., 1998, Eur J Gastroenterol Hepatol. 10(6):479-84）、卵巣がん（Wrigley et al., 1995, Int J Gynecol Cancer 5(4):269-274）、頭頸部扁平細胞がん（Kerk et al., 2017, Clin Cancer Res. 23(10): 2516-2527.）、および急性リンパ性白血病（McGinn et al., 2017, Haematologica, 102: 1075-1084）の進行した腫瘍ステージおよびより低い生存率と相関がある。

【0109】

ヒト5T4の例示的な配列を以下に示す。

MPGGCSRGAAGDGRRLRLARLALVLLGWVSSSSPTSSASSFSSSAPFLAS
AVSAQPPLPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEVPTDLPAYVRNLFLTG
NQLAVLPAGAFARRPPLAELAALNLSGSRLEVRAGAFEHLPSLRQLDLS
HNPLADLSPFAFSGSNASVSAPSPLVELILNHIVPPEDERQNRSEFGMVV
AALLAGRALQGLRRLELASNHFLYLPRDVLAAQLPSLRHLDLSSNLSVSLT
YVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLAELQGLPHIRVFLDNNPWVDCD
HMADMVTWLKETEVVQGDRLTCAYPEKMRNRVLELNSADLDCDPILPP
SLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYH
YRYEINADPRLTNLSSNSDV (SEQ ID NO:244, 下線はシグナル配列)

【0110】

いくつかの態様では、提供される5T4結合ポリペプチドは、ヒト5T4の細胞外ドメインに、たとえばSEQ ID NO: 382に示されるアミノ酸の配列内の領域またはエピトープに結合する。いくつかの局面では、提供される5T4結合ポリペプチドは、SEQ ID NO: 382に示されるヒト5T4の細胞外ドメイン内の連続アミノ酸配列に結合する。いくつかの態様では、エピトープは線状エピトープである。

【0111】

いくつかの態様では、少なくとも第1の5T4 VHHドメイン配列および第2の5T4 VHHドメイン配列を含有し、両方がSEQ ID NO: 382に示されるアミノ酸の配列内の領域またはエピトープに結合する、5T4結合ポリペプチドが提供される。いくつかの局面では、第1の5T4 VHHドメイン配列および第2の5T4 VHHドメイン配列の各々が、SEQ ID NO: 382に示されるヒト5T4の細胞外ドメイン内のアミノ酸の連続配列に結合する。い

いくつかの態様では、エピトープは線状エピトープである。いくつかの態様では、第1の5T4 VHHドメイン配列および第2の5T4 VHHドメイン配列は、5T4細胞外ドメイン内の同じまたは重複するエピトープに結合する。いくつかの態様では、第1の5T4 VHHドメイン配列および第2の5T4 VHHドメイン配列は、5T4細胞外ドメイン内の異なるエピトープに結合する。いくつかの態様では、第1の5T4 VHHドメインは、ヒト5T4細胞外ドメインのアミノ酸60～112（両端含む）（SEQ ID NO: 411に示される）内に存在するエピトープに結合し、第2の5T4 VHHドメインは、ヒト5T4細胞外ドメインのアミノ酸173～224（両端含む）（SEQ ID NO: 412に示される）内に存在するエピトープに結合する。いくつかの態様では、第1の5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 245に示されるアミノ酸配列、またはそのヒト化バリエーションを含み、第2の5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 276に示されるアミノ酸配列、またはそのヒト化バリエーションを含む。いくつかの態様では、第1の5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 360に示されるアミノ酸配列を含み、第2の5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 287に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【0112】

いくつかの態様では、5T4 VHHはマウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 245に示されるアミノ酸配列を含む5T4 VHH、またはそのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 255に示されるアミノ酸配列を含む5T4 VHH、またはそのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 276に示されるアミノ酸配列を含む5T4 VHH、またはそのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。

20

【0113】

いくつかの態様では、少なくとも第1の5T4 VHHドメインおよび第2の5T4 VHHドメインを含有する多重特異性ポリペプチド構築物が提供される。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 360に示されるアミノ酸配列を含む第1の5T4 VHHドメイン、およびSEQ ID NO: 360に示されるアミノ酸配列を含む第2の5T4 VHHドメインを含有する多重特異性ポリペプチド構築物が提供される。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 287に示されるアミノ酸配列を含む第1の5T4 VHHドメイン、およびSEQ ID NO: 287に示されるアミノ酸配列を含む第2の5T4 VHHドメインを含有する多重特異性ポリペプチド構築物が提供される。いくつかの態様では、少なくともSEQ ID NO: 360に示されるアミノ酸配列、またはそのヒト化バリエーションを含む第1の5T4 VHHドメイン、およびSEQ ID NO: 287に示されるアミノ酸配列、またはそのヒト化バリエーションを含む第2の5T4 VHHドメインを含有する多重特異性ポリペプチド構築物が提供される。

30

【0114】

いくつかの場合では、提供される5T4結合ポリペプチドは、5T4の活性を直接ブロックまたは阻害し、いくつかの局面では、腫瘍細胞の成長または生存を阻害するまたは低下させる治療剤として使用され得る。

【0115】

多様な5T4ポリペプチド結合形式が、提供される。いくつかの例において、5T4結合ポリペプチドには、5T4 VHH-Fcポリペプチドが含まれる。いくつかの態様において、Fcは、免疫エフェクター活性、例えば、抗体依存性細胞性細胞傷害活性（ADCC）、抗体依存性細胞性食作用（ADCP）、および/または補体依存性細胞傷害活性（CDC）などの1つまたは複数のエフェクター機能を示すFcである。

40

【0116】

いくつかの態様において、提供される5T4結合ポリペプチドを、対象において免疫応答を刺激するために用いることができ、これは、いくつかの局面において、対象においてがんなどの疾患または障害を処置する。いくつかの局面において、5T4-Fcなどの本明細書で提供される5T4結合ポリペプチドは、5T4発現腫瘍細胞に結合することができ、5T4を発現する腫瘍細胞に対する能動免疫応答を誘導することができる。いくつかの場合には

50

、能動免疫応答は、がん性細胞の死を引き起こす（例えば、がん細胞に対する抗体結合がアポトーシス性細胞死を誘導する）ことができ、または、がん性細胞の成長を抑制する（例えば、細胞周期の進行を遮断する）ことができる。他の場合には、5T4 VHH-Fcなどの本明細書で提供される5T4結合ポリペプチドは、がん性細胞に結合することができ、抗体依存性細胞性細胞傷害活性（ADCC）が、5T4結合ポリペプチドが結合するがん性細胞を排除することができる。場合によっては、提供される5T4 VHH結合ポリペプチドはまた、細胞性免疫応答および液性免疫応答を両方とも活性化して、より多くのナチュラルキラー細胞、またはがん性細胞を破壊する個体の免疫系をさらに活性化するサイトカイン（例えば、IL-2、IFN- γ 、IL-12、TNF- α 、TNF- β など）の産生増加を動員することができる。さらに別の態様において、5T4 VHH-Fcなどの5T4結合ポリペプチドは、がん性細胞に結合することができ、マクロファージまたは他の食作用細胞が、例えばCDCまたはADCPプロセスを介して、がん性細胞をオプソニン化することができる。

10

【0117】

他の局面において、また、多重特異性結合を示すVHH結合ポリペプチドも、本明細書において提供される。場合によっては、結合ポリペプチドには、5T4と、CD3などのT細胞抗原に対して二重親和性を示すポリペプチドが含まれる。いくつかの局面において、そのような二重親和性分子は、腫瘍に発現した5T4の結合時に、腫瘍の部位でT細胞をエンゲージするかまたは活性化することができる。特に、本明細書で提供されるそのような分子の中には、制約付きCD3結合を示す分子がある。また、5T4結合ポリペプチドを含有するキメラ抗原受容体を発現する、操作されたT細胞などの操作された細胞も、本明細書において提供される。

20

【0118】

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、あたかも各々個々の刊行物が個別に参照により組み入れられるのと同じ程度まで、すべての目的でその全体が参照により組み入れられる。本明細書において示される定義が、参照により本明細書に組み入れられる特許、出願、公開出願、および他の刊行物において示される定義と相反するか、または別の形で一貫しない場合は、本明細書において示される定義が、参照により本明細書に組み入れられる定義よりも優先される。

【0119】

本明細書において記載されるかまたは参照される技法および手順は、概してよく理解されており、例えば、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)); *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.)のシリーズ: *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*, および *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*

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に記載される広く利用される方法論などの、従来の方法論を用いて、当業者により一般的に使用される。

【0120】

本明細書において用いられるセクションの見出しは、組織化の目的だけのものであり、記載されている主題を限定すると解釈されるべきではない。 10

【0121】

I. 定義

別途定義されない限り、本開示に関連して用いられる科学用語および技術用語は、当業者により一般的に理解されている意味を有するものとする。さらに、別途文脈により必要とされるか、または明白に示されない限り、単数形の用語は複数を含むものとし、複数形の用語は単数を含むものとする。様々な供給源または参照の間での定義におけるいずれかの矛盾については、本明細書で提供される定義が支配することになる。

【0122】

本明細書に記載される本発明の態様は、態様「からなる」および/または態様「から本質的になる」を含むことが理解される。本明細書において用いられる場合、単数形の「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その」は、別途示されない限り、複数の言及を含む。本明細書における「または」という用語の使用は、代替物が相互排他的であることを暗示するようには意図されない。 20

【0123】

本出願において、明白に述べられるかまたは当業者により理解されない限り、「または」の使用は、「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、1つよりも多い前記の独立請求項または従属請求項に再び言及する。

【0124】

本明細書において用いられる「約」という用語は、この技術分野における当業者には容易にわかる、それぞれの値についての通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」のついた値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体に向けられる態様を含む(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。 30

【0125】

「核酸分子」、「核酸」、および「ポリヌクレオチド」という用語は、互換的に用いられてもよく、ヌクレオチドのポリマーを指す。そのようなヌクレオチドのポリマーは、天然のおよび/または非天然のヌクレオチドを含有してもよく、DNA、RNA、およびPNAを含むが、それらに限定されない。「核酸配列」とは、核酸分子またはポリヌクレオチドに含まれるヌクレオチドの直鎖状配列を指す。

【0126】

本明細書において用いられる「単離されたポリヌクレオチド」という用語は、その起源の理由で(1)天然で見出されるポリヌクレオチドのすべてもしくは一部分と会合していない、(2)天然では連結されていないポリヌクレオチドに機能的に連結されている、または(3)より大きな配列の一部として天然に存在しない、ゲノム、cDNA、もしくは合成起源、またはそのいくつかの組み合わせのポリヌクレオチドを意味するものとする。 40

【0127】

「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ように互換的に用いられ、最小の長さには限定されない。そのようなアミノ酸残基のポリマーは、天然の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、および多量体を含むが、それらに限定されない。完全長 50

タンパク質およびその断片は両方とも、定義により包含される。この用語はまた、ポリペプチドの発現後改変、例えば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、リン酸化なども含む。さらに、本開示の目的で、「ポリペプチド」とは、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然の配列に対して、欠失、付加、および置換（概して、天然で保存的）などの改変を含むタンパク質を指す。これらの改変は、部位特異的変異誘発を通すように計画的であってもよく、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通すように偶発的であってもよい。

【0128】

本明細書において言及される「単離されたタンパク質」という用語は、対象タンパク質が、（１）天然では典型的にそれと共に見出される少なくともいくつかの他のタンパク質を
10
含まない、（２）同じ供給源由来、例えば、同じ種由来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）天然ではそれと会合しているポリヌクレオチド、脂質、糖質、または他の物質の少なくとも約５０％から分離されている、（５）「単離されたタンパク質」が天然ではそれと会合しているタンパク質の一部
20
分と（共有結合性または非共有結合性の相互作用によって）会合していない、（６）天然ではそれと会合していないポリペプチドと（共有結合性または非共有結合性の相互作用によって）機能的に会合している、または（７）天然に存在しない、ことを意味する。そのような単離されたタンパク質は、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、もしくは他のRNAによ
20
ってコードされることができ、合成起源であってもよく、またはその任意の組み合わせであ
20
ってもよい。ある特定の態様において、単離されたタンパク質は、実質的に純粋である
20
か、または、その用途（治療、診断、予防、研究、もしくはその他）を干渉するであろう、その天然環境で見出されるタンパク質、もしくはポリペプチド、もしくは他の汚染物質
20
を実質的に含まない。

【0129】

本明細書において用いられる場合、「実質的に純粋」とは、対象となる種が、存在する主
30
な種である（すなわち、モルベースで、それが組成物における任意の他の個々の種よりも
30
豊富である）ことを意味し、実質的に精製された画分は、対象となる種が、存在するす
30
べての巨大分子種の（モルベースで）少なくとも約５０パーセントを構成する組成物である
30
。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巨大分子種の約８０％
30
よりも多く、例えば、いくつかの態様においては、約８５％、９０％、９５％、および９９％
30
よりも多きを構成する。いくつかの態様において、対象となる種は、組成物が単一の巨大
30
分子種から本質的になる、本質的な均質性（従来の検出方法によって組成物中に汚染物質
30
種を検出することができない）まで精製される。

【0130】

本明細書において用いられる「機能的に連結される」という用語は、そのように記載され
40
る構成要素の位置が、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であるこ
40
とを指す。コード配列に「機能的に連結される」制御配列は、制御配列と適合性である条
40
件下でコード配列の発現が達成されるようにライゲーションされる。

【0131】

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、当技術分野においてよく理
40
解されている用語であり、そのような特異的結合を判定する方法もまた、当技術分野にお
40
いてよく知られている。分子は、代替的な細胞または物質と、よりも、特定の細胞または
40
物質と、より頻繁に、より迅速に、より長い持続期間で、かつ/またはより高い親和性で
40
反応するかまたは会合する場合に、「特異的結合」または「優先的結合」を示すと言われ
40
る。シングルドメイン抗体（sdAb）またはVHH含有ポリペプチドは、他の物質に結合す
40
るよりも高い親和性、結合力で、より容易に、かつ/またはより長い持続期間で結合する
40
場合に、標的に対して「特異的に結合する」か、または「優先的に結合する」。例えば、
40
5T4エピトープに特異的にまたは優先的に結合するsdAbまたはVHH含有ポリペプチドは
40
、他の5T4エピトープまたは非5T4エピトープに結合するよりも高い親和性、結合力で
40
、より容易に、かつ/またはより長い持続期間でこのエピトープに結合するsdAbまたはV
40
50

HH含有ポリペプチドである。例えば、第1の標的に特異的にまたは優先的に結合するsdAbまたはVHH含有ポリペプチドは、第2の標的に特異的にまたは優先的に結合してもよく、または結合しなくてもよいこともまた、この定義を読むことによって理解される。そのため、「特異的結合」または「優先的結合」は、排他的結合を（含むことはできるが）必ずしも必要としない。必ずではないが、概して、結合への言及は、優先的結合を意味する。「特異性」とは、抗原に選択的に結合する、結合タンパク質の能力を指す。

【0132】

本明細書において用いられる場合、「エピトープ」という用語は、抗原結合分子（例えば、sdAbまたはVHH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、糖質、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を有する表面配置を含み、特異的な三次元構造特性および特異的な電荷特性を有する。エピトープは、標的分子の隣接残基および/または並んだ非隣接残基（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。隣接残基（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は、典型的には、変性溶媒への曝露時に保持されるのに対して、三次フォールディングによって形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒での処理時に失われる。エピトープは、少なくとも3、少なくとも5、または8~10残基（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド）を含み得るが、それらに限定されない。いくつかの態様において、エピトープは、長さが20残基（例えば、アミノ酸またはヌクレオチド）未満、15残基未満、または12残基未満である。2つの抗体は、抗原に対して競合的結合を示す場合には、抗原内の同じエピトープに結合する可能性がある。いくつかの態様において、エピトープは、抗原結合分子上のCDR残基に対するある特定の最小距離によって特定することができる。いくつかの態様において、エピトープは、上記の距離によって特定することができ、さらに、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）に関与するそれらの残基に限定され得る。エピトープは、同様に様々なスキャンによって特定することができ、例えば、アラニンスキャンまたはアルギニンスキャンは、抗原結合分子が相互作用し得る1つまたは複数の残基を示すことができる。はっきりと表されない限り、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に対するエピトープの一部であることから排除しない。むしろ、そ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、いくつかの態様において、エピトープとして特定された残基のセットは、抗原上のエピトープについての残基の排他的リストよりはむしろ、抗原に関連している最小エピトープを示す。

【0133】

「非直鎖状エピトープ」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タンパク質内の非隣接のポリペプチド、アミノ酸、および/または糖を含む。いくつかの態様において、残基のうちの少なくとも1つは、エピトープの他の言及される残基と非隣接であろう；しかし、残基のうちの1つまたは複数または、他の残基と隣接していることもできる。

【0134】

「直鎖状」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タンパク質内の隣接のポリペプチド、アミノ酸、および/または糖を含む。いくつかの態様において、直鎖状エピトープ内の残基のすべてが、抗原結合分子に直接結合する（または結合に関与する）必要があるというわけではないことが注目される。いくつかの態様において、直鎖状エピトープは、効果的に直鎖状エピトープの配列からなるペプチドでの免疫由来、または、その配列区分をちょうど有する、（抗原結合分子が少なくとも主として相互作用することができるように）タンパク質の残り部分から相対的に単離されているタンパク質の構造的区分由来であることができる。

【0135】

「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用いられ、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）、シン

10

20

30

40

50

グルドメイン抗体 (sdAb、典型的には重鎖に類似している、1つの鎖のみを含む)、VH含有ポリペプチド (少なくとも1つの重鎖のみ抗体可変ドメイン、すなわちVHHを含むポリペプチド)、および、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、前述のいずれかの断片を含むがそれらに限定されない、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する。いくつかの態様において、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には、重鎖定常ドメイン (CH1、ヒンジ、CH2、およびCH3を含む、CH1は、典型的には、軽鎖定常ドメインであるCLとペア形成し、他方、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を含む、ヒンジは二量体化を媒介する) が含まれるが、それらに限定されない。

【0136】

10

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

【0137】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に關与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の可変領域 (それぞれV_HおよびV_L) は概して、類似した構造を有し、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. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照されたい。) 単一のV_HまたはV_Lドメインが、例えば、VHHなどのシングルドメイン抗体に抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体を、抗原に結合する抗体由来のV_HまたはV_Lドメインを用いて、それぞれ相補的なV_LまたはV_Hドメインのライブラリをスクリーニングして、単離してもよい。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) を参照されたい。

20

【0138】

「抗体断片」または「抗原結合断片」とは、抗原に結合する少なくとも可変領域を含有する従来のまたは無傷の抗体の一部を含む、従来のまたは無傷の抗体以外の分子を指す。抗体断片の例には、Fv、一本鎖Fv (sdFv)、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂; ダイアボディ; 直鎖状抗体; V_H領域のみを含むシングルドメイン抗体 (VHH) が含まれるが、それらに限定されない。

30

【0139】

本明細書において用いられる場合、結合分子に関する「一価」とは、標的抗原に特異的である単一の抗原認識部位を有する結合分子を指す。一価結合分子の例には、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分子が含まれる。一価抗体断片の例には、Fab断片、Fv断片、および一本鎖Fv断片 (scFv) が含まれるが、それらに限定されない。

【0140】

「シングルドメイン抗体」、「sdAb」、「VHH」という用語は、単一の単量体ドメインである抗原結合/認識ドメインを有する抗体を指すように、本明細書において互換的に用いられる。そのような抗体には、ラクダ科抗体またはサメ抗体が含まれる。いくつかの態様において、VHHは、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4と命名される3つのCDRおよび4つのフレームワーク領域を含む。いくつかの態様において、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/もしくは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如するように、N末端またはC末端で切断されていてもよい。

40

【0141】

「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。いくつかの態様において、VHHポリペプチドは、2つ、3つ、または4つ、またはそれよりも多いVHHドメインを含み、各VHHドメインは、同じであってもよく

50

、または異なってもよい。いくつかの態様において、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態様において、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には、VHH₁-Fc、VHH₁-VHH₂-Fc、およびVHH₁-VHH₂-VHH₃-Fcが含まれ、VHH₁、VHH₂、およびVHH₃は、同じであってもよく、または異なってもよい。そのような構造のいくつかの態様において、1つのVHHは、リンカーによって別のVHHに接続されてもよく、または1つのVHHは、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態様において、リンカーは、1~20アミノ酸、好ましくは、主にグリシン、および任意でセリンから構成される1~20アミノ酸を含む。いくつかの態様において、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VHH₁-VHH₂-Fcは、それが二量体を形成する場合には、四価とみなされる（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VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fcは、それが二量体を形成する場合には、六価とみなされる（すなわち、二量体は6つのVHHドメインを有する）。

10

【0142】

本明細書において用いられる場合、5T4結合ポリペプチドとは、5T4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、本明細書における5T4結合ポリペプチドは、5T4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。5T4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。5T4結合ポリペプチドは、Fcドメインを含有する融合タンパク質を含む、融合タンパク質を含む。いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは、各々が5T4に特異的に結合する2つ、3つ、または4つ、またはそれよりも多いVHHドメインを含有し、各VHHドメインは、同じであってもよく、または異なってもよい。いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは多価である。いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは多重特異性である。場合によっては、5T4結合ポリペプチドは、5T4以外の1つまたは複数のさらなるまたは追加の抗原に結合する、1つまたは複数の追加のドメインを含有してもよい。

20

【0143】

「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質の抗体の集団の（sdAbまたはVHH含有ポリペプチドを含む）抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る可能な天然の変異以外は同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対する。さらに、典型的には様々な決定基（エピトープ）に対する様々な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対する。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し得る。修飾語の「モノクローナル」とは、実質的に均質の抗体の集団から得られているとしての抗体の特徴を示し、いずれかの特定の手法による抗体の生成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法によって作られてもよく、または、例えば米国特許第4,816,567号に記載されている組換えDNA法によって作られてもよい。モノクローナル抗体はまた、例えば、McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554に記載されている技法を用いて作製されるファージライブラリーから単離されてもよい。

30

40

【0144】

「CDR」という用語は、当業者に少なくとも1つの特定の様式によって定義されるような相補性決定領域を表す。所与のCDRまたはFRの正確なアミノ酸配列の境界は、数多くの周知のスキームのいずれかを用いて容易に決定することができ、それらのスキームには、以下に記載されるものが含まれる：Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD（「Kabat」ナンバリングスキーム）；Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948（「Chothia」ナンバリングスキーム）；MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen in

50

teractions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745. (「Contact」ナンバリングスキーム); 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」ナンバリングスキーム); 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」ナンバリングスキーム); および Martin et al., "Modeling an antibody hypervariable loops: a combined algorithm," PNAS, 1989, 86(23):9268-9272 (「AbM」ナンバリングスキーム)。

10

【0145】

所与のCDRまたはFRの境界は、特定に用いられるスキームに応じて変動し得る。例えば、Kabatスキームは構造アラインメントに基づいており、他方、Chothiaスキームは構造情報に基づいている。Kabatスキームおよび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の長さに基づいており、挿入文字、例えば「30a」によって調整される挿入、および欠失が、いくつかの抗体に現れる。2つのスキームは、ある特定の挿入および欠失(「インデル(indel)」)を異なる位置に配置し、異なったナンバリングを結果としてもたらす。Contactスキームは、複雑な結晶構造の解析に基づいており、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用いられるものに基づく、Kabat定義とChothia定義との間の妥協案である。

20

【0146】

いくつかの態様において、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することができる。VHHは、CDR1、CDR2、およびCDR3と命名される3つのCDRを含む。以下の表1は、それぞれ、Kabat、Chothia、AbM、およびContactスキームによって特定されるCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3の例示的な位置境界を列記する。CDR-H1については、KabatナンバリングスキームおよびChothiaナンバリングスキームの両方を用いて、残基ナンバリングが列記される。FRはCDR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、といった具合である。示されるKabatナンバリングスキームは、H35AおよびH35Bに挿入を配置するため、示されるKabatナンバリング規則を用いて番号付けされた場合のChothia CDR-H1ループの終わりは、ループの長さに応じてH32とH34との間で変動することが注目される。

30

【0147】

(表1) 様々なナンバリングスキームによるCDRの境界

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-H1 (Kabatナンバリング ¹)	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Chothiaナンバリング ²)	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--H101

40

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

【0148】

したがって、別途指定されない限り、所与の抗体またはその領域、例えばその可変領域の

50

「CDR」または「相補性決定領域」または個々の指定された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、ある（または具体的な）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ことが述べられている場合、そのようなCDR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、対応するCDR（例えば、CDR-H3）の配列をVHH内に有することが理解される。いくつかの態様において、具体的な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用いて記載される（例えば、表1を参照されたい）が、提供される抗体は、他の前述のナンバリングスキームまたは当業者に公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を含み得ることが理解される。

10

【0149】

本明細書において用いられる場合、「コンジュゲート」、「コンジュゲーション」、またはその文法的変形物は、当技術分野において公知の任意の接合法または連結法による、別の化合物の形成を結果としてもたらす2つ以上の化合物の互いの接合または連結を指す。これはまた、2つ以上の化合物の互いの接合または連結によって作製される化合物も指すことができる。例えば、1つまたは複数の化学的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は、融合タンパク質、化学的コンジュゲートによって生成されたもの、および任意の他の方法によって生成されたものを含む。

20

【0150】

VHH-Fcなどの免疫グロブリンFc融合物（Fc融合物）は、免疫グロブリンのFc領域に機能的に連結された1つまたは複数の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つまたは複数の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、当技術分野において公知であり、任意で、Fcを融合パートナーに連結してFc融合物を作製するために用いることができる。いくつかのそのような態様において、リンカーは、1~20アミノ酸、好ましくは、主にグリシン、および任意でセリンからなる1~20アミノ酸を含む。同一の種のFc融合物は、Fc融合物ホモ二量体を形成するか、または同一でない種を用いてFc融合物ヘテロ二量体を形成するように、二量体化され得る。いくつかの態様において、Fcは、ヒトFcなどの哺乳動物Fcである。

30

【0151】

本明細書において用いられる「重鎖定常領域」という用語は、少なくとも3つの重鎖定常ドメインの、CH1、ヒンジ、CH2、およびCH3を含む領域を指す。当然、ドメイン内の機能を変更しない欠失および変更が、別途命名されない限り、「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には、 γ 、 δ 、および ϵ が含まれる。非限定的な例示的な重鎖定常領域にはまた、 α 、 β 、および μ も含まれる。各重鎖定常領域は、抗体アイソタイプに対応する。例えば、 γ 定常領域を含む抗体はIgG抗体であり、 δ 定常領域を含む抗体はIgD抗体であり、 ϵ 定常領域を含む抗体はIgE抗体である。さらに、 μ 定常領域を含む抗体はIgM抗体であり、 α 定常領域を含む抗体はIgA抗体である。ある特定のアイソタイプは、さらにサブクラスに細分することができる。例えば、IgG抗体には、IgG1（ γ 1定常領域を含む）、IgG2（ γ 2定常領域を含む）、IgG3（ γ 3定常領域を含む）、およびIgG4（ γ 4定常領域を含む）抗体が含まれるがそれらに限定されず；IgA抗体には、IgA1（ α 1定常領域を含む）およびIgA2（ α 2定常領域を含む）抗体が含まれるがそれらに限定されず；IgM抗体には、IgM1およびIgM2が含まれるがそれらに限定されない。

40

【0152】

本明細書において用いられる「Fc領域」とは、CH2およびCH3を含む重鎖定常領域の一部を指す。いくつかの態様において、Fc領域は、ヒンジ、CH2、およびCH3を含む。様々な態様において、Fc領域がヒンジを含む場合、ヒンジは、2つのFc含有ポリペプチドの間の二量体化を媒介する。Fc領域は、本明細書において議論される任意の抗体重鎖

50

定常領域アイソタイプのものであってもよい。いくつかの態様において、Fc領域は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である。

【0153】

「機能的なFc領域」は、天然配列Fc領域の「エフェクター機能」を保有する。例示的な「エフェクター機能」には、Fc受容体結合；C1q結合および補体依存性細胞傷害活性（CDC）；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害活性（ADCC）；食作用；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細胞活性化などが含まれる。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、様々なアッセイを用いて評価することができる。

10

【0154】

「天然配列Fc領域」は、天然で見出される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領域には、天然配列ヒトIgG1 Fc領域（非AおよびAアロタイプ）；天然配列ヒトIgG2 Fc領域；天然配列ヒトIgG3 Fc領域；および天然配列ヒトIgG4 Fc領域、ならびに天然に存在するそれらのバリエーションが含まれる。

【0155】

「バリエーションFc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸改変によって天然配列Fc領域のものとは異なるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、「バリエーションFc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸改変によって天然配列Fc領域のものとは異なるアミノ酸配列を含み、それにもかかわらず天然配列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。いくつかの態様において、バリエーションFc領域は、天然配列Fc領域と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領域中または親ポリペプチドのFc領域中に約1～約10のアミノ酸置換、および好ましくは、約1～約5のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様において、本明細書におけるバリエーションFc領域は、天然配列Fc領域とおよび/または親ポリペプチドのFc領域に対して少なくとも約80%の配列同一性、それらに対して少なくとも約90%の配列同一性、それらに対して少なくとも約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%の配列同一性を保有するであろう。

20

【0156】

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における残基のナンバリングは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) におけるようなEUインデックスのものである。「KabatにおけるようなEUインデックス」とは、ヒトIgG1 EU抗体の残基ナンバリングを指す。

30

【0157】

「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。いくつかの態様において、Fc Rは天然ヒトFcRである。いくつかの態様において、FcRは、IgG抗体に結合するもの（ガンマ受容体）であり、Fc RI、Fc RII、およびFc RIIIサブクラスの受容体を、それらの受容体の対立遺伝子バリエーションおよびオルタナティブスプライシングされた形態を含めて、含む。Fc RII受容体には、Fc RIIA（「活性化受容体」）およびFc RIIB（「抑制性受容体」）が含まれ、それらは、主にそれらの細胞質ドメインにおいて異なる、類似したアミノ酸配列を有する。活性化受容体Fc RIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ITAM）を含有する。抑制性受容体Fc RIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン抑制モチーフ（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) において概説されている。他のFcRが、将来特定されるものを含めて、本明細書における「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、母体IgGの胎児への移

40

50

行 (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を担う、新生児受容体FcRnも含む。FcRnに対する結合を測定する方法は、公知である (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); WO 2004/92219 (Hinton et al.)を参照されたい)。

【0158】

本明細書において用いられる「アクセプターヒトフレームワーク」とは、本明細書において議論されるような、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に由来する重鎖可変ドメイン (VH) 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に由来するアクセプターヒトフレームワークは、それらと同じアミノ酸配列を含むことができ、またはアミノ酸配列変化を含有することができる。いくつかの態様において、アミノ酸変化の数は、VHHなどの単一の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。

【0159】

本明細書において用いられる場合、「キメラ抗原受容体」または「CAR」とは、それが操作されている細胞 (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、抗原結合ドメインを介して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とT細胞のT細胞活性 (例えば、溶解能力および自己複製) とを組み合わせる、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 (外部ドメイン)、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 に由来する、少なくとも1つのITAMシグナル伝達ドメイン、および任意で、例えばCD28または4-1BBに由来する、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。本明細書で提供されるCARにおいて、VHHドメインは、抗原結合ドメインを形成し、細胞において発現させた時には細胞外側に位置する。

【0160】

「親和性」とは、分子 (例えば、抗体またはVHH含有ポリペプチド) の単一の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総和の強さを指す。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、概して、それぞれ解離定数 (K_D) または K_D -見かけによって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当技術分野において公知の一般的な方法 (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装置など) によって測定することができる。そのような方法には、BIAcore (登録商標)、Octet (登録商標)、またはフローサイトメトリーを含む方法が含まれるが、それらに限定されない。

【0161】

本明細書において用いられる「 K_D 」という用語は、抗原結合分子/抗原の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において用いられる場合、これには、 K_D および K_D -見かけが含まれる。

【0162】

いくつかの態様において、抗原結合分子の K_D は、抗原発現細胞株を用いたフローサイトメトリー、および各抗体濃度で測定された平均蛍光の非線形一部位結合方程式へのフィッティング (Prism Software graphpad) によって測定される。いくつかのそのような態様において、 K_D は K_D -見かけである。

【0163】

「生物学的活性」という用語は、(インビボで見出されるように天然に存在しようと、または組換え手段によって提供されるかもしくは可能にされようと) 分子の任意の1つまたは複数の生物学的特性を指す。生物学的特性には、リガンドの結合、細胞増殖 (例えば、

10

20

30

40

50

T細胞増殖)の誘導または増加、およびサイトカインの発現の誘導または増加が含まれるが、それらに限定されない。

【0164】

「親和性成熟した」VHH含有ポリペプチドとは、そのような変更を保有しない親VHH含有ポリペプチドと比較して、1つまたは複数のCDR中に1つまたは複数の変更を有するVHH含有ポリペプチドを指し、そのような変更は、VHH含有ポリペプチドの抗原に対する親和性の改善を結果としてもたらす。

【0165】

本明細書において用いられる「ヒト化VHH」とは、1つまたは複数のフレームワーク領域が、ヒトフレームワーク領域で実質的に置き換えられているVHHを指す。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンのある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またはヒトフレームワーク配列のいずれにも見出されないが、VHHまたはVHH含有ポリペプチドの性能をさらに改良し、かつ最適化するために含まれる、残基を含むことができる。いくつかの態様において、ヒト化VHH含有ポリペプチドは、ヒトFc領域を含む。認識されるように、ヒト化配列は、その一次配列によって特定することができ、抗体が創出されたプロセスを必ずしも表さない。

10

【0166】

本明細書において用いられる「実質的に同様」または「実質的に同じ」という用語は、当業者が、2つ以上の値間の差がほとんどないとみなすか、または該値によって測定される生物学の特徴の文脈内でいかなる生物学のかつ/もしくは統計学的な有意性もないとみなすような、2つ以上の数値間の十分に高度の類似性を表す。いくつかの態様において、2つ以上の実質的に同様の値は、わずかに約5%、10%、15%、20%、25%、または50%のいずれかの分だけ異なっている。

20

【0167】

ポリペプチド「バリエーション」は、配列を整列させて、最大の配列同一性パーセントを達成するように、必要な場合にはギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の一部とみなさずに、天然配列ポリペプチドに対して少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する、生物学的活性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末端で、1つまたは複数のアミノ酸残基が付加されているかまたは欠失している、ポリペプチドが含まれる。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、バリエーションは、天然配列ポリペプチドに対して少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

30

【0168】

本明細書において用いられる場合、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「相溶性」は、配列を整列させて、最大の配列同一性パーセントを達成するように、必要な場合にはギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の一部とみなさずに、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パーセンテージとして定義される。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利用可能なコンピュータソフトウェアを用いて、当技術分野における技能内である様々な方法で達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含み、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。

40

【0169】

アミノ酸置換は、ポリペプチド中の1つのアミノ酸の別のアミノ酸での置き換えを含み得るが、それに限定されない。例示的な置換を、表2に示す。アミノ酸置換は、関心対象の

50

抗体中に導入されてもよく、産物は、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の改善についてスクリーニングされてもよい。

【 0 1 7 0 】

(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

10

20

【 0 1 7 1 】

アミノ酸は、一般的な側鎖特性に従ってグループ分けされてもよい。

(1) 疎水性 : ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile ;

(2) 中性親水性 : Cys、Ser、Thr、Asn、Gln ;

(3) 酸性 : Asp、Glu ;

(4) 塩基性 : His、Lys、Arg ;

(5) 鎖の配向に影響を及ぼす残基 : Gly、Pro ;

(6) 芳香族 : Trp、Tyr、Phe。

30

【 0 1 7 2 】

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必然的に伴う。

【 0 1 7 3 】

「ベクター」という用語は、宿主細胞において増やすことができる、クローニングされた1つまたは複数のポリヌクレオチド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用いられる。ベクターは、以下の要素のうちの1つまたは複数を含むことができる：複製起点、関心対象のポリペプチドの発現を制御する1つもしくは複数の制御配列（例えば、プロモーターおよび/もしくはエンハンサーなど）、ならびに/または1つもしくは複数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において用いることができる遺伝子、例えば、 β -ガラクトシダーゼなど）。「発現ベクター」という用語は、宿主細胞において関心対象のポリペプチドを発現させるために用いられるベクターを指す。

40

【 0 1 7 4 】

「宿主細胞」とは、ベクターまたは単離されたポリヌクレオチドのレシピエントであり得るか、またはレシピエントである細胞を指す。宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であってもよい。例示的な真核細胞には、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；および昆虫細胞が含まれる。非限定的な例示的な哺乳

50

動物細胞には、NSO細胞、PER.C6（登録商標）細胞（CruCell）、ならびに293およびCHO細胞、ならびに、293-6E、CHO-DG44、CHO-K1、CHO-S、およびCHO-DS細胞などのそれらの誘導体が含まれるが、それらに限定されない。宿主細胞には、単一宿主細胞の子孫が含まれ、子孫は、天然の、偶発的な、または計画的な変異のために、元の親細胞と必ずしも（形態がまたはゲノムDNA補完が）完全に同一でなくてもよい。宿主細胞には、本明細書で提供されるポリヌクレオチドをインビボでトランスフェクトした細胞が含まれる。

【0175】

本明細書において用いられる「単離された」という用語は、典型的にはそれと共に天然で見出されるかまたは産生される、構成要素の少なくともいくつかから分離されている、分子を指す。例えば、ポリペプチドは、その中で産生された細胞の構成要素の少なくともいくつかから分離されている時に、「単離された」と言われる。ポリペプチドが、発現後に細胞により分泌される場合には、ポリペプチドを含有する上清を、それを産生した細胞から物理的に分離することが、ポリペプチドを「単離すること」とみなされる。同様に、ポリヌクレオチドは、それが、典型的にはその中に天然で見出される、より大きなポリヌクレオチド（例えば、DNAポリヌクレオチドの場合には、ゲノムDNAまたはミトコンドリアDNAなど）の一部ではないか、または、例えば、RNAポリヌクレオチドの場合には、その中で産生された細胞の構成要素の少なくともいくつかから分離されている時に、「単離された」と言われる。したがって、宿主細胞の内部でベクターに含有されているDNAポリヌクレオチドは、「単離された」と言われ得る。

10

20

【0176】

「個体」および「対象」という用語は、動物；例えば哺乳動物を指すように、本明細書において互換的に用いられる。患者という用語は、ヒトおよび獣医学的对象を含む。いくつかの態様において、ヒト、げっ歯類、サル、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、哺乳類の実験動物、哺乳類の家畜、哺乳類のスポーツ動物、および哺乳類のペットを含むがそれらに限定されない、哺乳動物を処置する方法が提供される。対象は、雄または雌であることができ、乳幼児期、若年期、青年期、成体期、および老齢期の対象を含む、任意の適している年齢であることができる。いくつかの例において、「個体」または「対象」とは、疾患または障害のための処置の必要がある個体または対象を指す。いくつかの態様において、処置を受ける対象は、患者であることができ、これは、対象が、処置に関連する障害を有するか、または障害を患うのに十分なリスクがあるとして特定されているという事実を示す。特定の態様において、対象は、ヒト患者などのヒトである。

30

【0177】

本明細書において用いられる「疾患」または「障害」は、処置が必要とされ、かつ/または望まれる状態を指す。

【0178】

「腫瘍細胞」、「がん細胞」、「がん」、「腫瘍」、および/または「新生物」という用語は、別途命名されない限り、本明細書において互換的に用いられ、身体臓器およびシステムの正常な機能化を干渉する、制御されない成長および/または異常な細胞生存の増加および/またはアポトーシスの阻害を示す、1つの細胞（または複数の細胞）を指す。良性および悪性のがん、ポリープ、過形成、ならびに休眠腫瘍または微小転移が、この定義に含まれる。

40

【0179】

「がん」および「腫瘍」という用語は、固形がんおよび血液学的/リンパ性がんを包含し、悪性、前悪性、および良性の成長、例えば形成異常もまた包含する。また、免疫系によって妨害されない異常な増殖（例えば、免疫回避および免疫逃避機構）を有する細胞（例えば、ウイルス感染細胞）も、この定義に含まれる。例示的ながんには、以下が含まれるが、それらに限定されない：基底細胞癌、胆道がん；膀胱がん；骨がん；脳および中枢神経系のがん；乳がん；腹膜のがん；子宮頸がん；絨毛癌；結腸直腸がん；結合組織がん；消化器系のがん；子宮内膜がん；食道がん；目のがん；頭頸部のがん；胃（gastric）が

50

ん（胃腸がんを含む）；神経膠芽腫；肝癌；肝細胞癌；上皮内新生物；腎臓がんまたは腎がん；喉頭がん；白血病；肝臓がん；肺がん（例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌）；黒色腫；骨髄腫；神経芽腫；口腔がん（口唇、舌、口、および咽頭）；卵巣がん；膵臓がん；前立腺がん；網膜芽腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系のがん；唾液腺癌；肉腫；皮膚がん；扁平上皮細胞がん；胃（stomach）がん；精巣がん；甲状腺がん；子宮がんまたは子宮内膜がん；泌尿器系のがん；外陰部がん；ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、ならびに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（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（small non-cleaved cell）NHL；巨大腫瘍病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；およびWaldenstromマクログロブリン血症；慢性リンパ球性白血病（CLL）；急性リンパ球性白血病（ALL）；毛様細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；ならびに他の癌腫および肉腫；および移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、ならびに、母斑症、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、およびMeigs症候群に関連する異常な血管増殖。

10

【0180】

本明細書において用いられる「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には、以下が含まれるが、そ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、腎臓間質細胞、線維芽細胞様滑膜細胞、骨芽細胞、および乳房、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、骨に位置する細胞、および骨由来間葉系幹細胞。本明細書において用いられる「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。

20

【0181】

本明細書において用いられる「腫瘍微小環境内の細胞または組織」という用語は、腫瘍細胞を取り囲み、かつ/または腫瘍細胞に給餌する、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には、以下が含まれるが、それらに限定されない：腫瘍血管系；腫瘍浸潤リンパ球；線維芽細胞網細胞；血管内皮前駆細胞（EPC）；がん関連線維芽細胞；周皮細胞；他の間質細胞；細胞外マトリックス（ECM）の構成要素；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；骨髄由来サプレッサー細胞（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/組織を特定するための方法は、本明細書において以下に記載されるように、当技術分野において周知である。

30

【0182】

いくつかの態様において、「増加」または「減少」とは、それぞれ、統計学的に有意な増加または減少を指す。当業者に明らかであるように、「調節すること」とはまた、同じであるが試験物質の存在がない条件と比較して、標的または抗原の、そのリガンド、結合パートナー、ホモ多量体型もしくはヘテロ多量体型への会合のためのパートナー、または基質のうちの1つまたは複数に対する親和性、結合力、特異性、および/または選択性における変化（増加または減少のいずれかであることができる）をもたらすこと；標的または抗原が存在する培地または周囲における1つまたは複数の条件（例えば、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における変化（増加または減少のいずれかであることができる）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も含むことができる。これは、関与する標的に応じて、任意の適している様式で、および/または本質的に公知であるかもしくは本明細書に記載される任意の適しているアッセイを用いて、判定することができる。

40

【0183】

本明細書において用いられる場合、「免疫応答」とは、疾患（例えば、がんまたはがん転

50

移)を抑制するか、または発症を防止するか、またはその症状を回復させるのに十分である細胞性免疫応答および/または液性免疫応答を包含するように意図される。「免疫応答」は、自然免疫系および適応免疫系の両方の局面を包含し得る。

【0184】

本明細書において用いられる場合、疾患、障害、または状態の「処置すること」、「処置」、「治療」という用語は、有益なまたは望ましい臨床結果を得るためのアプローチである。本明細書において用いられる「処置」は、ヒトを含む哺乳動物における疾患に対する治療薬の任意の投与または適用に及ぶ。本開示の目的で、有益なまたは望ましい臨床結果には、以下のうちの任意の1つまたは複数が含まれるが、それらに限定されない：1つまたは複数の症状の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の広がり（例えば、転移、例えば、肺へのまたはリンパ節への転移）の防止または遅延、疾患の再発の防止または遅延、疾患進行の遅延または減速、疾患状態の回復、疾患または疾患の進行の抑制、疾患またはその進行の抑制または減速、その発生の停止、および寛解（部分的または完全のいずれか）。「処置」によって、増殖性疾患の病理学的結果の低減も包含される。本明細書で提供される方法は、処置のこれらの局面のうちの任意の1つまたは複数を企図する。上記と合致して、処置という用語は、障害のすべての局面の100パーセントの除去を必要としない。

10

【0185】

がんの文脈で本明細書において用いられる場合、がんの「処置」、または「抑制する」、「抑制すること」、もしくは「抑制」という用語は、以下のうちの少なくとも1つを指す：Response Evaluation Criteria for Solid Tumors (RECIST) などであるがそれらに限定されない標準的な基準によって測定されるような、腫瘍成長の速度の統計学的に有意な減少、腫瘍成長の休止、または腫瘍のサイズ、質量、代謝活性、もしくは体積の低減、または、無増悪生存期間 (PFS) もしくは全生存期間 (OS) の統計学的に有意な増加。

20

【0186】

「回復させること」とは、治療剤を投与しないのと比較した、1つまたは複数の症状の低下または改善を意味する。「回復させること」はまた、症状の持続期間の短縮または低減も含む。

【0187】

疾患または障害の「防止すること」、「予防」、または「防止」とは、疾患もしくは障害または疾患もしくは障害の症状のいくつかもしくはすべての出現または発症を防止するため、または疾患もしくは障害の発症の可能性を低下させるための、単独または別の化合物との組み合わせのいずれかでの、薬学的組成物の投与を指す。

30

【0188】

「抑制」または「抑制する」という用語は、任意の表現型特性の減少もしくは休止、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休止を指す。「低減させる」または「抑制する」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、低減させる、または停止することである。いくつかの態様において、「低減させる」または「抑制する」は、10%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。いくつかの態様において、「低減させる」または「抑制する」は、50%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。いくつかの態様において、「低減させる」または「抑制する」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。いくつかの態様において、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べて、抑制されているかまたは減少している。

40

【0189】

本明細書において用いられる場合、「疾患の発生を遅延させること」とは、疾患（例えば、がん）の発生を先送りすること、妨げること、減速させること、遅らせること、安定させること、抑えること、および/または延期させることを意味する。この遅延は、疾患歴および/または処置されている個体に応じて、様々な長さの時間であることができる。当業者に明白であるように、十分なまたは有意な遅延は、事実上、個体が疾患を発症しない

50

という点で、防止を包含し得る。例えば、後期段階のがん、例えば転移の発生は、遅延する可能性がある。

【0190】

本明細書において用いられる「防止すること」は、疾患に対する素因を有するかもしれないが、未だ疾患と診断されていない対象における疾患の出現または再発に関して、予防を提供することを含む。別途指定されない限り、「低減させる」、「抑制する」、または「防止する」という用語は、すべての時間にわたる完全な防止を表すかまたは必要とすることはなく、測定されている期間にわたるだけである。

【0191】

「抗がん剤」という用語は、1つまたは複数のがんの処置において用いられる剤を指すように、最も広い意味で本明細書において用いられる。そのような剤の例示的な種類には、化学療法剤、抗がん生物製剤（例えば、サイトカイン、受容体細胞外ドメイン-Fc融合物、および抗体）、放射線療法、CAR-T療法、治療用オリゴヌクレオチド（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびsiRNA）、ならびに腫瘍溶解性ウイルスが含まれるが、それらに限定されない。

10

【0192】

「生物学的試料」という用語は、生き物または以前は生き物だったもの由来の、多数の物質を意味する。そのような物質には、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、臓器、組織、骨髄、リンパ節、および脾臓が含まれるが、それらに限定されない。

20

【0193】

「対照」または「参照」という用語は、分析物を含有しないことが既知の組成物（「陰性対照」）または分析物を含有することが既知の組成物（「陽性対照」）を指す。陽性対照は、既知濃度の分析物を含むことができる。

【0194】

「有効量」または「治療的有效量」という用語は、単独で（すなわち、単剤療法として）または追加の治療剤との組み合わせのいずれかで患者中に投与された時に、例えば、疾患の症状および/または原因を回復させることまたは排除することにより、疾患進行における統計学的に有意の減少を生じる、活性成分（例えば、sdAbまたはVHH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つの症状もしくは生物学的応答もしくは効果を和らげる、低下させる、もしくは緩和する、疾患もしくは障害の進行を阻止する、または患者の身体機能を改善する量であり得る。活性剤を含有する組成物の治療的有效量は、個体の疾患状態、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惹起する活性剤の能力などの要因に従って変動し得る。治療的有效量はまた、活性剤の任意の毒性効果または有害効果よりも、治療的に有益な効果が勝るものである。治療的有效量は、1つまたは複数の投与において送達され得る。治療的有效量とは、必要な投薬量でかつ期間にわたって、所望の治療結果および/または予防結果を達成するのに有効な量を指す。

30

【0195】

本明細書において用いられる場合、組成物とは、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。これは、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。

40

【0196】

「薬学的製剤」および「薬学的組成物」という用語は、活性成分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にあり、かつ製剤が投与される対象に対して許容できないように毒性であるいかなる追加の構成要素も含有しない、調製物を指す。したがって、これは、哺乳動物対象、多くの場合ヒトにおける薬学的用途に適している組成物である。薬学的組成物は、典型的には、有効量の活性剤（例えば、sdAbまたはVHH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

50

製剤は、無菌であり得る。

【0197】

「薬学的に許容される担体」とは、対象への投与用の「薬学的組成物」と一緒に構成する治療剤との使用のための、当技術分野における従来の、非毒性の固体、半固体、もしくは液体の充填剤、希釈剤、カプセル化材料、製剤化補助剤、または担体を指す。薬学的に許容される担体は、使用される投薬量および濃度でレシピエントに対して非毒性であり、製剤の他の成分と適合性である。薬学的に許容される担体は、使用される製剤に適切である。

【0198】

1つまたは複数のさらなる治療剤「と組み合わせて」の投与には、同時（同時発生的）投与および任意の順序での連続投与が含まれる。 10

【0199】

「同時に」という用語は、投与の少なくとも一部が、時間が重複しているか、または1つの治療剤の投与が、他の治療剤の投与に対して短い期間内であるか、または両方の剤の治療効果が、少なくともある期間重複する、2つ以上の治療剤の投与を指すように、本明細書において用いられる。

【0200】

「連続的に」という用語は、時間が重複しないか、または剤の治療効果が重複しない、2つ以上の治療剤の投与を指すように、本明細書において用いられる。

【0201】

本明細書において用いられる場合、「と併せて」とは、1つの処置様式の、別の処置様式に加えた投与を指す。そのように、「と併せて」とは、個体に対する1つの処置様式の、もう1つの処置様式の投与の前、その最中、またはその後の投与を指す。 20

【0202】

「添付文書」という用語は、治療用製品の商用パッケージに通例含まれ、そのような治療用製品の使用に関わる適応症、用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌、および/または警告についての情報を含む、説明書を指すように用いられる。

【0203】

「製造物品」とは、少なくとも1つの試薬、例えば、疾患もしくは障害（例えば、がん）の処置用の薬、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、任意の製造品（例えば、パッケージもしくは容器）またはキットである。いくつかの態様において、製造品またはキットは、本明細書に記載される方法を行うためのユニットとして、推進されるか、流通されるか、または販売される。 30

【0204】

「標識」および「検出可能な標識」という用語は、例えば、特異的結合ペアのメンバー間の反応（例えば、結合）を検出可能にするために、抗体または抗原に付加される部分を意味する。特異的結合ペアの標識されたメンバーは、「検出可能なように標識された」と言われる。したがって、「標識された結合タンパク質」という用語は、結合タンパク質の特定を提供する、組み込まれた標識を有するタンパク質を指す。いくつかの態様において、標識は、視覚または機器を用いる手段、例えば、放射標識アミノ酸の組込み、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ーまたは酵素活性を含むストレプトアビジン）によって検出され得るビオチン部分のポリペプチドへの付加によって検出可能である、シグナルを生成することができる検出可能なマーカーである。ポリペプチドのための標識の例には、以下が含まれるが、そ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、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 、または ^{153}Sm ）；色素原、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド燐光体（lanthanide phosphor））、酵素標識（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）；化学発光マーカー；ビオチン基；二次レポーターによって認識されるあらかじめ決定されたポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体 40 50

に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ) ; および磁性物質、例えばガドリニウムキレート。イムノアッセイに一般的に使用される標識の代表的な例には、光を生成する部分、例えば、アクリジニウム化合物、および蛍光を生成する部分、例えば、フルオレセインが含まれる。この点について、部分自体は、検出可能なように標識されなくてもよいが、さらに別の部分との反応時に検出可能になり得る。

【0205】

II. 5T4に結合するVHHドメイン

5T4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5T4結合ポリペプチドが、本明細書において提供される。いくつかの態様において、VHHドメインは、ヒト5T4に結合する。提供される態様のいずれかのうちのいくつかにおいて、VHHドメインは、SEQ ID NO: 244に示される配列、またはシグナル配列を欠如しているその成熟型を有する5T4に結合する。

10

【0206】

いくつかの態様において、VHH含有ポリペプチドは、本明細書で提供されるVHHドメインの複数のコピーを組み込む。そのような態様において、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。いくつかの態様において、VHH含有ポリペプチドは、異なるが、5T4上の同じエピトープを認識する、VHHドメインの複数のコピーを組み込んでよい。

【0207】

いくつかの態様では、5T4 VHHはマウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 245に示されるアミノ酸配列を含む5T4 VHH、またはそのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 255に示されるアミノ酸配列を含む5T4 VHH、またはそのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 276に示されるアミノ酸配列を含む5T4 VHH、またはそのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 382に示されるアミノ酸残基に対応する5T4細胞外ドメインのアミノ酸残基60~112間に位置するエピトープに結合する。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 360に示されるアミノ酸配列(12E9v9)を有する5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382に示されるアミノ酸残基に対応する5T4細胞外ドメインのアミノ酸残基60~112間に位置するエピトープに結合する。

20

30

【0208】

いくつかの態様では、5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382に示されるアミノ酸残基に対応する5T4細胞外ドメインのアミノ酸残基173~224間に位置するエピトープに結合する。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 272または287に示されるアミノ酸配列(16G10v11または14B5v17)を有する5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382に示されるアミノ酸残基に対応する5T4細胞外ドメインのアミノ酸残基60~112間に位置するエピトープに結合する。

【0209】

VHH含有ポリペプチドは、下記のセクションIIIに記載されるいずれかを含む、多様な形式で形式化され得る。

40

【0210】

シングルドメイン抗体は、その相補性決定領域が、シングルドメインポリペプチドの一部である抗体である。例には、重鎖抗体、天然で軽鎖が欠けている抗体、従来の4鎖抗体に由来するシングルドメイン抗体、操作された抗体、および抗体に由来するもの以外のシングルドメインスキュフォールドが含まれるが、それらに限定されない。シングルドメイン抗体は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、アルパカ、ビクーニャ、グアナコ、サメ、ヤギ、ウサギ、および/またはウシを含むがそれらに限定されない、任意の種に由来し得る。いくつかの態様において、本明細書で用いられるシングルドメイン抗体は、軽鎖が欠けている重鎖抗体として公知の、天然に存在するシングルドメイン抗体である。明瞭さの理由で

50

、天然で軽鎖が欠けている重鎖抗体に由来するこの可変ドメインは、4鎖免疫グロブリンの従来のVHから区別するために、本明細書においてVHHとして示される。そのようなVHH分子は、ラクダ科の種において、例えば、ラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ、ビクーニャ、およびグアナコにおいて生じた抗体に由来し得る。ラクダ科のほかにも他の種が、天然で軽鎖が欠けている重鎖抗体を産生する可能性があり；そのようなVHHは、本開示の範囲内である。

【0211】

VHHドメインは、特異的抗原に選択的に結合することができる単一の単量体可変抗体ドメインである、抗体断片である。VHHドメイン（シングルドメイン抗体とも呼ばれる）は、わずか12～15 kDaの分子量を有し、2つのタンパク質重鎖および2つの軽鎖から構成される一般的な抗体（150～160 kDa）よりもずっと小さく、Fab断片（約50 kDa、1つの軽鎖および半分の重鎖）ならびに一本鎖可変断片（約25 kDa、2つの可変ドメイン、軽鎖由来の1つおよび重鎖由来の1つ）よりもさらに小さい。

10

【0212】

5T4に対して所望の特異性を保有する、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のための方法には、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、および当技術分野内で公知の他の免疫学的に媒介される技法が含まれるが、それらに限定されない。

【0213】

本明細書で提供される、提供されるVHHドメインの中には、5T4 VHH（ラマ由来）およびヒト化配列、例えば下記のいずれかがある。

20

【0214】

いくつかの態様において、5T4に結合するVHHドメインは、ヒト化されていてもよい。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結果としてもたらし得る非ヒト抗体に対するヒト免疫応答を、ヒト化抗体が低減させるかまたは排除するため、ヒト化抗体（例えば、VHH含有ポリペプチド）は、治療用分子として有用である。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する、1つまたは複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は任意でまた、ヒト定常領域の少なくとも一部分も含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体におけるいくつかのFR残基は、例えば、抗体の特異性または親和性を修復するか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）由来の対応する残基で置換される。

30

【0215】

ヒト化抗体およびそれらを作る方法は、例えば、Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13: 1619-1633において概説され、例えば、Riechmann et al., (1988) *Nature* 332:323-329; Queen et al., (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. US A* 86: 10029-10033; 米国特許第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号、および第7,087,409号; Kashmiri et al., (2005) *Methods* 36:25-34; Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498（「リサーフェシング（resurfacing）」を記載する）; Dall'Acqua et al., (2005) *Methods* 36:43-60（「FRシャッフリング」を記載する）; ならびにOsbourn 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「ガイド付き選択」アプローチを記載する）にさらに記載されている。

40

【0216】

ヒト化に用いることができるヒトフレームワーク領域には、以下が含まれるが、それらに限定されない：「ベストフィット」法（例えば、Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296を参照されたい）を用いて選択されるフレームワーク領域；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を参照されたい）；ヒト成熟（体細胞変異し

50

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を参照されたい); 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: 10678-10684およびRosok et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271 :22611-22618を参照されたい)。典型的には、VHHのFR領域は、ヒト化VHHを作るために、ヒトFR領域で置き換えられる。いくつかの態様において、ヒトFRのある特定のFR残基は、ヒト化VHHの1つまたは複数の特性を改善するために置き換えられる。そのような置き換えられた残基を有するVHHドメインは、本明細書において依然として「ヒト化」と言われる。

【0217】

本明細書では、5T4に結合するVHHドメインが提供され、該VHHドメインは、SEQ ID NO: 245~287、294、295、302、もしくは360のいずれかから選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 245~287、294、295、302、もしくは360のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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に含有される、CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 288~292、86~87、296、297のいずれか1つに示されるCDR1、SEQ ID NO: 88~99、298、299のいずれか1つに示されるCDR2、およびSEQ ID NO: 100~102、300、301、303のいずれか1つに示されるCDR3を含有する。提供される5T4 VHHドメインのなかには、SEQ ID NO: 245~287、294、295、302、もしくは360のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 245~287、294、295、302、もしくは360のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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ものがある。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 245~287、294、295、302、または360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0218】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 245に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO: 245に示される選択されたVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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に含有される、CDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 245に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 245に示される選択されたアミノ酸に対して少なくとも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。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 245に示されるアミノ酸配列のヒト化パリアントである。

【0219】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 288または289に示されるCDR1、SEQ ID NO: 88に示されるCDR2、およびSEQ ID NO: 100に示されるCDR3を含有する。

【0220】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 288、88、および100に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 289、88、および100に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

【0221】

いくつかの局面では、5T4に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO: 246~254のいずれかから選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 246~254のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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に含有

される、CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

【0222】

いくつかの局面では、5T4に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO: 246~254、および360のいずれかから選択されるVHHアミノ酸配列、またはアミノ酸SEQ ID NO: 246~254、および360のいずれか1つから選択されるV_HH領域に対して少なくとも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に含有される、CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

【0223】

いくつかの場合では、提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 246~254、および360のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 246~254のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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。いくつかの態様では、5T4ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO: 246~254のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。 10

【0224】

いくつかの場合では、提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 246~254、および360のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 246~254、および360のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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。いくつかの態様では、5T4ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO: 246~254、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。 20

【0225】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 255に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO: 255に示される選択されたVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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に含有される、CDR1、CDR2、CDR3を含む。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 255に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 255に示される選択されたアミノ酸に対して少なくとも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。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 255に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。 30

【0226】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 86、290~292のいずれか1つに示されるCDR1、SEQ ID NO: 89~94のいずれか1つに示されるCDR2、およびSEQ ID NO: 101に示されるCDR3を含む。

【0227】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 290、89、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 290、90、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 290、92、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 290、94、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101に示されるC 40 50

DR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 292、94、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 86、94、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

【0228】

いくつかの局面では、5T4に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO: 256～275のいずれかから選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 256～275のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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に含有される、CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

10

【0229】

いくつかの場合では、提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 256～275のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 256～275のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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。いくつかの態様では、5T4ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO: 256～275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0230】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 276に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO: 276に示される選択されたVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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に含有される、CDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 276に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 276に示される選択されたアミノ酸に対して少なくとも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。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 276に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

20

【0231】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 86または87のいずれか1つに示されるCDR1、SEQ ID NO: 95～99に示されるCDR2、およびSEQ ID NO: 102に示されるCDR3を含有する。

30

【0232】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 87、95、102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 87、96、102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 87、97、102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 87、98、102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 87、99、102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 86、98、102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

40

【0233】

いくつかの局面では、5T4に結合するVHHドメインは、SEQ ID NO: 277～287のいずれかから選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 277～287のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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に含有される、CDR1、CDR2、およびCDR3を含む。

50

【0234】

いくつかの場合では、提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 277~287のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 277~287のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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。いくつかの態様では、5T4ヒト化VHHドメインは、SEQ ID NO: 277~287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を有する。

【0235】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 294に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO: 294に示される選択されたVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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に含有される、CDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 294に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 294に示される選択されたアミノ酸に対して少なくとも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。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 294に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

10

【0236】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 296に示されるCDR1、SEQ ID NO: 298に示されるCDR2、およびSEQ ID NO: 300に示されるCDR3を含有する。

20

【0237】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 296、298、300に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

【0238】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 295に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO: 295に示される選択されたVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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に含有される、CDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 295に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 295に示される選択されたアミノ酸に対して少なくとも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。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 295に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

30

【0239】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 297に示されるCDR1、SEQ ID NO: 299に示されるCDR2、およびSEQ ID NO: 301に示されるCDR3を含有する。

【0240】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 297、299、301に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

40

【0241】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 302に示されるVHHドメイン、またはSEQ ID NO: 302に示される選択されたVHH領域アミノ酸に対して少なくとも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に含有される、CDR1、CDR2、CDR3を含有する。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 302に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 302に示される選択されたアミノ酸に対して少なくとも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。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは

50

、SEQ ID NO: 302に示されるアミノ酸配列のヒト化バリエーションである。

【0242】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 288に示されるCDR1、SEQ ID NO: 88に示されるCDR2、およびSEQ ID NO: 303に示されるCDR3を含有する。

【0243】

いくつかの態様では、本明細書で提供される5T4 VHHドメインは、それぞれSEQ ID NO: 288、88、303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。

【0244】

III. 5T4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

10

本明細書では、1つまたは複数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、5T4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5T4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。いくつかの態様では、本開示の融合タンパク質またはコンジュゲートは、単一のポリペプチドで構成される。ほかの態様では、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で構成される。いくつかの態様では、本開示の5T4結合ポリペプチドに、5T4に特異的に結合する少なくとも1つのVHHドメインを組み込んでいる。いくつかの局面では、5T4結合ポリペプチドは多価である。いくつかの態様では、5T4結合ポリペプチドは、5T4に特異的に結合するVHHドメインのコピーを2つ以上、たとえば5T4に特異的に結合するVHHドメインのコピーを3つ以上、4つ以上、5つ以上、または6つ以上含む。特定の局面では、5T4結合ポリペプチドは多重特異性である。たとえば、いくつかの場合では、1つまたは複数の追加のドメインは、1つまたは複数のさらなる抗原またはタンパク質に結合する、1つまたは複数の追加の結合ドメインであり得る。

20

【0245】

いくつかの態様では、本開示の5T4結合ポリペプチドは、アミノ酸リンカーを介し機能的に連結されている2つ以上のポリペプチド配列を含む。いくつかの態様では、これらのリンカーは、主としてアミノ酸のグリシンおよびセリンで構成され、本明細書ではGSリンカーと呼ばれる。本開示の融合タンパク質のGSリンカーは、さまざまな長さであってよく、たとえば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20アミノ酸長であってもよい。いくつかの態様では、GSリンカーは、GGSGGS, すなわち, (GGG)₂ (SEQ ID NO: 1); GGSGGGSGGS, すなわち, (GGG)₃ (SEQ ID NO: 2); GGSGGGSGGGSGGS, すなわち, (GGG)₄ (SEQ ID NO: 3); および GGSGGGSGGGSGGGSGGS, すなわち, (GGG)₅ (SEQ ID NO: 4)

30

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、リンカーは、非限定例として

GG, GGG, GGGG (SEQ ID NO: 5), GGGGG (SEQ ID NO: 6), および

GGGGGG (SEQ ID NO: 7)

40

などの、グリシン残基を含む可動性リンカーである。いくつかの態様では、リンカーは (GGGGGS)_n であり、nは1~5であり (SEQ ID NO: 123); (GGGGGS)_n であり、nは1~4であり (SEQ ID NO: 124); GGGGS (SEQ ID NO: 125); GGGGGS

(SEQ ID NO: 126); GGGGGSGGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 127); GGGGGSGGGGGSGGGGGS (SEQ

ID NO: 128); GGSGGGGGSGGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 129); または PGGGG (SEQ ID NO: 327)

である。いくつかの態様では、5T4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。

【0246】

50

A. Fc融合物

本明細書で提供される5T4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5T4結合ポリペプチドが、本明細書において提供される。いくつかの態様において、本明細書で提供される5T4結合ポリペプチドは、5T4に結合する1つ、2つ、3つ、または4つのVHHドメインと、Fcドメインとを含む。

【0247】

いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域の融合タンパク質中への組み込みは、いくつかの局面において、二量体を共に形成する2つのポリペプチドから構成され得る。いくつかの態様において、Fcドメインは、5T4結合部位の数を二倍にする二量体が形成されるように、生理的条件下で、例えば、細胞から発現した時に、5T4結合ポリペプチドの二量体化を媒介する。例えば、5T4に結合する3つのVHHドメインとFc領域とを含む5T4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、5T4結合ポリペプチドがそのような条件下で六価の二量体として存在するように、二量体化を媒介し得る。いくつかの態様において、5T4 VHHドメインをIgG Fc領域に融合させ、これらの態様において、融合タンパク質は、分子当たり2つの5T4 VHHドメインを有する二価である。いくつかの態様において、2つの5T4結合ドメイン(2x)をIgG Fc領域に融合させ、これらの態様において、融合タンパク質は、分子当たり4つの5T4 VHHドメインを有する四価である。いくつかの態様において、3つの5T4 VHHドメイン(3x)をIgG Fc領域に融合させ、これらの態様において、融合タンパク質は、分子当たり6つの5T4 VHHドメインを有する六価である。

10

20

【0248】

いくつかの態様において、多価5T4結合ポリペプチドは二価である。いくつかの態様において、本開示の二価5T4結合ポリペプチドは、2コピーの、以下の構造：(5T4 VHH)-リンカー-Fcを有する5T4結合ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、多価5T4結合ポリペプチドは四価である。いくつかの態様において、本開示の四価5T4結合ポリペプチドは、2コピーの、以下の構造：(5T4 VHH)-リンカー-(5T4 VHH)-リンカー-Fcを有する5T4-ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、多価5T4結合ポリペプチドは六価である。いくつかの態様において、本開示の六価5T4結合ポリペプチドは、2コピーの、以下の構造：(5T4 VHH)-リンカー-(5T4 VHH)-リンカー-(5T4 VHH)-リンカー-Fcを有する5T4結合ポリペプチドを含む。

30

【0249】

いくつかの場合には、結果として生じた融合タンパク質が、2つの同一のポリペプチドから形成されるように、Fc領域のCH3ドメインを、ホモ二量体化ドメインとして用いることができる。他の場合には、ヘテロ二量体化を可能にするために、Fc領域のCH3二量体界面領域を変異させることができる。例えば、構築物が非対称融合タンパク質であるように、ヘテロ二量体化ドメインを融合タンパク質中に組み込むことができる。

【0250】

提供される態様のいずれかにおいて、5T4 VHHドメインは、上記のいずれかであることができる。いくつかの態様において、5T4 VHHドメインは、5T4に結合するヒト化VHHドメインである。

40

【0251】

様々な態様において、5T4結合ポリペプチドに含まれるFcドメインは、ヒトFcドメインであるか、またはヒトFcドメインに由来する。いくつかの態様において、融合タンパク質は、免疫グロブリンFc領域を含有する。いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域は、IgG1アイソタイプ、IgG2アイソタイプ、IgG3アイソタイプ、およびIgG4サブクラスからなる群より選択されるIgGアイソタイプである。

【0252】

いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域またはその免疫学的活性断片は、IgG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Fc領域は、以下のアミノ酸配列を有する、ヒトIgG1アイソタイプのものである。

50

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT
 KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
 TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK
 LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 8)

【 0 2 5 3 】

いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域またはその免疫学的活性断片は、SEQ ID NO: 8のアミノ酸配列に対して少なくとも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。

10

【 0 2 5 4 】

本開示の融合タンパク質がFcポリペプチドを含むいくつかの態様において、Fcポリペプチドを変異させるかまたは改変する。場合によっては、変異には、Fcポリペプチドのエフェクター機能を低減させるための1つまたは複数のアミノ酸置換が含まれる。エフェクター機能を変更する、例えば低減させる、Fcポリペプチドに対する変異の様々な例が、下記のいずれかを含み、公知である。いくつかの態様において、Fc領域におけるアミノ酸置換への言及は、特定のSEQ ID NOに関して説明されない限り、KabatによるEUナンバリング (Kabatナンバリングとも呼ばれる) による。EUナンバリングは、公知であり、ごく最近更新されたIMGT Scientific Chart (IMGT (登録商標)、the international ImMunoGeneTics information system (登録商標)、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Kabat, E.A. et al. Sequences of Proteins of Immunological interest. 5th ed. US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242 (1991) において報告されているようなEUインデックスに従う。

20

【 0 2 5 5 】

いくつかの態様において、低減したエフェクター機能を示すFc領域は、5T4結合またはCD3結合が望ましいが、ある特定のエフェクター機能 (例えば、CDCおよびADCC) が不必要であるかまたは有害である適用について、望ましい候補であり得る。CDC活性および/またはADCC活性の低減/枯渇を確認するために、インビトロおよび/またはインビボの細胞傷害活性アッセイを実施することができる。例えば、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要素が、Fc R結合を欠如する (したがって、ADCC活性を欠如する可能性が高い) が、FcRn結合能を保持することを確実にするために、Fc受容体 (FcR) 結合アッセイを実施することができる。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞は、Fc RIIIのみを発現するのに対して、単球は、Fc RI、Fc RII、およびFc RIIIを発現する。関心対象の分子の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)を参照されたい) 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)を参照されたい) に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法が使用されてもよい (例えば、フローサイトメトリー用のACT1 (商標) 非放射性細胞傷害活性アッセイ (CellTechnology, Inc. Mountain View, Calif.); およびCytoTox 96 (商標) 非放射性細胞傷害活性アッセイ (Promega, Madison, Wis.) を参照されたい)。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞 (PBMC) およびナチュラルキラー (NK) 細胞が含まれる。代替的に、または追加的に、関心対象の分子の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)に開示されるものなどの動物モデルにおいて、評価されてもよい。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要素が、C1qに結合できず

30

40

50

、したがって、CDC活性を欠如することを確認するために、C1q結合アッセイもまた実施されてもよい。例えば、WO 2006/029879およびWO 2005/100402における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アッセイが行われてもよい（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)を参照されたい）。当技術分野において公知の方法を用いて、FcRn結合およびインビボクリアランス/半減期の決定もまた行うことができる（例えば、Petkova, S. B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)を参照されたい）。

【0256】

いくつかの態様において、ヒトIgG Fc領域は、抗体依存性細胞性細胞傷害活性（ADCC）および/または補体依存性細胞傷害活性（CDC）を変更するように改変され、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., 1992 J Immunol, 148: 3461-3468に記載され; Kaneko and Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1):1-11において概説されるアミノ酸改変である。

【0257】

ADCCを増強する変異の例には、Ser239およびIle332での改変、例えば、Ser239AspおよびIle332Glu（S239D、I332E）が含まれる。CDCを増強する変異の例には、Lys326およびGlu333での改変が含まれる。いくつかの態様において、Fc領域は、これらの位置の一方または両方で改変され、例えば、Kabatナンバリングシステムを用いたLys326Alaおよび/またはGlu333Ala（K326AおよびE333A）を有する。

【0258】

いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体結合を低減させるために以下の位置のうちの1つまたは複数で変更される：Leu234（L234）、Leu235（L235）、Asp265（D265）、Asp270（D270）、Ser298（S298）、Asn297（N297）、Asn325（N325）、Ala327（A327）、またはPro329（P329）。例えば、Leu234Ala（L234A）、Leu235Ala（L235A）、Leu235Glu（L235E）、Asp265Asn（D265N）、Asp265Ala（D265A）、Asp270Asn（D270N）、Ser298Asn（S298N）、Asn297Ala（N297A）、Pro329Ala（P329A）もしくはPro239Gly（P329G）、Asn325Glu（N325E）、またはAla327Ser（A327S）。好ましい態様において、Fc領域内の改変は、Fc受容体 受容体に対する結合を低減させ、他方、新生児Fc受容体（FcRn）に対する結合へは最小の影響を有する。

【0259】

いくつかの態様において、ヒトIgG1 Fc領域は、融合タンパク質のグリコシル化を阻止するためにアミノ酸Asn297（Kabatナンバリング）で改変され、例えば、Asn297Ala（N297A）またはAsn297Asp（N297D）を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体相互作用を変更するためにアミノ酸Leu235（Kabatナンバリング）で改変され、例えば、Leu235Glu（L235E）またはLeu235Ala（L235A）を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体相互作用を変更するためにアミノ酸Leu234（Kabatナンバリング）で改変され、例えば、Leu234Ala（L234A）を有する。いくつかの態様において、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、例えば、Leu234AlaおよびLeu235Ala（L234A/L235A）またはLeu234ValおよびLeu235Ala（L234V/L235A）を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、234、2

10

20

30

40

50

35、および297のアミノ酸で変更され、例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Asn297Ala (L234A/L235A/N297A) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、234、235、および329のアミノ酸で変更され、例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Pro239Ala (L234A/L235A/P329A) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体相互作用を変更するためにアミノ酸Asp265 (Kabatナンバリング) で改変され、例えば、Asp265Ala (D265A) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体相互作用を変更するためにアミノ酸Pro329 (Kabatナンバリング) で改変され、例えば、Pro329Ala (P329A) またはPro329Gly (P329G) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、アミノ酸265および329の両方で変更され、例えば、Asp265AlaおよびPro329Ala (D265A/P329A) またはAsp265AlaおよびPro329Gly (D265A/P329G) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、234、235、および265のアミノ酸で変更され、例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Asp265Ala (L234A/L235A/D265A) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、234、235、および329のアミノ酸で変更され、例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Pro329Gly (L234A/L235A/P329G) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、234、235、265、および329のアミノ酸で変更され、例えば、Leu234Ala、Leu235Ala、Asp265Ala、Pro329Gly (L234A/L235A/D265A/P329G) を有する。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体結合を低減させるためにGly235で変更される。例えば、Gly235を、融合タンパク質から欠失させる。いくつかの態様において、ヒトIgG1 Fc領域は、CD32Aとの相互作用を増強するためにアミノ酸Gly236で改変され、例えば、Gly236Ala (G236A) を有する。いくつかの態様において、ヒトIgG1 Fc領域は、Lys447を欠如している (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス)。

10

20

30

40

【0260】

いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体結合を低減させるために以下の位置のうちの1つまたは複数のアミノ酸を欠如している：Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、またはLeu235 (L235)。いくつかの態様において、融合タンパク質のFc領域は、Fc受容体結合を低減させるために、以下の位置のうちの1つまたは複数のアミノ酸を欠如しており：Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、またはLeu235 (L235)、かつ、以下の位置のうちの1つまたは複数のアミノ酸が改変されている：Asp265 (D265)、Asn297 (N297)、またはPro329 (P329)。例えば、5T4結合ポリペプチドに含まれるFc領域は、ヒトFcドメインに由来し、IgG1 E233、L234、およびL235に対応するヒンジの下の方に3つのアミノ酸欠失を含む。いくつかの局面において、そのようなFcポリペプチドは、Fc Rをエンゲージせず、したがって、「エフェクターサイレント」または「エフェクターナル」と言われる。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結合を低減させる。いくつかの態様において、これらの3つのアミノ酸のFc欠失を伴うFc領域を有するポリペプチドは、FcRnに対する結合を保持し、したがって、長期の半減期、およびFcRn媒介性リサイクリングに関連するトランスサイトーシスを有する。そのような改変されたFc領域は、「Fc xELL」または「Fc欠失」と言われ、以下のアミノ酸配列を有する。

PAPGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR

EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLT

PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV

DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK (SEQ ID NO: 9)

【0261】

いくつかの態様において、免疫グロブリンFc領域またはその免疫学的活性断片は、SEQ

50

ID NO: 9のアミノ酸配列に対して少なくとも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。

【0262】

いくつかの態様において、ヒトIgG Fc領域は、FcRn結合を増強するように改変される。FcRnに対する結合を増強する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 Chem Vol. 281(33) 23514-23524）、Met428LeuおよびAsn434Ser（M428L、N434S）（Zalevsky et al 2010 Nature Biotech, Vol. 28(2) 157-159）、またはMet252Ile、Thr256Asp、Met428Leu（それぞれM252I、T256D、M428L）である（Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス）。

10

【0263】

いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドに含まれるFcドメインは、ヒトFcドメインに由来し、変異M252YおよびM428Vを含み、本明細書において「Fc-YV」と言われる。いくつかの態様において、変異したかまたは改変されたFcポリペプチドは、Kabatナンバリングシステムを用いて以下の変異：M252YおよびM428Lを含む。いくつかの態様において、そのような変異は、エンドソームの酸性pH（6.5付近）でFcRnに対する結合を増強し、他方、中性pH（約7.2）で検出可能な結合を失い、これは、FcRn媒介性リサイクリングの増強および長期の半減期を可能にする。

20

【0264】

いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドに含まれる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導する変異を含む。いくつかの態様において、そのような変異には、「ノブ」変異および「ホール」変異と言われるものが含まれる。例えば、Thr366でCH3ドメイン内にアミノ酸改変を有すると、より嵩が高いアミノ酸、例えばTyrで置き換えられた場合（T366W）に、位置Thr366、Leu368、およびTyr407に、より嵩が低いアミノ酸、例えば、それぞれSer、Ala、およびValへのアミノ酸改変（T366S/L368A/Y407V）を有する第2のCH3ドメインと優先的にペア形成することができる。いくつかの態様において、「ノブ」Fcドメインは、変異T366Wを含む。いくつかの態様において、「ホール」Fcドメインは、変異T366S、L368A、およびY407Vを含む。CH3改変を介したヘテロ二量体化は、例えば、相対するCH3ドメイン上でSer354をCysに（S354C）およびY349をCysに（Y349C）変化させることによる、ジスルフィド結合の導入によって、さらに安定化させることができる（Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15において概説される）。いくつかの態様において、ヘテロ二量体化に用いられるFcドメインは、追加の変異、例えば、ヘテロ二量体Fcペアの第2のメンバー上の対応する変異Y349Cと非対称性ジスルフィドを形成する、ヘテロ二量体Fcペアの第1のメンバー上の変異S354Cを含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcペアの1つのメンバーは、FcRn結合を維持しながらプロテインA結合を阻止するように、改変H435RまたはH435Kを含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcペアの1つのメンバーは、改変H435RまたはH435Kを含み、他方、ヘテロ二量体Fcペアの第2のメンバーは、H435で改変されない。様々な態様において、ホールFcドメインは、改変H435RまたはH435Kを含み（改変がH435Rであるいくつかの例において、「ホール-R」と言われる）、他方、ノブFcドメインは含まない。いくつかの例において、ホール-R変異は、ヘテロ二量体の精製を、存在し得るホモ二量体ホールFcドメインを上回るように改善する。

30

40

【0265】

いくつかの態様において、ヒトIgG Fc領域は、二量体化を阻止するように改変される。これらの態様において、本開示の融合タンパク質は単量体である。例えば、残基Thr366での電荷を有する残基への改変、例えば、Thr366Lys、Thr366Arg、Thr366Asp、またはThr366Glu（それぞれT366K、T366R、T366D、またはT366E）は、CH3-C

50

H3二量体化を阻止する。

【 0 2 6 6 】

いくつかの態様において、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活性断片は、以下のアミノ酸配列を有する、ヒトIgG2アイソタイプのものである。

PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK

PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT

LPSPREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL

TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 10)

10

【 0 2 6 7 】

いくつかの態様において、融合物またはその免疫学的活性断片は、SEQ ID NO: 10のアミノ酸配列に対して少なくとも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IgG2ポリペプチド配列を含む。

【 0 2 6 8 】

いくつかの態様において、ヒトIgG2 Fc領域は、アミノ酸Asn297で改変される（例えば、抗体のグリコシル化を阻止するため、例えば、Asn297Ala (N297A) またはAsn297Asp (N297D)）。いくつかの態様において、ヒトIgG2 Fc領域は、Lys447を欠如している (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス)。

20

【 0 2 6 9 】

いくつかの態様において、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活性断片は、以下のアミノ酸配列を有する、ヒトIgG3アイソタイプのものである。

PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFKWYV DGVEVHNAKT

KPREEQYNST FRVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKTK KGQPREPQVY

TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPMLD SDGSFFLYSK

LTVDKSRWQQ GNIFSCSVME EALHNRFQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)

30

【 0 2 7 0 】

いくつかの態様において、抗体またはその免疫学的活性断片は、SEQ ID NO: 11のアミノ酸配列に対して少なくとも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IgG3ポリペプチド配列を含む。

【 0 2 7 1 】

いくつかの態様において、ヒトIgG3 Fc領域は、抗体のグリコシル化を阻止するためにアミノ酸Asn297 (Kabatナンバリング) で改変され、例えば、Asn297Ala (N297A) またはAsn297Asp (N297D) を有する。いくつかの態様において、ヒトIgG3 Fc領域は、半減期を延長するためにアミノ酸435で改変され、例えば、Arg435His (R435H) を有する。いくつかの態様において、ヒトIgG3 Fc領域は、Lys447を欠如している (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス)。

40

【 0 2 7 2 】

いくつかの態様において、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活性断片は、以下のアミノ酸配列を有する、ヒトIgG4アイソタイプのものである。

PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT
 KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY
 TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR
 LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 12)

【 0 2 7 3 】

いくつかの態様において、抗体またはその免疫学的活性断片は、SEQ ID NO : 12のアミノ酸配列に対して少なくとも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。

10

【 0 2 7 4 】

いくつかの態様において、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活性断片は、以下のアミノ酸配列を有する、ヒトIgG4アイソタイプのものである。
 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT
 KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY
 TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR
 LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK (SEQ ID NO: 13)

20

【 0 2 7 5 】

いくつかの態様において、抗体またはその免疫学的活性断片は、SEQ ID NO : 13のアミノ酸配列に対して少なくとも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。

【 0 2 7 6 】

いくつかの態様において、ヒトIgG4 Fc領域は、Fc受容体相互作用を変更するためにアミノ酸235で改変され、例えば、Leu235Glu (L235E) を有する。いくつかの態様において、ヒトIgG4 Fc領域は、抗体のグリコシル化を阻止するためにアミノ酸Asn297 (Kabatナンバリング) で改変され、例えば、Asn297Ala (N297A) またはAsn297Asp (N297D) を有する。いくつかの態様において、ヒトIgG4 Fc領域は、Lys447を欠如している (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス)。

30

【 0 2 7 7 】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、免疫グロブリンヒンジ領域に由来する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することができる。例えば、融合タンパク質は、EPKSSDKTHTCPPC (SEQ ID NO: 14) の配列を有する改変型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は、セリンに変異しており、例えば、Cys220Ser (C220S) を有する。他の態様において、融合タンパク質は、配列DKTHTCPPC (SEQ ID NO : 15) を有する切断型ヒンジを含有する。

40

【 0 2 7 8 】

いくつかの態様において、融合タンパク質は、配列ESKYGPPCPPC (SEQ ID NO : 16) を有する、鎖交換を阻止するかまたは低減させるように改変されている、例えば、Ser228Pro (S228P) を有する、IgG4由来の改変型ヒンジを有する。いくつかの態様において、融合タンパク質は、リンカーポリペプチドを含有する。他の態様において、融合タンパク質は、リンカーおよびヒンジポリペプチドを含有する。

【 0 2 7 9 】

いくつかの態様において、Fc領域は、N297でのN結合グリカン鎖に付着したフコースが欠如しているか、または低減している。FUT8欠損細胞株における生成；哺乳動物細胞培

50

養培地への阻害剤、例えばカスチノスペルミンの添加；および産生細胞株の代謝操作を含むがそれらに限定されない、フコシル化を阻止する多数の方法がある。

【0280】

いくつかの態様において、Fc領域は、ヒトにおいて見出さ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。いくつかの態様において、本開示のVHH含有ポリペプチドは、位置Leu11の変異、例えば、Leu11Glu(L11E)またはLeu11Lys(L11K)によって改変される。他の態様において、本開示のシングルドメイン抗体は、カルボキシ末端領域における変化によって改変され、例えば、末端配列は、配列 GQGTLVTVKPGG (SEQ ID NO: 17) または GQGTLVTVEPGG (SEQ ID NO: 18)

10

またはその改変を有する。いくつかの態様において、本開示のVHH含有ポリペプチドは、位置11の変異によって、およびカルボキシ末端領域における変化によって改変される。

【0281】

いくつかの態様では、本開示の融合タンパク質の1つまたは複数のポリペプチドは、アミノ酸リンカーを介し機能的に連結されている。いくつかの態様では、これらのリンカーは、主としてアミノ酸のグリシンおよびセリンで構成され、本明細書ではGSリンカーと呼ばれる。いくつかの態様では、これらのリンカーは、主としてアミノ酸のグリシンで構成され、本明細書ではグリシンリンカーと呼ばれる。本開示の融合タンパク質のGSリンカーまたはグリシンリンカーは、さまざまな長さであってよく、たとえば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20アミノ酸長であってもよい。

20

【0282】

いくつかの態様では、GSリンカーは、GGSGGS, すなわち, (GGS)₂ (SEQ ID NO: 1); GGSGGSGGS, すなわち, (GGS)₃ (SEQ ID NO: 2); GGSGGSGGSGGS, すなわち, (GGS)₄ (SEQ ID NO: 3); および GGSGGSGGSGGSGGS, すなわち, (GGS)₅ (SEQ ID NO: 4)

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、リンカーは、非限定例として

GG, GGG, GGGG (SEQ ID NO: 5),

30

GGGGG (SEQ ID NO: 6), および GGGGGG (SEQ ID NO: 7)

などのグリシン残基を含む可動性リンカーである、グリシンリンカーである。いくつかの態様では、リンカーは(GGGGS)_nであり、nは1~5であり(SEQ ID NO: 123); (GGGGGS)_nであり、nは1~4であり(SEQ ID NO: 124);

GGGGGS (SEQ ID NO: 125); GGGGGGS (SEQ ID NO: 126); GGGGGSGGGGSGGGGGS

(SEQ ID NO: 127); GGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO: 128); GGSGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ

ID NO: 129); または PGGGG (SEQ ID NO: 327)

である。いくつかの態様では、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み得る。

40

【0283】

B. コンジュゲート

本明細書において提供される5T4に特異的に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、1つまたは複数のさらなる部分とを含む、コンジュゲート、が本明細書において提供される。さらなる部分は、細胞傷害剤などの治療剤であり得るか、または検出剤であり得る。いくつかの態様において、該部分は、ターゲティング部分、低分子薬物(500ダルトンのモル質量未満の、ポリペプチドではない薬物)、毒素、細胞分裂抑制剤、細胞傷害剤、免疫抑制剤、診断目的に適した放射性作用物質、治療目的での放射性金属イオン、プロドラッグ活性化酵素、生物学的半減期を増加させる作用物質、または診断用のもしくは検

50

出可能な作用物質であり得る。

【0284】

いくつかの態様において、コンジュゲートは、細胞傷害性、細胞分裂阻害性、またはある程度の治療効果をもたらす他の作用のいずれかである、治療剤にコンジュゲートされた、本明細書において提供される1つまたは複数の5T4 VHHドメインを含む抗体薬物コンジュゲート（ADC、イムノコンジュゲートとも呼ばれる）である。いくつかの態様において、細胞傷害剤は、化学療法剤、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的に活性な毒素、またはその断片）、または放射性同位元素（すなわち、放射性コンジュゲート（radioconjugate））である。いくつかの態様において、本開示の提供される抗体薬物コンジュゲートは、薬物部分の、腫瘍への標的指向送達を可能にする。いくつかの場合において、これは、標的指向された腫瘍細胞の死滅をもたらすことができる。

10

【0285】

いくつかの態様において、本明細書において、治療剤とコンジュゲートされた、本明細書において提供される少なくとも1つの5T4 VHHドメインを含む5T4結合コンジュゲートが提供される。いくつかの態様において、治療剤には、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含まれる（Rowland et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-187, 1986）。いくつかの態様において、治療剤は細胞内活性を有する。いくつかの態様において、5T4結合コンジュゲートは内部移行し、治療剤は、細胞のタンパク質合成を遮断する細胞毒であり、その中で細胞死をもたらす。いくつかの態様において、治療剤は、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であり、例えば、ゲロニン、ボウガニン（bougainin）、サポリン、リシン、リシンA鎖、ブリオジン（bryodin）、ジフテリア毒素、レストリクトシン、シュードモナス外毒素A、およびそれらのバリエーションを含む。いくつかの態様において、治療剤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である場合、タンパク質を細胞に対して細胞傷害性にするために、5T4結合コンジュゲートは、標的細胞への結合時に内部移行しなければならない。

20

【0286】

いくつかの態様において、本明細書において、毒素とコンジュゲートされた、本明細書において提供される少なくとも1つの5T4 VHHドメインを含む5T4結合コンジュゲートが提供される。いくつかの態様において、毒素には、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（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)）、マイタンシノイド（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)）などの低分子毒素が含まれる。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メカニズムによってその細胞傷害作用および細胞分裂阻害作用を発揮し得る。

30

【0287】

いくつかの態様において、本明細書において、検出可能なシグナルを直接的にまたは間接的に発生することができる、標識とコンジュゲートされた、本明細書において提供される少なくとも1つの5T4 VHHドメインを含む5T4結合コンジュゲートが提供される。これらの5T4結合コンジュゲートは、研究または診断用途で、例えば、がんのインビボ検出において、用いることができる。標識は好ましくは、検出可能なシグナルを直接的にまたは間接的に生じることができる。例えば、標識は、放射線不透過物もしくは放射性同位体、例えば、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹I；蛍光（フルオロフォア）もしくは化学発光（クロモフォア）化合物、例えば、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、またはルシフェリン；酵素、例えば、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクト

40

50

シダーゼ、もしくはホースラディッシュペルオキシダーゼ；造影剤；または金属イオンであり得る。いくつかの態様において、標識は、シンチグラフィ試験用の放射性原子、例えば、 ^{99}Tc もしくは ^{123}I 、または核磁気共鳴（NMR）画像法（磁気共鳴画像法、MRIとしても公知）用のスピン標識、例えば、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、もしくは鉄である。ジルコニウム89は、例えばPET画像法用に、さまざまな金属キレート剤と複合体化され、抗体とコンジュゲートされてもよい（WO 2011/056983）。

【0288】

5T4結合コンジュゲートは、当技術分野において公知の任意の方法を用いて調製され得る。例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるWO 2009/067800、WO 2011/133886、および米国特許出願公報第2014322129号を参照されたい。

【0289】

いくつかの態様において、結合は、共有結合性または非共有結合性であってもよく、例えば、ビオチン-ストレプトアビジン非共有結合性相互作用を介する。いくつかの態様において、同じまたは異なっている1、2、3、4、または5以上の部分が、5T4 VHHドメインにコンジュゲート、連結または融合され、5T4結合コンジュゲートを形成する。いくつかの態様において、そのような部分は、当技術分野において公知の種々の分子生物学的または化学的コンジュゲーションおよび連結方法を用いてVHHドメインに結合させることができる。いくつかの態様において、リンカー、例えば、ペプチドリナー、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助けるリンカーは、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エフェクター部分を連結またはコンジュゲートするために用いることができる。

【0290】

いくつかの態様において、5T4 VHHドメインは、リンカー（L）を通じて1つまたは複数の部分、例えば、1個のVHH当たり約1～約20の薬物部分にコンジュゲートされる。いくつかの態様において、5T4結合コンジュゲートは、以下の構成成分：（VHHドメイン）、（L）_q、および（部分）_mを含み、ここで、VHHドメインは、記載されるように5T4に特異的に結合できる記載の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；結果として生じる5T4結合コンジュゲートは5T4に結合する。特定の態様において、mは1～4であり、かつqは0～8である。

【0291】

リンカーは、1つまたは複数のリンカー構成成分で構成され得る。抗体および薬物部分の共有結合では、リンカーは典型的には、2つの反応性官能基、すなわち、反応性という意味では二価性、を有する。2個以上の機能性部分または生物的に活性な部分、例えば、ペプチド、核酸、薬物、毒素、抗体、ハプテン、およびレポーター基などを結合させるのに有用な二価リンカー試薬は公知であり、方法は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している（Hermanson, G. T. (1996) Bioconjugate Techniques; Academic Press: New York, p 234-242）。

【0292】

例示的なリンカー構成成分には、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）ペンタノアート（「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-1 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）アミノベンゾアート（「SIAB」）が含まれる。

【0293】

いくつかの態様において、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には、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には、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には、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には、天然に生じるもの、ならびにマイナーアミノ酸および非天然型のアミノ酸アナログ、例えばシトルリンなどが含まれる。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、カテプシンB、C、およびDによる酵素的切断に対する選択性において設計および最適化することができる。

【0294】

VHHドメインと細胞傷害剤とのコンジュゲートは、多種多様な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート (SPDP)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (例えば、ジメチルアジピミデートHCl)、活性エステル (例えば、ジスクシンイミジル基質)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物 (例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアナート (例えば、トルエン2,6-ジイソシアナート)、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) を用いて製造することができる。

【0295】

抗体薬物コンジュゲートは、多種多様な方法、例えば、当業者に公知の有機化学反応、条件、および試薬によって調製することができる。1つの態様において、方法には、(1) 共有結合を介しての、VHH-Lを形成するための、VHHドメインの求核基と二価リンカー試薬との反応、続いての薬物部分Dとの反応；および(2) 非共有結合を介しての、D-Lを形成するための、薬物部分の求核基と二価リンカー試薬との反応、続いてのVHHドメインの求核基との反応が含まれる。

【0296】

VHHドメインを含む抗体上の求核基には、これらに限定されないが、(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ている場合には、糖のヒドロキシル基またはアミノ基が含まれる。アミン基、チオール基、およびヒドロキシル基は求核性であり、(i) NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、および酸ハライドなどの活性エステル；(ii) アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(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、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と共有結合を形成するように反応することができる。さらなる求核基を、アミンのチオールへの変換を生じさせるリジンと2-イミノチオラン (Traut試薬) との反応を通じて抗体内に導入することができる。反応性チオール基は、1、2、3、4、またはそれを上回るシステイン残基を導入すること (例えば、1つまたは複数の非天然型システインアミノ酸残基を含む変異体抗体を調製すること) によって、抗体 (またはその断片) 内に導入されてもよい。

【0297】

コンジュゲート、例えば抗体薬物コンジュゲートは、リンカー試薬または薬物上の求核性置換基と反応することができる求電性部分を導入する、抗体 (例えばVHHドメイン) の改変によって産生されてもよい。グリコシル化された抗体の糖は、例えば、過ヨウ素酸化試薬によって酸化され、リンカー試薬または薬物部分のアミン基によってもたらされるアルデヒドまたはケトン基を形成し得る。その結果生じるイミンSchiff塩基は、安定な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、安定なアミン連結を形成し得る。1つの態様において、グリコシル化抗体の炭水化物部分とガラクトースオキシダーゼまたはメタ-ヨウ素ナトリウムのいずれかとの反応は、薬物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) 基をもたらし得る (Hermanson, Bioconjugate Techniques)。別の態様において、N末端セリンまたはスレオニン残基を含有するタンパク質は、メタ-ヨウ素ナトリウムと反応

10

20

30

40

50

し、第1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、薬物部分またはリンカー求核試薬と反応することができる。

【0298】

同様に、薬物部分上の求核基には、これらに限定されないが、(i) NHSエステル、HOBtエステル、ハロホルメート、および酸ハライドなどの活性エステル；(ii) アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(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、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と共有結合を形成するように反応することができる、アミン基、チオール基、ヒドロキシル基、ヒドラジド基、オキシム基、ヒドラジン基、チオセミカルバゾン基、ヒドラジンカルボキシレート基、およびアリールヒドラジド基が含まれる。

10

【0299】

あるいは、VHHドメインと細胞傷害剤とを含有する融合タンパク質は、例えば、組換え技術またはペプチド合成によって、製造され得る。DNAの長さは、互いに隣接するか、またはコンジュゲートの望ましい特性を壊さないリンカーペプチドをコードする領域によって隔てられている、コンジュゲートの2つの部分をコードする各々の領域が含まれ得る。

【0300】

C. 多重特異性形式

本明細書において、5T4に結合する少なくとも1つのVHHドメインと、1つまたは複数の追加の結合ドメインとを含む、多重特異性である5T4結合ポリペプチドが提供される。典型的には、1つまたは複数の追加のドメインは、5T4以外の第2の抗原またはタンパク質に結合する。いくつかの態様において、1つまたは複数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。いくつかの態様において、追加のドメインはVHHドメインである。

20

【0301】

いくつかの態様において、多重特異性5T4結合ポリペプチドは、5T4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。いくつかの態様において、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(TMEAA)である。いくつかの態様において、この第2の抗原は免疫調節性抗原であり、該抗原は、免疫細胞においてシグナル伝達経路を強めるまたは弱めるのに関与する。いくつかの態様において、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(TMEAA)である。いくつかの態様において、この第2の抗原は免疫調節性抗原であり該抗原は、免疫細胞においてシグナル伝達経路を強めるまたは弱めるのに関与する。

30

【0302】

いくつかの場合において、多重特異性5T4結合ポリペプチドは、Fcドメイン、例えば上記のいずれかなどをさらに含むことができる。いくつかの態様において、本明細書において提供される多重特異性5T4結合ポリペプチドは、5T4に結合する少なくとも1つのVHHドメイン、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、およびFcドメイン。いくつかの態様において、Fcドメインは、5T4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な生理的条件下で多重特異性5T4結合ポリペプチドの二量体化を媒介する。

40

【0303】

非限定的で例示的な多重特異性5T4結合ポリペプチドを以下に説明する。

【0304】

1. 二重特異性T細胞エンゲージャー

いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは、本明細書において提供される少なくとも1つの5T4 VHHドメインおよびT細胞上に発現している表面分子に結合できる少なくとも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。いくつかの態様において、表面分子は、T細胞の活性化構成成分、例えば、T細胞受容体

50

複合体の構成成分である。特定の局面において、表面分子は、T細胞上に発現している活性化T細胞抗原であり、抗原結合分子との相互作用時にT細胞活性化を誘導することができる。例えば、いくつかの局面において、抗原結合分子と活性化T細胞抗原との相互作用は、T細胞受容体複体のシグナル伝達カスケードを誘発することによってT細胞活性化を誘導し得る。T細胞活性化を測定するのに適したアッセイは公知であり、増殖、分化、サイトカイン分泌、細胞傷害性活性、および/または1つもしくは複数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。いくつかの態様において、その標的の両方である、標的細胞上に発現している5T4およびT細胞上に発現しているT細胞分子（例えば、活性化T細胞抗原）に対するそのような5T4結合ポリペプチドの、同時またはほぼ同時の結合は、標的細胞とT細胞との間に一時的な相互作用をもたらすことができ、それにより、T細胞の活性化、例えば、細胞傷害性活性、続いての標的細胞の溶解をもたらす。

10

【0305】

いくつかの態様において、T表面分子、例えば活性化T細胞抗原は、CD3であるか、またはCD2である。特に、提供される二重特異性5T4結合ポリペプチドは、ヒトT細胞上に発現している活性化T細胞抗原、例えばヒトCD3またはヒトCD3に、特異的に結合することができる。特定の局面において、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。いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは、5T4に特異的に結合する少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、および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を含む、二重特異性抗体T細胞エンゲージャーであり得る。

20

【0306】

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たタンデムなscFv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を介して、相互に融合され、かつ安定な会合が可能な第1のおよび第2のサブユニットで構成されたFcドメインをさらに含む、タンデムなscFv分子（WO2013026837）；タンデムなダイアボディを含む、ダイアボディおよびその誘導体（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形式を含む得る二重親和性再標的指向（DART）分子；またはハイブリッドマウス/ラットIgG分子全体を含むトリオマブ（Seimetz et al, Cancer Treat Rev 36, 458-467 (2010)）を含む、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）分子である。上記分子のいずれかの同様の形式は、本明細書において提供される5T4 VHHドメインのいずれかを用いて作製することができる。

30

【0307】

いくつかの態様において、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')₂断片、Fv断片、scFv、ジスルフィド安定化Fv断片(dsFv)、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体(VHH)、またはシングルドメイン軽鎖抗体から選択される抗原結合断片である。いくつかの態様において、追加の結合ドメインは、活性化T細胞抗原、例えばCD2またはCD3への結合について一価である。

40

【0308】

いくつかの態様において、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できる。CD3複合体は、相互にかつT細胞受容体と非共有結合的に会合する、成熟Tリンパ球における少なくとも5つの膜結合型ポリペプチドの複合体である。CD3複合体には、
、
、
、および鎖（サブユニットとも呼ばれる）が含まれる。いくつかの態様において、追加の結合分子は、CD3またはCD3複合体に特異的に結合できる抗体または抗原結合断片であり、CD3結合ドメインとも呼ばれる。いくつかの態様において、CD3またはCD3複合体に結合できるCD3結合ドメインには、抗CD3 Fab断片、抗CD3 F(ab')₂断片、抗CD3 Fv断片、抗CD3 scFv、抗CD3 dsFv、抗CD3 scAb、抗CD3

50

dAb、抗CD3シングルドメイン重鎖抗体（VHH）、および抗CD3シングルドメイン軽鎖抗体の1つまたは複数のコピーが含まれる。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインは、CD3への結合について一価である。

【0309】

いくつかの場合において、CD3結合ドメインはCD3鎖を認識する。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインには、抗CD3 Fab断片、抗CD3 F(ab')₂断片、抗CD3 Fv断片、抗CD3 scFv、抗CD3 dsFv、抗CD3 scAb、抗CD3 dAb、抗CD3 シングルドメイン重鎖抗体（VHH）、および抗CD3 シングルドメイン軽鎖抗体の1つまたは複数のコピーが含まれる。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインはCD3への結合について一価である。

10

【0310】

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、これらに限定されないが、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（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）。いくつかの局面において、例えば、固定化されたまたは細胞に局在したまたは繋がれた抗CD3抗体による、T細胞上でのCD3のクラスター形成は、T細胞受容体のエンゲージメントに類似するが、そのクローン典型的な特異性とは非依存的な、T細胞活性化をもたらす。1つの態様において、CD3結合ドメインは、CD3抗原に一価かつ特異的に結合し、かつ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WO2005040220号）；SP34（Pessano et al. The EMBO Journal. 4: 337-344, 1985）；SP34のヒト化バリエーション（WO2015001085）；Teplizumab(商標)（MGA031、Eli Lilly）；US2011/0275787に記載の抗CD3結合分子；UCHT1（Pollard et al. 1987 J Histochem Cytochem. 35(11):1329-38；WO2000041474）；NI0401（WO2007/033230）；ピジリズマブ（米国特許第5,834,597号）；BC-3（Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)）；H2C（PCT公報第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。国際公開PCT出願第WO199404679号、同第WO2008119567号、同第WO2015095392号、同第WO2016204966号、同第WO2019133761号；公開特許出願第US20170369563号、同第US20180194842号、同第US20180355038号；米国特許第7,728,114号、同第7,381,803号、同第7,994,289号に記載のいずれかを含む、他の抗CD3抗体もまた、本明細書において提供される構築物において用いることができる。

20

30

【0311】

いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO: 19に記載の可変重（VH）鎖および/もしくはSEQ ID NO: 20に記載の可変軽鎖、またはこれらの配列に対して少なくとも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配列を含み、かつCD3に特異的に結合する。いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO: 19に記載の可変重（VH）鎖のCDRH1、CDRH2、およびCDRH3、ならびにSEQ ID NO: 20に記載の可変軽鎖のCDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む。いくつかの場合において、CD3結合領域は、SEQ ID NO: 19に記載のVH配列のヒト化バージョンおよびSEQ ID NO: 20に記載のVL配列のヒト化バージョンを含む。いくつかの態様において、CD3結合領域は、SEQ ID NO: 21; 22; 23のいずれか1つに記載のヒト化OKT3由来のVHドメイン配列および/もしくはSEQ ID NO: 24、25、26のいずれか1つに記載のVLドメイン配列、またはこれらの配列に対して少なくとも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配列を含むことができ、かつCD3に特異的に結合する。いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、上記VHおよびVL配列のいずれかの組み合わせ、特に、SEQ ID NO: 21、22、または23のいずれかに記載のVH配列とSEQ ID N

40

50

O : 24、25、または26のいずれかに記載のVL配列とのいずれかの組み合わせがその中に含まれている、Fab、scFv、Fv、またはdsFvである。いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、

少なくともアミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO : 29) を含むVH CDR1配列 ;

少なくともアミノ酸配列

RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30)

を含むVH CDR2配列 ;

少なくともアミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

10

を含むVH CDR3配列 ;

少なくともアミノ酸配列

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

を含むVL CDR1配列 ;

少なくともアミノ酸配列 GTNKRAP (SEQ ID NO : 33) を含むVL CDR2配列 ; および

少なくともアミノ酸配列 ALWYSNLWV (SEQ ID NO : 34) を含むVL CDR3配列

を含む。いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、

少なくともアミノ酸配列 TYAMN (SEQ ID NO : 29) を含むVH CDR1配列 ;

20

少なくともアミノ酸配列

RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30)

を含むVH CDR2配列 ;

少なくともアミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

を含むVH CDR3配列 ;

少なくともアミノ酸配列

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

30

を含むVL CDR1配列 ;

少なくともアミノ酸配列 GTNKRAP (SEQ ID NO : 33) を含むVL CDR2配列 ; および

少なくともアミノ酸配列 ALWYSNLWV (SEQ ID NO : 34) を含むVL CDR3配列

がその中に含まれている、Fab、scFv、Fv、またはdsFvである。

【0312】

いくつかの態様では、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO: 27に示される可変重(VH)

鎖および/またはSEQ ID NO: 28に示される可変軽鎖、あるいはこれらの配列に対して

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/またはVL配列を含有し、かつCD3に特異的に結合する。いくつかの態様では、CD

40

3結合ドメインは、SEQ ID NO: 27に示される可変重(VH)鎖のCDRH1、CDRH2、

およびCDRH3、ならびにSEQ ID NO: 28に示される可変軽鎖のCDRL1、CDRL2、お

よびCDRL3を含有する。いくつかの態様では、CD3結合ドメインは、それぞれSEQ ID

NO: 29、30、および31に示されるCDRH1、CDRH2、およびCDRH3、ならびにそれ

ぞれSEQ ID NO: 32、33、および34に示されるCDRL1、CDRL2、およびCDRL3可

変軽鎖を含有する。いくつかの場合では、CD3結合領域は、SEQ ID NO: 27に示される

VH配列のヒト化バージョン、およびSEQ ID NO: 28に示されるVL配列のヒト化バージョン

を含む。いくつかの態様では、CD3結合領域は、SEQ ID NO: 27、35~65、341

、343、もしくは358のいずれか1つに示されるヒト化VHドメイン配列、および/また

はSEQ ID NO: 28、66~84、293、340、もしくは342のいずれか1つに示されるVL

50

ドメイン配列、あるいはこれらの配列に対して少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を有するVHおよび/またはVL配列を含有し得、かつCD3に特異的に結合する。いくつかの態様では、CD3結合領域は、SEQ ID NO: 27、35~65、341、343、358、388、389、392、393のいずれか1つに示されるヒト化VHドメイン配列、および/またはSEQ ID NO: 28、66~84、293、340、342、390、391、394、395のいずれか1つに示されるVLドメイン配列、あるいはこれらの配列に対して少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を有するVHおよび/またはVL配列を含有し得、かつCD3に特異的に結合する。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列を含む可変重鎖(VH)、およびSEQ ID NO: 75のアミノ酸配列を含む可変軽鎖(VL)を含む。

10

【0313】

いくつかの態様では、CD3結合ドメインは、Fab、scFv、Fv、またはdsFvであって、上記のVHおよびVL配列の任意の組み合わせ、特にSEQ ID NO: 27、35~65、341、343、または358のいずれかに示されるVH配列と、SEQ ID NO: 28、66~84、293、340、または342のいずれかに示されるVL配列との任意の組み合わせを含有する。いくつかの態様では、抗CD3結合ドメインは、Fab、scFv、Fv、またはdsFvであって、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列を含む可変重鎖(VH)およびSEQ ID NO: 75のアミノ酸配列を含む可変軽鎖(VL)を含有する。

【0314】

いくつかの態様では、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO: 388、389、392、または393のいずれか1つに示される可変重(VH)鎖を含有する。いくつかの態様では、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO: 390、391、394、または395のいずれか1つに示される可変軽(VL)鎖を含有する。

20

【0315】

提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つの5T4 VHHドメインと、活性化しつつあるT細胞抗原に特異的な、CD3結合ドメインなどの、少なくとも1つの追加のドメインとを含有するいくつかの形式のいずれかにフォーマットされ得る。

【0316】

一態様では、二重特異性構築物は、たとえばCD3などの、T細胞活性化抗原に特異的なFab抗原結合断片、たとえば抗CD3 Fab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5T4 VHHドメインを含有する、二重特異性シングルドメイン抗体連結Fab(S-Fab)である。T細胞活性化抗原に対するFab、たとえば抗CD3 Fabは、記載されるVHおよびVL配列のいずれかを含有し得る。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、抗CD3 FabのVHまたはVL鎖のC末端に連結される。いくつかの態様では、S-Fabは、たとえば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(たとえばアルブミン)、ポリグルタミン酸、またはPASylationを用いてのコンジュゲーションにより、さらに改変することができる(Pan et al. (2018) International Journal of Nanomedicine, 2018:3189-3201)。

30

【0317】

別の態様では、二重特異性構築物は、scFv-シングルドメイン抗体であり、該構築物は、T細胞活性化抗原、たとえば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5T4 VHHを含有する。T細胞活性化抗原に対するscFv、たとえば抗CD3 scFvは、記載されるいずれかのVHおよびVL配列を含有し得る。いくつかの態様では、VHHドメインとscFvとは、ペプチドリンカーなどのリンカーによって接続されている。いくつかの態様では、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。いくつかの態様では、VHHドメインおよびscFvはそれぞれ、任意で、ヒンジ領域またはリンカー(たとえばペプチドリンカー)を介し、Fc領域に、たとえばFc領域のN末端に接続されている。Fc領域は、ヒトFc領域またはそのバリエーション、たとえばヒトIgG1 Fc領域またはそのバリエーション

40

50

トなど、本明細書に記載されるいずれかであり得る。特定の例では、Fc領域は、バリエーションFcドメイン、たとえばバリエーションヒトIgG1ドメインによって形成され、これらはヘテロ二量体化を促進するように変異または改変されていて、異なるポリペプチド同士が二量体化してヘテロ二量体をもたらすことができる。

【0318】

さらなる態様では、CD3結合ドメインはシングルドメイン抗体であり、CD3に特異的に結合するVHHドメインなどである。CD3に結合するVHHドメインを含むシングルドメイン抗体は公知であり、たとえば公報の米国特許出願第20160280795号を参照されたい。いくつかの態様では、CD3結合ドメインは、SEQ ID NO: 85に示される抗CD3 VHH、またはSEQ ID NO: 85に対して少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%の同一性を示す配列であり、かつCD3に特異的に結合する。そのような局面では、本明細書で提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、および少なくとも1つのCD3 VHHドメインを含み得る。構築物をフォーマットするために、いくつかの場合では、各VHHドメインが、任意で、ヒンジ領域またはリンカー（たとえばペプチドリinker）を介し、Fc領域に、たとえばFc領域のN末端に接続される。Fc領域は、ヒトFc領域またはそのバリエーション、たとえばヒト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。特定の例では、Fc領域は、バリエーションFcドメイン、たとえばバリエーションヒトIgG1ドメインによって形成され、これらはヘテロ二量体化を促進するように変異または改変されていて、異なるポリペプチド同士が二量体化してヘテロ二量体をもたらすことができる。

【0319】

上の諸態様では、以下のたとえば表3に記載するいずれかを含む、ヘテロ二量体化を促進するFc領域の例示的な改変が知られる。いくつかの態様では、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 328（たとえばSEQ ID NO: 103または107）、334（たとえばSEQ ID NO: 115または117）のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcのもう一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 329（たとえばSEQ ID NO: 104または108）、332（たとえばSEQ ID NO: 111または113）、336（たとえばSEQ ID NO: 119または121）のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含有する。いくつかの態様では、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 330（たとえばSEQ ID NO: 105または109）、335（たとえばSEQ ID NO: 116または118）のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcのもう一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 331（たとえばSEQ ID NO: 106または110）、333（たとえばSEQ ID NO: 112または114）、337（たとえばSEQ ID NO: 120または122）のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

【0320】

2. 制約付きCD3多重特異性構築物

いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは、制約付きT細胞エンゲージング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。特定の局面において、本明細書において提供される制約付き多重特異性構築物は、CD3などの活性化T細胞抗原、および5T4に結合する。本明細書において提供される制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、免疫グロブリンFc領域を含む第1の構成成分、CD3に結合する少なくとも1つの結合ドメインの1つまたは複数のコピーを含む第2の構成成分（本明細書において抗CD3結合ドメインまたはCD3結合ドメインと呼ばれ、これらは本明細書において互換的に用いられる）、ならびに第1の構成成分と第2の構成成分とを連結するリンカー、例えばポリペプチドリinkerを少なくとも含む。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のおよび第2の構成成分の一方または両方は、抗原への結合によってエンゲージされると、制約付きCD3結合領域が実質的にCD3に結合できるようになる、少なくとも1つの5T4 VHHドメインを含む。図3A～3Eは、制約付き多重特異性構築物の例示的な形式を図示する。

【0321】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、本明細書において提供される制約付き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の観点で2つの状態で存在する：
(1) 5T4に対する抗原結合ドメインのいずれかまたは全ての結合が存在しないときに、「不活性」状態が生じ、CD3結合が制約されかつT細胞相互作用が抑えられるかまたは低下される；および、(2) 抗原結合ドメインのいずれかまたは全てによる抗原結合時に、「活性」状態が生じ、CD3結合領域がCD3に結合できかつT細胞相互作用が可能になる。

【0322】

いくつかの態様において、Fc領域は、1つまたは複数のリンカーを介してCD3結合ドメインに連結される。いくつかの態様において、Fc領域は、1つまたは複数の切断不可能なリンカーを介してCD3結合領域に連結される。いくつかの態様において、Fc領域は、切断可能なリンカーまたは1つもしくは複数の他の不安定なリンカーを介してCD3結合領域に連結される。いくつかの態様において、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することができるリンカーである。いくつかの局面において、切断可能なリンカーの切断後に、増強されたCD3結合が生じる。いくつかのそのような局面において、「活性」状態は、CD3結合領域とFc領域とを連結するリンカーの切断を含む、複数のメカニズムを介して、さらに増幅させることができる。いくつかの態様において、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むリンカーである。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ているいくつかの態様において、リンカー内の切断後、増強されたCD3結合が生じ得る。

【0323】

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機能的に連結されている局面において、Fc領域とCD3結合領域との間のリンカーの切断は、制約付き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。制約付き多重特異性ポリペプチド構築物の構成に応じて、第1の構成成分および第2の構成成分は、異なる機能性を有してもよい。いくつかの態様において、Fc領域は、1つまたは複数のエフェクター機能、例えば、ADCC、CDC、またはADCP機能を示す領域である。そのような例において、本開示の制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、自己増幅システムを生成するために用いることができる。例えば、いくつかの局面において、FcとCD3結合ドメインの構成成分との間へ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露出を可能にすることによって、T細胞活性化能の増幅を可能にする。含まれる特定のリンカーに応じて、増幅工程は、腫瘍関連プロテアーゼまたは抗原依存性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。腫瘍プロテアーゼが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。それに対して、グランザイムBが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、エフェクター可能なFcが構築物中に含まれている場合において、増幅は、ADCCメカニズムを通じて生じる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。

【0324】

提供される制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域を含む第1の構成成分が、CD3結合領域を含む第2の構成成分のN末端にある立体配置を含む。そのような態様において、第1のおよび第2の構成成分は、Fc領域の末端に対してC末端にあるリンカーを介して連結される。いくつかの態様において、少なくとも1つの5T4 VHH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)領域に位置づけられる。いくつかの態様において、少なくとも1つの5T4 VHH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)領域に位置づけられる。いくつかの態様において、制約付き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およびC末端領域の両方に位置づけられた少なくとも2つの5T4 VHHドメインを含む。

【0325】

いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、二量体化が、2本のポリペプチド鎖間の共有結合性または非共有結合性の相互作用によって形成されている

、二量体である。いくつかの態様において、2本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、相互に共有結合的に結合される。いくつかの態様において、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。特定の態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、いくつかの場合では、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っている（ヘテロ二量体）、ヘテロ二量体Fc領域を含む。ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の特定の例において、CD3結合領域は、VHおよびVL鎖を含む2本鎖ポリペプチドであり、例えば、VHおよびVLを含むFv抗体断片である。いくつかの態様において、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。

【0326】

10

特定の態様において、Fvは、VH-VLヘテロ二量体が鎖間ジスルフィド結合によって安定化されている、ジスルフィド安定化 Fv断片（dsFv）である。いくつかの態様において、鎖間ジスルフィド結合は、VHおよび/またはVL鎖のフレームワーク位置中の位置の変異によって操作される。いくつかの態様において、VH鎖は変異G44Cを含み、VL鎖は変異G100Cを含み、これらはそれぞれkabatナンバリングによる。いくつかの態様において、ジスルフィド安定化抗CD3 Fvは、Kabatナンバリングによる、105位でCysへの変異を有する抗CD3 VHおよび43位でCysへの変異を有する抗CD3 VLを含む。

【0327】

いくつかの態様において、制約付き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（例えば、切断可能な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、切断可能なリンカー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。いくつかの態様において、第1のポリペプチドは、5T4に結合する1つまたは2つのVHHドメインを含む。いくつかの態様において、第2のポリペプチドは、5T4に結合する1つまたは2つのVHHドメインを含む。いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも2つの5T4 VHHドメインを含む。いくつかの場合において、少なくとも1つの5T4 VHH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5T4 VHHドメインは、CD3結合領域の鎖のC末端に位置する。

20

30

【0328】

いくつかの態様において、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のポリペプチドおよび第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）を含む。いくつかの態様において、第1のおよび/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。

【0329】

いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、5T4に結合する少なくとも2つのVHHドメインおよび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（CRBR）をさらに含む。いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、（1）N末端からC末端の順に：第1の5T4 VHH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、切断可能なリンカー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5T4 VHHドメインを含む、第1のポリペプチド；ならびに（2）N末端からC末端の順に：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もう一方の鎖（別のVHまたはVL）、および共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）を含む、第2のポリペプチドを含む。

40

【0330】

50

いくつかの態様において、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のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの両方は、抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）をさらに含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドおよび/または第2のポリペプチドのIRBR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。

【0331】

いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、5T4に結合する少なくとも2つのVHHドメインおよび抑制性受容体に結合する少なくとも1つの抑制性受容体結合領域（IRBR）を含む。いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、（1）N末端からC末端の順に：第1の5T4 VHH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、切断可能な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5T4 VHHドメインを含む、第1のポリペプチド；ならびに（2）N末端からC末端の順に：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もう一方の鎖（別のVHまたはVL）、および抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）を含む、第2のポリペプチドを含む。

10

【0332】

いくつかの態様において、第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドの少なくとも1つは、共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）をさらに含み、第1のポリペプチドまたは第2のポリペプチドの少なくとも1つは、抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）をさらに含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドおよび/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末端に位置づけられ得る。いくつかの態様において、第1のおよび/または第2のポリペプチドのIRBR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末端に位置づけられ得る。

20

【0333】

いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、5T4に結合する少なくとも2つのVHHドメイン、共刺激受容体に結合する共刺激受容体結合領域（CRBR）、および抑制性受容体に結合する抑制性受容体結合領域（IRBR）を含む。いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、（1）N末端からC末端の順に：第1の5T4 VHH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5T4 VHHドメインを含む、第1のポリペプチド；ならびに（2）N末端からC末端の順に：IRBRまたはCRBR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もう一方の鎖（別のVHまたはVL）、およびIRBRまたはCRBRのもう一方を含む、第2のポリペプチドを含む。

30

【0334】

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

40

【0335】

a. 5T4 VHH抗原結合ドメイン

本開示の制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、本明細書で提供されるいずれかの中から少なくとも1つの5T4 VHHドメインを含む。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 245~287、294~295、302のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 245~287、294~295、302、360のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様では、5T4 VHHドメインは、SEQ ID NO: 360に示されるアミノ酸の配列を含む。

【0336】

50

特定の態様では、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、少なくとも2つの5T4ドメインを含有する。いくつかの場合では、少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、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し、少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、CD3結合領域のVHまたはVL鎖に対してカルボキシ末端に位置づけられる。

【0337】

少なくとも2つのまたは2つの5T4 VHHドメインを含有する制約付き多重特異性ポリペプチド構築物の局面では、5T4 VHHドメインの各々が、5T4の同じまたは重複するエピトープに結合し得る。

【0338】

少なくとも2つのまたは2つの5T4 VHHドメインを含有する制約付き多重特異性ポリペプチド構築物の局面では、5T4 VHHドメインの各々が、5T4の異なるまたは重複しないエピトープに結合し得る。いくつかの態様では、第1および第2の5T4 sdAbが、別個のまたは重複しない5T4のエピトープに結合し、かつ/あるいは5T4に対する結合について競合しない。

【0339】

いくつかの態様では、5T4 VHHは、マウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 245に示されるアミノ酸配列を含む5T4 VHH、またはそのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 255に示されるアミノ酸配列を含む5T4 VHH、またはそのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。いくつかの態様では、SEQ ID NO: 276に示されるアミノ酸配列を含む5T4 VHH、またはそのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。

【0340】

いくつかの例では、第1のsdAbは、SEQ ID NO: 245~254、295、302、360のいずれか1つに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO: 245~254、295、302、360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合し;第2のsdAbは、SEQ ID NO: 255~287、294、302のいずれか1つに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO: 255~287、294のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する。

【0341】

いくつかの態様では、第1のsdAb(第1の5T4 VHHドメイン)は、SEQ ID NO: 245に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 246~254、295、もしくは302のいずれかに示されるヒト化バリエーションを含み;第2のsdAb(第2の5T4 VHHドメイン)は、SEQ ID NO: 255に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 256~275、SEQ ID NO: 276のいずれかに示されるヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO: 277~287、294、もしくは302のいずれかに示されるそのヒト化バリエーションを含む。

【0342】

いくつかの態様では、第1のsdAb(第1の5T4 VHHドメイン)は、SEQ ID NO: 245に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 246~254、295、302、もしくは360のいずれかに示されるヒト化バリエーションを含み;第2のsdAb(第2の5T4 VHHドメイン)は、SEQ ID NO: 255に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 256~275、SEQ ID NO: 276のいずれかに示されるヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO: 277~287、294、もしくは302のいずれかに示されるそのヒト化バリエーションを含む。

【0343】

いくつかの態様では、第1のsdAb(第1の5T4 VHHドメイン)および第2のsdAb(第2の5T4 VHHドメイン)は、SEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 294に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、第1のsdAb(第1の5T4 VHHドメイン)およ

び第2のsdAb（第2の5T4 VHHドメイン）は、SEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 276に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、第1のsdAb（第1の5T4 VHHドメイン）および第2のsdAb（第2の5T4 VHHドメイン）は、SEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 255に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、第1のsdAb（第1の5T4 VHHドメイン）および第2のsdAb（第2の5T4 VHHドメイン）は、SEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 295に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、第1のsdAb（第1の5T4 VHHドメイン）および第2のsdAb（第2の5T4 VHHドメイン）は、SEQ ID NO: 249およびSEQ ID NO: 270に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、第1のsdAb（第1の5T4 VHHドメイン）および第2のsdAb（第2の5T4 VHHドメイン）は、SEQ ID NO: 254およびSEQ ID NO: 287に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、第1のsdAb（第1の5T4 VHHドメイン）および第2のsdAb（第2の5T4 VHHドメイン）は、SEQ ID NO: 302およびSEQ ID NO: 302に示されるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様では、第1のsdAb（第1の5T4 VHHドメイン）および第2のsdAb（第2の5T4 VHHドメイン）は、SEQ ID NO: 360およびSEQ ID NO: 287に示されるアミノ酸配列を有する。

【0344】

いくつかの態様では、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、本明細書で提供されるいずれかなどの少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、および別の腫瘍関連抗原（TAA）に特異的な少なくとも1つのさらなる抗原結合ドメインを含有する。いくつかの態様では、少なくとも1つのさらなる抗原結合ドメインは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数のコピーを含む。特定の態様では、さらなるTAA抗原結合ドメインは、一本鎖抗体である。いくつかの例では、一本鎖は、scFv、scAb、シングルドメイン重鎖抗体、またはシングルドメイン軽鎖抗体である。たとえば、いくつかの場合では、さらなるTAA抗原結合ドメインは、1つまたは複数のシングルドメイン抗体（sdAb）断片、たとえばVHH、VNAR、または操作されたVHもしくはVKドメインを含む。VHHは、天然ラクダ科重鎖のみ抗体、重鎖のみ抗体を産生する遺伝子改変げっ歯類、またはナイーブ/合成ラクダ科もしくはヒト化ラクダ科シングルドメイン抗体ライブラリーから作製され得る。VNARは、軟骨性魚類重鎖のみ抗体から作製され得る。従来のヘテロ二量体VHおよびVKドメインから単量体sdAbを作製するのに、インターフェース操作および特定の生殖系列ファミリーの選択を含め、さまざまな方法が実施されている。

【0345】

いくつかの態様では、さらなるTAAは、1-92-LFA-3、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、アベリン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、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 (Nicastrin)、ノッチ受容体、ノッチ1、ノッチ2、ノッチ3、ノッチ4、NOV、OSM-R、OX-40、PAR2、PDGF-AA、PDGF-BB、PDGFRアルファ、PDGFRベータベータ、PD-1、PD-L1、PD-L2、フォスファチジル-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からなる群より選択される。

10

20

30

40

【0346】

いくつかの態様では、5T4 VHHドメインなどの抗原結合ドメインは、直接または間接的に、リンカーを介し、Fc領域におよび/またはCD3結合領域に連結されている。いくつかの態様では、連結はリンカーを介する。いくつかの態様では、リンカーは、連結ペプチド (LP) であり、記載されるいずれかの可動性または剛性リンカーを含み得る。いくつかの態様では、リンカーは、GGSGGS, すなわち, (GGGS)₂ (SEQ ID NO: 1); GGSGSGGS, すなわち, (GGGS)₃ (SEQ ID NO: 2); GGSGSGSGGS, すなわち, (GGGS)₄ (SEQ ID NO: 3); および GGSGSGSGSGGS, すなわち, (GGGS)₅ (SEQ ID NO: 4)

からなる群より選択される。いくつかの態様では、リンカーは、非限定例として GG, GGG, GGGG (SEQ ID NO: 5), GGGGG (SEQ ID NO: 6), および GGGGGG (SEQ ID NO: 7)

などのグリシン残基を含む可動性リンカーである。いくつかの態様では、リンカーは (GGGS)_n であり、nは1~5であり (SEQ ID NO: 123); (GGGGGS)_n であり、nは1~4であり (SEQ ID NO: 124); GGGGS (SEQ ID NO: 125); GGGGGS (SEQ ID NO: 126); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 127); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 128); GGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 129); または PGGGG (SEQ ID NO: 327)

である。いくつかの態様では、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。

【0347】

b. Fc領域

制約付き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、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、それぞれがFcを含む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、上記に記載されたいずれかであり得る。特定の態様において、Fc領域は、異なるポリペプチドを二量体化してヘテロ二量体を得る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改変されているFcドメイン

50

によって、形成される。したがって、いくつかの態様において、二量体は、多重特異性ポリペプチド構築物の2本のポリペプチド鎖が異なっているヘテロ二量体である。

【0348】

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さまざまな方法が公知であり、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) Frontiers in Immunology, 7:1; Davis et al. (2010) Protein Eng Des Sel, 23:195-202; 公開国際PCT出願第WO 1998/050431号、同第WO 2009/089004号、同第WO2011143545号、同第WO 2014/067011号、同第WO 2012/058768号、同第WO2018027025号; 公開米国特許出願第US20140363426号、同第US20150307628号、同第US20180016354号、同第US20150239991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号を参照されたい。Fc鎖のヘテロ二量体化を促進する方法は、例えば、「ノブイントゥホール」変異のセットを含むこと、または異なるポリペプチド鎖間の引力相互作用に有利なFcの静電的ステアリングをもたらす変異を含むことによる、Fc領域の変異誘発を含む。例えば、いくつかの態様において、ヘテロ二量体のFcポリペプチドは、Fc二量体界面間での帯電極性を変更する変異を含み、静電的に整合したFc鎖の同時発現は、好適な引力相互作用を支持し、それによって望ましいFcヘテロ二量体形成を促進するのに対して、好ましくない反発的電荷相互作用は、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)。細胞中で同時発現されると、鎖間の会合が可能になるが、これらの鎖は、電荷反発のために実質的に自己会合しない。ヘテロ二量体Fcを作製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、SEED Fcと呼ばれる相補的CH3ヘテロ二量体を作製することが含まれる。

【0349】

ヘテロ二量体化のための方法およびバリエーションはまた、「ノブおよびホール」変異(「非対称(skew)」バリエーションとも呼ばれる)、「静電的ステアリング」または「電荷対」に関連する変異、およびpIバリエーションを含む、公開国際PCT出願第WO2014/145806号に記載されているものも含む。ヘテロ二量体バリエーションはまた、米国公開出願第US2012/0149876号または同第US2018/011883号に記載のいずれかも含む。

【0350】

いくつかの態様において、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は、一対のまたは相補的なアミノ酸改変を含む。Fc融合物のポリペプチドの例示的な対を形成するアミノ酸改変を表3に記載する。

【0351】

(表3)ヘテロ二量体Fcの対を形成するアミノ酸

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

【0352】

いくつかの態様において、改変は、突起が、第1のおよび第2のFc含有ポリペプチドの複

合体形成を促進するように空洞内に配置可能であるように、突起 (protuberance) (ノブ) を第1のFcポリペプチド内に、および空洞 (ホール) を第2のFcポリペプチド内に、導入することを含む。ポリペプチドに突起および空洞を作製する置換および/または改変の標的とされるアミノ酸は典型的には、第2のポリペプチドの界面中の1つまたは複数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。

【0353】

いくつかの態様において、突起 (ホール) アミノ酸を含むように改変される第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、そのために第2のポリペプチドの隣接する界面における補償的 (compensatory) 空洞 (ホール) 中に位置することができる、ネイティブなまたは元のアミノ酸と少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸との置換を含む。ほとんどの場合、置換アミノ酸は、元のアミノ酸残基より大きな側鎖体積を有するものである。当業者は、突起を作製するのに理想的な置換アミノ酸であるアミノ酸残基を特定するためにアミノ酸残基の特性を決定および/または評価する方法を理解している。いくつかの態様において、突起の形成のための置換残基は、天然に生じる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。いくつかの例において、置換のために特定される元の残基は、小さな側鎖を有するアミノ酸残基、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、スレオニン、またはバリンなどである。

10

【0354】

いくつかの態様において、空洞 (ホール) を含むように改変される第2のFcポリペプチドは、第2のポリペプチドの界面から陥凹させ、よって第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できる、ネイティブなまたは元のアミノ酸と、少なくとも1つの側鎖を有するアミノ酸との置換を含むものである。ほとんどの場合、置換アミノ酸は、元のアミノ酸残基より小さな側鎖体積を有するものである。当業者は、空洞の形成に理想的な置換残基であるアミノ酸残基を特定するためにアミノ酸残基の特性を決定および/または評価する方法を理解している。概して、空洞の形成のための置換残基は、天然に生じるアミノ酸であり、例えば、アラニン (A)、セリン (S)、スレオニン (T)、およびバリン (V) を含む。いくつかの例において、置換のために特定される元のアミノ酸は、大きな側鎖を有するアミノ酸、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である。

20

30

【0355】

ヒトIgG1のCH3界面は、例えば、各表面から1090 Å²を埋める4つの逆平行 β 鎖に位置している各ドメイン上の16残基を含む (例えば、Deisenhofer et al. (1981) Biochemistry, 20:2361-2370; Miller et al., (1990) J Mol. Biol., 216, 965-973; 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製するCH3ドメインの改変は、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に記載される。いくつかの例において、突起および空洞を作製するCH3ドメインの改変は典型的には、2つの中心にある逆平行 β 鎖に位置している残基を標的とする。目的は、作製される突起が、パートナーのCH3ドメイン中の補償的空洞によって収容されるよりもむしろ周囲の溶媒内に突出することによって収容され得るリスクを最小化することである。

40

【0356】

例えば、いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcは、Thr366でCH3ドメイン内にアミノ酸改変を有するポリペプチドを含み、このポリペプチドは、より嵩高いアミノ酸、例えばTry (T366W) に置換されると、それぞれThr366、Leu368、およびTyr407の位置でのより嵩の少ないアミノ酸、例えば、Ser、Ala、およびValへのアミノ酸改変 (T366S/L368A/Y407V) を有する第2のCH3ドメインと優先的に対形成することができる。CH3改変によるヘテロ二量体化は、例えば、Ser354をCysへ (S354C) および相対するCH3ドメイン上のTyr349をCysへ (Y349C) 変更することによる、ジスルフィ

50

ド結合の導入によりさらに安定化することができる (Reviewed in Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15)。

【0357】

特定の態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fcヘテロ二量体化を媒介できる第1のFcおよび第2のFcを含み、変異T366WおよびS354Cを含む第1のFcポリペプチドならびに変異T366S、L368A、Y407V、およびY349Cを含む第2のFcポリペプチドを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 328または334に記載の配列を含むFcポリペプチドから選択され、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 329、332、または336に記載の配列を含むFcポリペプチドから選択される。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 103、107、115、または117のいずれかに記載のアミノ酸の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 104、108、111、113、119、または121のいずれかに記載のアミノ酸の配列であるかまたはそれを含む。

【0358】

いくつかの態様において、Fcポリペプチドは、Fc媒介エフェクター機能をもたらす特徴を示す。特定の例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 328に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 329または332であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 103に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 104または111に記載の配列であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 107に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 108または113に記載の配列であるかまたはそれを含む。第1のおよび第2のFcポリペプチドは、構築物のいずれかのポリペプチド鎖にフォーマットされ得る。

【0359】

いくつかの態様において、第1のおよび第2のFcポリペプチドの一方または両方は、1つまたは複数のFcエフェクター機能をさらに低下させる (例えば低下したFc受容体結合の) ための、1つまたは複数のアミノ酸変異をさらに含むことができる。Fcエフェクター機能を低下させるための例示的な変異は、記載されるいずれかを含む。いくつかの態様において、改変は、1つまたは複数の位置Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、またはLeu235 (L235) の欠失、例えば、アミノ酸Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、およびLeu235 (L235) の欠失であり得る。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 330または335に記載の配列を含むFcポリペプチドから選択され、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 331、333、または337に記載の配列を含むFcポリペプチドから選択される。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 105、109、116、または118のいずれかに記載のアミノ酸の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 106、110、112、114、120、または122のいずれかに記載のアミノ酸の配列であるかまたはそれを含む。

【0360】

特定の例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 330に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 331または333であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 105に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 106または112に記載の配列であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 109に記載の配列であるかまたはそれを含み、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 110または114に記載の配列であるかまたはそれを含む。第1のおよび第2のFcポリペプチドは、構築物のいずれかのポリペプチド鎖にフォーマットされ得る。

【0361】

いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドまたは第2のFcポリペプチドは変異M2

52Yおよび/またはM428Vをさらに含む。特定の例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 334に記載の配列であるかまたはそれを含ま、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 336に記載の配列であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 115に記載の配列であるかまたはそれを含ま、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 119に記載の配列であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 117に記載の配列であるかまたはそれを含ま、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 121に記載の配列であるかまたはそれを含む。他の例において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 335に記載の配列であるかまたはそれを含ま、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 337に記載の配列であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 116に記載の配列であるかまたはそれを含ま、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 120に記載の配列であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 118に記載の配列であるかまたはそれを含ま、第2のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 122に記載の配列であるかまたはそれを含む。第1のおよび第2のFcポリペプチドは、構築物のいずれかのポリペプチド鎖にフォーマットされ得る。

【0362】

ヘテロ二量体の促進を促すことができるバリエーションのさらなる例は、以下: S364K/E357QおよびL368D/K370S; L368D/K370SおよびS364K; L368E/K370SおよびS364K; T411T/E360E/Q362EおよびD401K; L368D/K370SおよびS364K/E357L、K370SおよびS364K/E357Q、ならびにT366S/L368A/Y407VおよびT366W、または366S/L368A/Y407V/Y349CおよびT366W/S354C)の中からの第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドの立体バリエーション(例えば、非対称バリエーション)の任意の組み合わせまたは対であり、ここで、各対は、第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドにおける変異を表す。特定の態様において、提供される構築物は、変異L368D/K370SおよびS364KおよびE357Qの対を含む、第1のおよび第2のFcポリペプチドを含む。

【0363】

ヘテロ二量体の作製に用いることができるさらなるメカニズムは、Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285(25):19637 (2010)に記載されるように、「静電的ステアリング」と呼ばれることもある。これは本明細書において、「電荷対」と呼ばれることもある。この態様において、静電気は、ヘテロ二量体化に向けての形成を歪めるために用いられる。当業者が理解しているように、これらはpIに対して、よって精製に対しても作用を有している場合があり、よって、いくつかの場合において、pIバリエーションともみなされ得る。しかしながら、これらは、強制的にヘテロ二量体化するために作製され、精製ツールとしては用いられなかったことから、それらは「立体バリエーション」に分類される。1つの態様において、第1のFcポリペプチドは、変異D221E/P228E/L368Eを含み得る、第2のFcポリペプチドは、変異D221R/P228R/K409Rを含み得る。別の態様において、第1のFcポリペプチドは、変異C220E/P228E/368Eを含み得、第2のFcポリペプチドは、変異C220R/E224R/P228R/K409Rを含み得る。

【0364】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体化は、pIバリエーションによって促進することができる。いくつかの局面において、pIバリエーションは、タンパク質のpIを増加させる(塩基性変化)ものを含み得る。他の局面において、pIバリエーションは、タンパク質のpIを減少させる(酸性変化)ものを含み得る。いくつかの場合において、これらのバリエーションの全ての組み合わせを行うことができ、これらには、一方のFcポリペプチドが、野生型、または野生型と有意に異なるpIを示さないバリエーションであってもよく、もう一方のFcポリペプチドがより塩基性またはより酸性のいずれかであり得る、組み合わせが含まれる。あるいは、各Fcポリペプチドは、一方がより塩基性および一方がより酸性に変化され得る。いくつかの態様において、少なくとも1つのFcポリペプチドは、変異Q295E/N384

D/Q418E/N421Dを含む、負のpIバリエーションFcである。

【0365】

いくつかの態様において、立体ヘテロ二量体化バリエーション（例えば、ノブおよびホール）とpIまたは電荷対バリエーションとの組み合わせを用いることができる。

【0366】

特定の態様において、提供される構築物は、（a）非対称バリエーションS364K/E357Qを含む第1のFcポリペプチド；ならびにb）非対称バリエーションL368D/K370SおよびpIバリエーションN208D/Q295E/N384D/Q418E/N421Dを含む第2のFcポリペプチドを含む。いくつかの態様において、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドの一方または両方は、Fcエフェクター活性を低下させる変異、例えば、例示的な変異E233P/L234V/L235A/G236del/S267Kをさらに含むことができる。Fcヘテロ二量体化を媒介できるそのような第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドの例は、SEQ ID NO：338および339に記載の配列を含む。第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドは、構築物のいずれかのポリペプチド鎖にフォーマットされ得る。

【0367】

結果として生じる制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、任意の適切な方法によって、例えば、プロテインAまたはプロテインGカラム上でのアフィニティクロマトグラフィーなどによって精製することができる。異なるポリペプチドをコードする2種類の核酸分子が細胞内で形質転換されている場合、ホモおよびヘテロ二量体の形成が生じる。発現のための条件は、ヘテロ二量体形成がホモ二量体形成より有利になるように調整することができる。

【0368】

親和性試薬に対するヘテロ二量体の異なる親和性に基づきホモ二量体からヘテロ二量体を回収するための技術は公知である。いくつかの局面において、そのような技術は、Fcポリペプチド鎖の一方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を含む。いくつかの場合において、ポリペプチド鎖の一方は、Fcヘテロ二量体のポリペプチドの一方においてプロテインA試薬に対する親和性を抑制または低下させる1つまたは複数のアミノ酸の置換を含み得る、例えば、WO2017134440、WO2010151792、Jendeberg et al. (Jendeberg et al., (1997) J. Immunol. Methods, 201(1): 25-34を参照。これらの態様のいくつかにおいて、Fc領域は、プロテインA結合を妨げ、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が可能になるように、ヘテロ二量体の一方のメンバー上のプロテインA結合部位で改変され得る。この結合部位内の例示的な改変は、Ile253、例えばIle253Arg (I253R)である。いくつかの態様において、改変はH435RまたはH435R/Y436Fであり得る。いくつかの態様において、Fcヘテロ二量体のFcポリペプチドは、プロテインAに結合可能であるが、プロテインGには結合しないように（pA+/pG-）、改変を含むことができる。例示的なpA+/pG-アミノ酸改変は、ヒトIgG1を基準にして428位にセリン、434位にセリン、および任意で436位にヒスチジンを含むか、またはヒトIgG 2、3、または4における対応する位置にこれらの残基を含む、Fcを含む。いくつかの局面において、一方のIgG Fcポリペプチドにおける428位、434位、および任意で436位でのそのようなアミノ酸改変は、プロテインGの結合を低下または抑制し、タンパク質の精製を増強する。

【0369】

いくつかの態様において、親和性試薬に対して異なる親和性を付与するそのような改変のいずれかは、上記に記載される1つまたは複数の他のアミノ酸改変のいずれかと組み合わせることができる。例えば、I253R改変は、T366S/L368A/Y407V改変またはT366W改変のいずれかと組み合わせられ得る。T366S/L368A/Y407V改変Fcは、T336W改変のFc場合と同様に、二量体化界面の立体的閉鎖状態が存在しないことから、ホモ二量体を形成することが可能である。したがって、いくつかの態様において、I253R改変は、形成されている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、T366S/L368A/Y407V改変Fcと組み合わせられる。同様の改変は、T366S/L368A/Y407Vおよび

H453Rを組み合わせることによって利用され得る。

【0370】

いくつかの態様において、ヘテロ二量体分子のFc領域は、例えば上記に記載されているいずれかなど、1つまたは複数の他のFc変異を追加的に含み得る。いくつかの態様において、ヘテロ二量体分子は、エフェクター機能を低下させる変異を有するFc領域を含む。いくつかの態様において、Fc領域は、例えば、低下されたFc受容体結合を介して、例えば、Fc R結合に結合するが一般にFcRn結合しない結合を介して、低下されたFc媒介エフェクター機能をもたらすように変更される。

【0371】

いくつかの態様において、Fc領域は、Fc受容体結合を低下させるために以下の位置：Glu233 (E233)、Leu234 (L234)、またはLeu235 (L235) の1つまたは複数において変異される。1つまたは複数の変異は、E233P、L234V、および/またはL235Aを含み得る。

【0372】

特定の態様において、例えば、Fc RへのFc受容体結合の低下を介する、Fcエフェクター機能を低下させるためのFc領域の変異は、G236R/L328R、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K、E233P/L234V/L235A/G236del/S239K/A327G、E233P/L234V/L235A/G236del/S267K/A327G、E233P/L234V/L235A/G236del、D265A/P329A、D265A/P329G、D265A/N297A、L234V/L235A/D265A、L234V/L235A/N297A、L234V/L235A/P329A、またはL234V/L235A/P329Gのいずれかの中からの変異を含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO：328 (例えば、SEQ ID NO：103または107)、334 (例えば、SEQ ID NO：115または117) のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcのもう一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO：329 (例えば、SEQ ID NO：104または108)、332 (例えば、SEQ ID NO：111または113)、336 (例えば、SEQ ID NO：119または121) のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO：330 (例えば、SEQ ID NO：105または109)、335 (例えば、SEQ ID NO：116または118) のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcのもう一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO：331 (例えば、SEQ ID NO：106または110)、333 (例えば、SEQ ID NO：112または114)、337 (例えば、SEQ ID NO：120または122) のいずれかに記載のアミノ酸の配列を含む。

【0373】

いくつかの態様において、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つまたは複数のエフェクター機能を示す。いくつかの場合において、Fc領域は、Fc媒介エフェクター機能、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などをもたらすことができる。一般に、Fc領域は、免疫グロブリンの主な機能である、抗原結合能に加えて、補体依存性細胞傷害 (CDC) および抗体依存性細胞傷害 (ADCC) などのエフェクター機能を担う。加えて、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りインビボ半減期を増加させることによって、血清中のIgGレベルを調節する役割を果たす。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んでいるいくつかの態様において、リンカーの切断は、それぞれが生物学的活性を有する2つの構成成分：T細胞上のCD3に結合およびエンゲージできるCD3結合領域であって、いくつかの局面において、T細胞上に共刺激シグナルを誘導するためのCRBRおよび/またはT細胞上に阻害性シグナルを誘導するためのIRBRも含み得る、CD3結合領域；ならびに標的特定のエフェクター機能を示し得る5T4 VHHドメインに連結されたFc領域を生成し得る。本明細書において提供される特定の態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、切断不可能なリンカーを含み、いくつかの局面において、非依存性Fc媒介エフェクター機能を示さない場合がある。

【0374】

いくつかの態様において、Fc領域は、1つまたは複数のエフェクター機能を変更するように変異または改変されるFcポリペプチドを含む。したがって、いくつかの場合において、エフェクター機能、例えば、ADCC、ADCP、および/またはCDCの1つまたは複数は、提供される制約付き多重特異性ポリペプチド構築物による使用のためのFcにおいて、変更され得る、例えば、低下または増強され得る。エフェクター機能を低下させる例示的な変異には、上記に記載されるいずれかが含まれる。

【0375】

いくつかの態様において、IgG1 Fcポリペプチドまたはそのバリエーション、例えば下記に記載されるいずれかは、G1 m1またはG1 m3アロタイプで作製することができる。いくつかの態様において、Fc領域は、ヒトG1 m1アロタイプのアミノ酸、例えば、SEQ ID NO: 8などに記載の356位および358位にAsp (D) およびLeu (L) を含む残基を含むことができる。いくつかの場合において、Fcポリペプチドは、アロタイプG1 m1の残基を再構成するために、アミノ酸置換E356DおよびM358Lを含むことができる。他の態様において、Fc領域は、ヒトG1 m3アロタイプのアミノ酸、例えば、SEQ ID NO: 338および339などに記載される、EUナンバリングによる356位および358位に残基 Glu (E) およびMet (M) などを含むことができる。いくつかの場合において、Fcポリペプチドは、アロタイプG1 m3の残基を再構成するために、アミノ酸置換D356EおよびL358Mを含むことができる。

【0376】

c. CD3結合ドメイン

制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、抗CD3結合ドメインの1つまたは複数のコピーを含む。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エンゲージメントを介してT細胞を活性化する。好ましい態様において、本開示の抗CD3結合ドメインは、CD3 としても公知のCD3の 鎖に特異的に結合する。本開示の抗CD3 結合ドメインは、T細胞上のCD3 のエンゲージメントを介して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T細胞活性化をアゴナイズ、刺激、活性化、および/または他の方法で増強する。CD3の生物学的活性は、例えば、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によるT細胞活性化および他のシグナル伝達を含む。例えば、本開示の抗CD3結合ドメインは、CD3媒介T細胞活性化を部分的にまたは完全に調節する、例えば、アゴナイズ、刺激、活性化、または他の方法で増強することによって、T細胞上のCD3 のエンゲージメントを介してT細胞を完全にまたは部分的に活性化する。

【0377】

CD3結合ドメインは、上記に記載されるいずれかであり得る。特定の態様において、CD3結合ドメインは、CD3 に結合するFv抗体断片 (本明細書において抗CD3 Fv断片と呼ばれる) である。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、抗CD3結合ドメインは、CD3への結合について一価である。

【0378】

いくつかの態様において、CD3結合領域は、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) を含むFv抗体断片、例えば記載されるいずれかである。そのような態様の局面において、免疫グロブリンFc領域は、Fcヘテロ二量体の両ポリペプチド間でのヘテロ二量体会合を可能にする2つの異なるFcポリペプチドを含むヘテロ二量体Fc領域、例えば記載されるいずれかである。そのような態様において、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の相対する鎖に連結される。

【0379】

いくつかの態様において、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 (WO2

10

20

30

40

50

015001085)である。

【0380】

いくつかの態様において、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、たとえばdsFv断片である。いくつかの態様において、CD3結合ドメインは、その中に、

少なくともアミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO: 29)を含むVH CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列

RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30)

を含むVH CDR2配列；

10

少なくともアミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

を含むVH CDR3配列；

少なくともアミノ酸配列

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

を含むVL CDR1配列；

少なくともアミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 33)を含むVL CDR2配列；および

少なくともアミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 34)を含むVL CDR3配列

20

が含まれる、FvまたはdsFv断片である。

【0381】

いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、

アミノ酸配列TYAMN (SEQ ID NO: 29)に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを上回る同一性を有するVH CDR1配列；

アミノ酸配列

RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 30)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを上回る同一性を有するVH CDR2配列；

30

アミノ酸配列

HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを上回る同一性を有するVH CDR3配列；

アミノ酸配列

RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを上回る同一性を有するVL CDR1配列；

40

アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 33)に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを上回る同一性を有するVL CDR2配列；および

アミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 34)に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれを上回る同一性を有するVL CDR3配列

を含む。

【0382】

いくつかの態様において、抗CD3 結合ドメインは、

50

少なくともアミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 350) を含むVH CDR1配列;
 少なくともアミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 351) を含むVH CDR2配列;
 少なくともアミノ酸配列
 HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:31)

を含むVH CDR3配列;
 少なくともアミノ酸配列
 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

を含むVL CDR1配列;
 少なくともアミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 33) を含むVL CDR2配列; および
 少なくともアミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 34) を含むVL CDR3配列
 を含む。

【0383】

いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、アミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 350) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR1配列;アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 351) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR2配列;
 アミノ酸配列
 HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR3配列、アミノ酸配列
 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 32)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR1配列;アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 33) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR2配列;およびアミノ酸配列ALWYSNLWV (SEQ ID NO: 34) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR3配列を含む。

【0384】

いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、少なくともアミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 350) を含むVH CDR1配列;少なくともアミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 351) を含むVH CDR2配列;少なくともアミノ酸配列
 HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

を含むVH CDR3配列、少なくともアミノ酸配列
 GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 357)

を含むVL CDR1配列;少なくともアミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 33) を含むVL CDR2配列;および少なくともアミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 353) を含むVL CDR3配列を含む。

【0385】

いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、アミノ酸配列GFTFNTYAMN (SEQ ID NO: 350) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR1配列;アミノ酸配列RIRSKYNNYATY (SEQ ID NO: 351) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、

10

20

30

40

50

95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR2配列;
アミノ酸配列
HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 31)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%
、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR3配列、アミノ酸配列
GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 357)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%
、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR1配列;アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID
NO: 33) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、9
8%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR2配列;およびアミノ酸配列AL
WYSNHWV (SEQ ID NO: 353) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%
、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR3配列
を含む。

【0386】

いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、少なくともアミノ酸配列GFTFSTYAM
N (SEQ ID NO: 355) を含むVH CDR1配列;少なくともアミノ酸配列RIRSKYNNYA
TY (SEQ ID NO: 356) を含むVH CDR2配列;少なくともアミノ酸配列
HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 352)

を含むVH CDR3配列、少なくともアミノ酸配列
GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 357)

を含むVL CDR1配列;少なくともアミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID NO: 33) を含むV
L CDR2配列;および少なくともアミノ酸配列ALWYSNHWV (SEQ ID NO: 353) を含
むVL CDR3配列を含む。

【0387】

いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、アミノ酸配列GFTFSTYAMN (SEQ ID
NO: 355) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、
98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR1配列;アミノ酸配列RIRSKY
NNYATY (SEQ ID NO: 356) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、
95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR2配列;
アミノ酸配列
HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 352)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%
、またはそれを上回る同一性を有するVH CDR3配列、アミノ酸配列
GSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 357)

に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%
、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR1配列;アミノ酸配列GTNKRAP (SEQ ID
NO: 33) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、9
8%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR2配列;およびアミノ酸配列AL
WYSNHWV (SEQ ID NO: 353) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%
、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するVL CDR3配列
を含む。

【0388】

いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、少なくともアミノ酸VLWYSNRWV (S
EQ ID NO: 354) を含むCDR3を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは

、アミノ酸VLWYSNRWV (SEQ ID NO: 354) に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するCDR3を含む。

【0389】

いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数のコピーを含む。いくつかの態様では、抗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断片と呼ばれる）を含む。いくつかの態様では、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。いくつかの態様では、抗CD3結合ドメインは、一価で、CD3に結合する。 10

【0390】

いくつかの態様では、CD3結合領域は一本鎖抗体ではない。たとえば、いくつかの局面では、CD3結合領域は一本鎖可変断片（scFv）ではない。

【0391】

いくつかの態様では、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。そのような態様の局面では、免疫グロブリンFc領域は、セクションIII.C.2.bに記載されるいずれかなどの、Fcヘテロ二量体の両ポリペプチド間のヘテロ二量体会合能のある、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。そのような態様では、CD3結合領域の可変重鎖（VH）と可変軽鎖（VL）とは、ヘテロ二量体Fcの相対する鎖上で連結されている。 20

【0392】

いくつかの態様では、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断片である。いくつかの態様では、その抗CD3結合ドメインは、SEQ ID NO: 27~28、35~84、293、340~343、および358からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む、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断片である。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27~28、35~84、293、340~343、および358からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む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断片である。 30

【0393】

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27、35~65、341、343、および358の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO: 28、66~84、293、340、および342からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27、35~65、341、343、および358からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO: 28、66~84、293、340、および342からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。 40

【0394】

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27~28、35~84、293、340~343、および358の群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域アミノ酸配列と軽鎖可変領域アミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27、35~65、341、343、および358の群より選択される重鎖可変領域アミノ酸配列と、SEQ ID NO: 28、66~84、293、340、および342の群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域アミノ酸配列と 50

の組み合わせを含む。いくつかの態様では、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO: 27、35～65、341、343、および358の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO: 28、66～84、293、340、342からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様では、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO: 27、35～65、341、343、358、388、389、392、393の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO: 28、66～84、293、340、342、390、391、394、395からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む。

【0395】

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 28のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO: 28のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 28のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO: 28のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

【0396】

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 341のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 342のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 341のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO: 342のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 341のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 342のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 341のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO: 342のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

【0397】

特定の態様では、Fvは、そのVH-VLヘテロ二量体が鎖間ジスルフィド結合により安定している、ジスルフィド安定化Fv断片（dsFv）である。いくつかの態様では、鎖間ジスルフィド結合は、VHおよび/またはVL鎖のフレームワーク位置における位置の変異により操作されている。いくつかの態様では、ジスルフィド安定化抗CD3 Fvは、Kabatナンバリングによる44のCysへの変異を有する抗CD3 VH、および100のCysへの変異を有する抗CD3 VLを含む。たとえば、いくつかの態様では、それぞれKabatナンバリングにより、VH鎖は変異G44Cを含有し、VL鎖は変異G100Cを含有する。いくつかの態様では、ジスルフィド安定化抗CD3 Fvは、Kabatナンバリングによる、位置105のCysへの

変異を有する抗CD3 VH、および位置43のCysへの変異を有する抗CD3 VLを含む。

【0398】

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 35~65の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66~84、293からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列を含む、dsFv断片などのFvである。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 35~65からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する重鎖可変アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66~84、293のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む、dsFv断片などのFvである。いくつかの態様では、抗CD3結合ドメインは、FvまたはdsFvであって、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列を含む可変重鎖(VH)、およびSEQ ID NO: 293のアミノ酸配列を含む可変軽鎖(VL)を含有する。

10

【0399】

いくつかの態様では、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断片である。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27~28、35~84、293、340~343、および358からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む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断片である。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27~28、35~84、293、340~343、および358からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む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断片である。

20

【0400】

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27、35~65、341、343、および358の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO: 28、66~84、293、340、および342からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27、35~65、341、343、および358からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO: 28、66~84、293、340、および342からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含むFv断片である。

30

【0401】

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27~28、35~84、293、340~343、および358の群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域アミノ酸配列と軽鎖可変領域アミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27、35~65、341、343、および358の群より選択される重鎖可変領域アミノ酸配列と、SEQ ID NO: 28、66~84、293、340、および342の群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域アミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様では、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO: 27、35~65、341、343、および358の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO: 28、66~84、293、340、342からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む。

40

【0402】

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖(VH)を含む。いくつ

50

かの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 28のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO: 28のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 28のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 27のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO: 28のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

10

【0403】

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 341のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 342のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 341のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO: 342のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 341のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 342のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 341のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO: 342のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。

20

30

【0404】

特定の態様では、Fvは、そのV_H-V_Lヘテロ二量体が鎖間ジスルフィド結合により安定している、ジスルフィド安定化Fv断片（dsFv）である。いくつかの態様では、鎖間ジスルフィド結合は、VHおよび/またはVL鎖のフレームワーク位置における位置の変異により操作されている。いくつかの態様では、ジスルフィド安定化抗CD3 Fvは、Kabatナンバリングによる44のCysへの変異を有する抗CD3 VH、および100のCysへの変異を有する抗CD3 VLを含む。たとえば、いくつかの態様では、それぞれKabatナンバリングにより、VH鎖は変異G44Cを含有し、VL鎖は変異G100Cを含有する。いくつかの態様では、ジスルフィド安定化抗CD3 Fvは、Kabatナンバリングによる、位置105のCysへの変異を有する抗CD3 VH、および位置43のCysへの変異を有する抗CD3 VLを含む。

40

【0405】

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 67、75、77、79、81~84、293、および340からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域アミノ酸配列と軽鎖可変領域アミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 47、52~65、67、75、77、79、81~84、293、340、343、および358の群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域アミノ酸配列と軽鎖可変領域アミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様では、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO: 47、および52~65、343、および358からなる群より選択される軽鎖可変アミノ

50

酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有する重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO: 67、75、77、79、81~84、293、および340からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列との組み合わせを含む。いくつかの態様では、抗CD3 Fv抗体断片は、SEQ ID NO: 47、52~65、343、および358の群より選択される重鎖可変アミノ酸配列と、SEQ ID NO: 67、75、77、79、81~84、293、および340からなる群より選択される軽鎖可変アミノ酸配列との組み合わせを含む。いずれかのそのような態様のいくつかでは、抗CD3 Fvは、それぞれKabatナンバリングによる、変異G44Cを含有するVH鎖および変異G100Cを含有するVL鎖を有するds Fvである。

10

【0406】

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 75のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO: 75のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 75のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO: 75のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いずれかのそのような態様のいくつかでは、抗CD3 Fvは、それぞれKabatナンバリングによる、変異G44Cを含有するVH鎖および変異G100Cを含有するVL鎖を有するdsFvである。

20

30

【0407】

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 343のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 340のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 343のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO: 340のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 343のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 340のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 343のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO: 340のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いずれかのそのような態様のいくつかでは、抗CD3 Fvは、それぞれKabatナンバリングによる、変異G44Cを含有するVH鎖および変異G100Cを含有するVL鎖を有するdsFvである。

40

【0408】

50

いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 358のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 340のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 358のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）、およびSEQ ID NO: 340のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれを上回る同一性を有するアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 358のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）を含む。いくつかの態様では、抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 340のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いくつかの態様では、その抗CD3 結合ドメインは、SEQ ID NO: 358のアミノ酸配列を含む可変重鎖（VH）およびSEQ ID NO: 340のアミノ酸配列を含む可変軽鎖（VL）を含む。いずれかのそのような態様のいくつかでは、抗CD3 Fvは、それぞれKabatナンバリングによる、変異G44Cを含有するVH鎖および変異G100Cを含有するVL鎖を有するdsFvである。

10

【0409】

d. リンカー

20

制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、免疫グロブリンFc領域を含む第1の構成成分と、CD3結合領域を含む第2の構成成分とを、連結または共役させるリンカーを含む。いくつかの態様において、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づけられる。提供される制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、第1のおよび第2の構成成分を共に形成する第1のおよび第2のポリペプチドを含む多量体、例えば二量体であることから、提供される構築物は、第1のポリペプチドのFc部分とCD3結合領域とを連結するリンカー、ならびに第2のポリペプチドのFc部分とCD3結合領域とを連結するリンカーを含むことが理解される。いくつかの態様において、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、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび第2のポリペプチド中に存在するリンカーは同じである。したがって、いくつかの態様において、CD3結合ドメインの各ドメインは、リンカー、例えば同じリンカーを介して、Fc、例えばヘテロ二量体Fcの相対するポリペプチドに連結される。

30

【0410】

融合タンパク質で用いるためのさまざまなポリペプチドリンカーが公知である（例えば、Chen et al. (2013) Adv. Drug. Deliv. 65:1357-1369；および国際PCT公報第WO 2014/099997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）。

40

【0411】

いくつかの態様において、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領域に連結されると、CD3結合領域が制約付けされ、多重特異性ポリペプチド構築物と細胞との接触時に、細胞、例えばT細胞の表面上でCD3に結合またはエンゲージできないか、または実質的にできないように、選択される。さまざまなアッセイが、多重特異性ポリペプチド構築物によるCD3の結合またはエンゲージメントを評価するために用いることができ、これらには、T細胞結合、レポーター系を用いる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アッセイが含まれる。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、ポリペプチド構築物の正しいフォールディングを確実にし、連結されたポ

50

リペプチドの活性または機能と相反し得る電荷を示さず、または連結されたポリペプチドの活性を妨害または変更し得るドメインの1つまたは複数におけるアミノ酸残基との結合または他の相互作用を形成しない、リンカーでもある。いくつかの態様において、リンカーはポリペプチドリinkerである。ポリペプチドリinker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り得る。いくつかの局面において、リンカーは、短い、中程度の、または長いリンカーである。いくつかの態様において、リンカーは、最大で40アミノ酸の長さまでである。いくつかの態様において、リンカーは、最大で25アミノ酸の長さまでである。いくつかの態様において、リンカーは、少なくとも2アミノ酸の長さであるか、または少なくとも約2アミノ酸の長さである。いくつかの局面において、適切な長さは、例えば、少なくとも1および典型的には約40より少ないアミノ酸残基、例えば、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アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーは、2~24アミノ酸、2~20アミノ酸、2~18アミノ酸、2~14アミノ酸、2~12アミノ酸、2~10アミノ酸、2~8アミノ酸、2~6アミノ酸、6~24アミノ酸、6~20アミノ酸、6~18アミノ酸、6~14アミノ酸、6~12アミノ酸、6~10アミノ酸、6~8アミノ酸、8~24アミノ酸、8~20アミノ酸、8~18アミノ酸、8~14アミノ酸、8~12アミノ酸、8~10アミノ酸、10~24アミノ酸、10~20アミノ酸、10~18アミノ酸、10~14アミノ酸、10~12アミノ酸、12~24アミノ酸、12~20アミノ酸、12~18アミノ酸、12~14アミノ酸、14~24アミノ酸、14~20アミノ酸、14~18アミノ酸、18~24アミノ酸、18~20アミノ酸、もしくは20~24アミノ酸、または約2~24アミノ酸、2~20アミノ酸、2~18アミノ酸、2~14アミノ酸、2~12アミノ酸、2~10アミノ酸、2~8アミノ酸、2~6アミノ酸、6~24アミノ酸、6~20アミノ酸、6~18アミノ酸、6~14アミノ酸、6~12アミノ酸、6~10アミノ酸、6~8アミノ酸、8~24アミノ酸、8~20アミノ酸、8~18アミノ酸、8~14アミノ酸、8~12アミノ酸、8~10アミノ酸、10~24アミノ酸、10~20アミノ酸、10~18アミノ酸、10~14アミノ酸、10~12アミノ酸、12~24アミノ酸、12~20アミノ酸、12~18アミノ酸、12~14アミノ酸、14~24アミノ酸、14~20アミノ酸、14~18アミノ酸、18~24アミノ酸、18~20アミノ酸、もしくは20~24アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20アミノ酸の長さである。

10

20

30

【0412】

ある特定の局面において、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に結合されるとき、リンカーの長さが長いほど、CD3結合がより大きい。したがって、いくつかの局面において、リンカーは、12アミノ酸を上回る長さ、例えば、13、14、15、16、17、または18アミノ酸を上回る長さである。いくつかの態様において、リンカーは、12~40アミノ酸の長さ、12~30アミノ酸、12~24アミノ酸、12~18アミノ酸、12~15アミノ酸、15~40アミノ酸、15~30アミノ酸、15~24アミノ酸、15~18アミノ酸、18~40アミノ酸、18~30アミノ酸、18~24アミノ酸、24~40アミノ酸、24~30アミノ酸、または30~40アミノ酸である。

【0413】

リンカーは、天然に生じる、合成、または両方の組み合わせであり得る。特に適した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)、およびスレオニン(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、少なくとも75%(ペプチドリinker中に存在する残基の総数に基づき計算される)、例えば、少なくとも80%、少なくとも85%、または少なくとも90%の、Gly、Ser、Ala、およびThrから選択されるアミノ酸残基を含み得る。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。いくつかの態様において、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む。いくつかの局面において、適切なペプチドリinkerは典型的には、少なくとも50%グリシン残基、例えば少なくとも75%グリシン残基を含む。いくつかの態様において、ペプチドリinkerはグリシン残基のみを含む。いくつかの態様

40

50

において、ペプチドリinkerはグリシンおよびセリン残基のみを含む。

【0414】

いくつかの態様において、これらのリンカーは、アミノ酸グリシンおよびセリンで主に構成され、本明細書においてGSリンカーとして示される。いくつかの態様において、リンカーは(GGS)_nを含み、nは1~10、例えば1~5、例えば1~3であり、例えば、nが0~10であるGGS(GGS)_n(SEQ ID NO: 363)である。特定の態様において、リンカーは配列(GGGGS)_n(SEQ ID NO: 123)を含み、nは1~10であるか、またはnは1~5、例えば1~3である。さらなる態様において、リンカーは(GGGGS)_n(SEQ ID NO: 124)を含み、nは1~4、例えば1~3である。リンカーは、上記のいずれかの組み合わせを含む可能性があり、例えば、2、3、4、または5つのGS、GGS、GGGS、および/またはGGGGGSリンカーの繰り返しが組み合わされてもよい。いくつかの態様において、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アミノ酸の長さである。

10

【0415】

いくつかの態様では、リンカーは(一文字のアミノ酸コード)：

GGS, GGGGS (SEQ ID

NO: 125), GGGGS (SEQ ID NO: 126), または GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 346)

である。いくつかの態様では、GSリンカーは、

GGSGGS, すなわち, (GGS)₂ (SEQ ID

20

NO: 1); GGSGSGGS, すなわち, (GGS)₃ (SEQ ID NO: 2); GGSGSGSGGS, すなわち, (GGS)₄ (SEQ ID NO: 3);

GGSGSGSGSGGS, すなわち, (GGS)₅ (SEQ ID NO: 4); GGGSGGGSGGGSGGGGS, すなわち, (GSS)₃

(SEQ ID NO: 127), GGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 129) および GGGSGGGSGGGGS

(SEQ ID NO: 128)

のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、リンカーはGGGG (SEQ ID NO: 5) である。いずれかの上記の例のいくつかでは、セリンはアラニンと置換され得る(たとえば(Gly4Ala)または(Gly3Ala))。いくつかの態様では、リンカーはGGGGG (SEQ ID NO: 6) である。いくつかの態様では、リンカーはPGGGG (SEQ ID NO: 327) である。

30

【0416】

いくつかの態様において、リンカーは、アミノ酸配列Gly_xXaa-Gly_y-Xaa-Gly_z (SEQ ID NO: 130) を有するペプチドリinkerを含み、各Xaaは、アラニン(Ala)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile)、メチオニン(Met)、フェニルアラニン(Phe)、トリプトファン(Trp)、プロリン(Pro)、グリシン(Gly)、セリン(Ser)、スレオニン(Thr)、システイン(Cys)、チロシン(Tyr)、アスパラギン(Asn)、グルタミン(Gln)、リジン(Lys)、アルギニン(Arg)、ヒスチジン(His)、アスパラギン酸(Asp)、およびグルタミン酸(Glu)から独立して選択され、かつ、x、y、およびzはそれぞれ、1~5の範囲での整数である。いくつかの態様において、各Xaaは、Ser、Ala、およびThrからなる群より独立して選択される。特定の变化形において、x、y、およびzのそれぞれは、3に相当する(それによって、アミノ酸配列、Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 131) を有するペプチドリinkerがもたらされ、各Xaaは上記のように選択される)。

40

【0417】

いくつかの態様において、リンカーは、(SSSSG)_n (SEQ ID NO: 132) モチーフの反復に基づくセリンリッチなリンカーであり、ここで、nは少なくとも1であるが、yは2、3、4、5、6、7、8、および9であり得る。

【0418】

いくつかの場合において、ペプチドリinker内に一定の剛性をもたらすことが望ましい場合がある。これは、ペプチドリinkerのアミノ酸配列においてプロリン残基を含むことに

50

よって達成され得る。したがって、いくつかの態様において、リンカーは、ペプチドリンカーのアミノ酸配列において少なくとも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し得る。1つの特定の態様において、ペプチドリンカーはプロリン残基のみを含む。

【0419】

いくつかの局面において、ペプチドリンカーは、少なくとも1つのシステイン残基、例えば1つのシステイン残基を含む。例えば、いくつかの態様において、リンカーは、少なくとも1つのシステイン残基、ならびにGly、Ser、Ala、およびThrからなる群より選択されるアミノ酸残基を含む。いくつかのそのような態様において、リンカーは、グリシン残基およびシステイン残基、例えばグリシン残基およびシステイン残基のみを含む。典型的には、ペプチドリンカー当たり1個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としては、アミノ酸配列Gly_m-Cys-Gly_nを有するペプチドリンカーが挙げられ、nおよびmはそれぞれ、1~12、例えば、3~9、4~8、または4~7の整数である。特定の変化形において、そのようなペプチドリンカーは、アミノ酸配列GGGG-C-GGGGG（SEQ ID NO：133）を有する。

【0420】

いくつかの態様において、融合タンパク質のリンカーは、構造化されたまたは制約付きリンカーである。特定の態様において、構造化リンカーは、配列（AP）_nまたは（EAAAK）_n（SEQ ID NO：134）を含み、nは2~20、好ましくは4~10であり、これらに限定されないが、nが2~20、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15である、AS-（AP）_n-GT（SEQ ID NO：135）またはAS-（EAAAK）_n-GT（SEQ ID NO：136）を含む。他の態様において、リンカーは、配列（GGGGA）_n（SEQ ID NO：137）、（PGGGS）_n（SEQ ID NO：138）、（AGGGS）_n（SEQ ID NO：139）、またはGGG-（EGKSSGSGSESKST）_n-GGG（SEQ ID NO：140）、ここでnは2~20である）、（ADAAP）_n（SEQ ID NO：396、ここでnは2~20である）、（ADAAP）_n-G（SEQ ID NO：397、ここでnは2~20である）、（GEPQG）_n（SEQ ID NO：398、ここでnは2~20である）、（GEPQG）_n-G（SEQ ID NO：399、ここでnは2~20である）、（AGGEP）_n（SEQ ID NO：400、ここでnは2~20である）、（AGGEP）_n-G（SEQ ID NO：401、ここでnは2~20である）、（AGSEP）_n（SEQ ID NO：402、ここでnは2~20である）、（AGSEP）_n-G（SEQ ID NO：403、ここでnは2~20である）、（GGGEQ）_n（SEQ ID NO：404、ここでnは2~20である）、または（GGGEQ）_n-G（SEQ ID NO：405、ここでnは2~20である）を含む。いくつかの態様において、リンカーは、SSSASASSA（SEQ ID NO:141）、GSPGSPG（SEQ ID

NO:142）、ATTTGSSPGPT（SEQ ID NO:143）、ADAAPADAAPG（SEQ ID NO:406）、GEPQGGEPQGG（SEQ ID NO:407）、AGGEPAGGEPG（SEQ ID NO:408）、AGSEPAGSEPG（SEQ ID NO:409）、またはGGGEQGGGEQG（SEQ ID NO:410）

である。いくつかの態様において、そのようなリンカーは、それらの構造のために、タンパク質分解に対する耐性が増しており、それによって、インビボでの注入のときに利点をもたらす得る。いくつかの態様において、そのようなリンカーは、負に荷電しており、CD3に対するCD3結合ドメインの結合を弱めるのにより適している可能性がある。

【0421】

いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、リンカーは、プロテアーゼによって切断可能ではない。いくつかの態様において、切断可能なリンカーではない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、インビボ送達または組換え産生に対して概して安定であるリンカーである。いくつかの局面において、プロテアーゼによって切断可能では

ないリンカーとしては、切断可能なペプチド配列またはプロテアーゼの認識部位内に好ましくは位置する少なくとも1つのペプチド結合を含まないものが挙げられる。特定の態様において、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、同じプロテアーゼの基質認識部位を含むリンカーと比較して、プロテアーゼによって優先的にまたは特異的に切断されない。

【0422】

いくつかの態様において、リンカーは、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、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まない。典型的には、例えば、セリンプロテアーゼでは、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ており、ここで、切断はP1位置の後で生じる。典型的には、セリンプロテアーゼの切断配列は、6残基長であり、多数のプロテアーゼの拡張された基質特異性と適合するが、プロテアーゼに応じてより長くまたはより短くすることができる。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' 切断可能結合配列を含まない。いくつかの局面において、切断不可能なリンカー、またはプロテアーゼによって切断のために特異的に認識される基質認識部位を含まないリンカーは、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を実質的に下回るものである。

【0423】

いくつかの態様において、リンカーは切断可能なリンカーである。いくつかの局面において、切断可能なリンカーは、生理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となる配列をさらに含むリンカー、例えば、上記に記載されるいずれかである。いくつかの場合において、切断可能なリンカーは、インビボでの細胞環境中に存在するものを含む、インビボで存在する特定の条件下で、例えば、細胞外プロテアーゼへの曝露後に、切断に対して感受性または感応性である。いくつかの場合において、プロテアーゼは、特定の生理的微小環境、例えば腫瘍微小環境中に存在してもよく、それによって、切断が生じ得る部位を制限する。

【0424】

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して特異性または優先度を示す。そのような特異性の程度は、その基質に対するプロテアーゼの優先度および酵素の効率の尺度である、配列（例えばリンカー）の切断の速度定数に基づき決定することができる。さまざまな濃度の基質の存在下での経時的な切断の増加の速度を決定する任意の方法が、特異性定数を計算するために用いることができる。例えば、基質は、蛍光発生部分に連結され、プロテアーゼによる切断時に遊離される。異なるプロテアーゼ濃度での切断の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 ）を、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することができる。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、およそ少なくとも $1 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、または少なくとも $5 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ またはそれを上回る速度でプロテアーゼによって特異的に切断され得るリンカーである。

【0425】

いくつかの態様において、本開示の制約付き多重特異性ポリペプチド構築物は、第1のおよび第2の構成成分を連結する切断可能なリンカーを含む。いくつかの態様において、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に対する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位置する少なくとも1つのペプチド結合を含む切断配列を含み得る。適切なプロテアーゼとしては、例えば、関節リウマチまたはがんなどの疾患において増強された形で形成または活性化され、過剰な組織の分解、炎症、および転移をもたらす、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る。特定の態様において、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細胞またはNK細胞

10

20

30

40

50

）、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。いくつかの態様において、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。

【0426】

切断可能なリンカーは、標的を発現する細胞に近接している腫瘍によって産生されるプロテアーゼ、および/または多重特異性ポリペプチド構築物の目的とする標的と組織中で共存してい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得る。文献において、複数のがん、例えば、固形腫瘍において公知の基質を有するプロテアーゼのレベルの増加の報告が存在する。例えば、La Rocca et al, (2004) British J. of Cancer 90(7): 1414-1421を参照。

10

【0427】

いくつかの態様において、制約付き多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび第2の構成成分を連結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、エフェクターを可能にするまたはエフェクターが増強されたIgG Fc領域を包含する多重特異性ポリペプチド構築物は、標的抗原とエンゲージするとADCCを誘発することができる。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。放出されると、グランザイムBは、パーフォリン依存的に標的細胞に侵入し、そこでアポトーシスを媒介する。重要なことには、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。いくつかの態様において、第1のおよび第2の構成成分多重特異性ポリペプチド構築物を連結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時に放出される。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物によるTAAの結合時のCD3エンゲージメントによるT細胞の活性化は、そのようなプロテアーゼを放出する可能性があり、次いで、特異的な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または増加し、CD3をエンゲージできる。いくつかの態様において、切断は、未切断状態でTAAに結合し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することができる。

20

30

【0428】

例示的な基質としては、これらに限定されないが、以下の酵素またはプロテアーゼ：ADAMS、ADAMTS、例えば、ADAM8；ADAM9；ADAM10；ADAM12；ADAM15；ADAM17/TACE；ADAMDEC1；ADAMTS1；ADAMTS4；ADAMTS5；アスパラギン酸プロテアーゼ、例えば、BACEまたはレニン；アスパラギン酸カテプシン、例えば、カテプシンD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；システインプロテイナーゼ、例えば、クルジパイン（Cruzipain）；レグマイン；オツバイン（Otubain）-2；KLK、例えば、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、またはKLK14；メタロプロテイナーゼ、例えば、メブリン；ネプリライシン；PSMA；BMP-1；MMP、例えば、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、またはMMP27、セリンプロテアーゼ、例えば、活性化プロテインC、カテプシンA、カテプシンG、キマーゼ、凝固因子プロテアーゼ（例えば、FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa）、エラスターゼ、グランザイムB、グアニジノベンゾアターゼ、HtrA1、ヒト好中球エラスターゼ、ラクトフェリン、マラプシン（Marapsin）、NS3/4A、P

40

50

ACE4、プラスミン、PSA、tPA、トロンピン、トリプターゼ、uPA；II型膜貫通セリンプロテアーゼ（TTSP）、例えば、DESC1、DPP-4、FAP、ヘプシン、マトリプターゼ-2、マトリプターゼ、TMPRSS2、TMPRSS3、またはTMPRSS4；およびそれらの任意の組み合わせの1つまたは複数によって切断可能な基質が挙げられる。

【0429】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、複数のプロテアーゼ、例えば、2以上のプロテアーゼ、3以上のプロテアーゼ、および4以上のプロテアーゼ等によって切断される。

【0430】

いくつかの態様において、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している腫瘍によって産生される、および/または多重特異性ポリペプチド構築物の標的と共存している腫瘍によって産生されることが公知であるプロテアーゼによる使用のために選択される。

【0431】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、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、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む。典型的には、例えば、セリンプロテアーゼでは、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ており、ここで、切断はP1位置の後で生じる。典型的には、セリンプロテアーゼの切断配列は、6残基長であり、多数のプロテアーゼの拡張された基質特異性と適合するが、プロテアーゼに応じてより長くまたはより短くすることができる。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' 切断可能結合配列を含む。いくつかの局面において、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することができるペプチド結合を導入するように操作される。

【0432】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、2以上の基質配列の組み合わせを含む。いくつかの態様において、各基質配列は同じプロテアーゼによって切断される。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、グランザイムBが切断可能なリンカーは、一般式 P4 P3 P2 P1 P1' (SEQ ID NO: 144) を有するアミノ酸配列を含み、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；かつP1'はアミノ酸I、L、Y、M、F、V、T、S、GまたはAである。いくつかの態様において、グランザイムBが切断可能なリンカーは、一般式 P4 P3 P2 P1 P1' (SEQ ID NO: 145) を有するアミノ酸配列を含み、P4はアミノ酸IまたはLであり；P3はアミノ酸Eであり；P2はアミノ酸PまたはAであり；P1はアミノ酸Dであり；かつP1'はアミノ酸I、V、T、S、またはGである。

【0433】

いくつかの態様において、グランザイムBの基質は、アミノ酸配列LEAD (SEQ ID NO: 146)、LEPD (SEQ ID NO: 147)、またはLEAE (SEQ ID NO: 148)を含む。いくつかの態様において、切断可能なリンカーはアミノ酸配列を含み、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列

IEPDI (SEQ ID NO:149), LEPDG (SEQ ID NO:150), LEADT (SEQ ID NO:151),

IEPDG (SEQ ID NO:152), IEPDV (SEQ ID NO:153), IEPDS (SEQ ID NO:154), IEPDT (SEQ ID

NO:155), IEPDP (SEQ ID NO:361), IEPDG (SEQ ID NO:152) または LEADG (例えば SEQ ID NO:144)

を含む。

【 0 4 3 4 】

いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、配列 P1QAR (A/V) (SEQ ID NO: 156) を含み、P1は任意のアミノ酸である。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、配列 RQAR (A/V) (SEQ ID NO: 157) を含み。いくつかの態様において、マトリプターゼの基質は、アミノ酸配列 RQAR (SEQ ID NO: 158) を含む。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列 RQARV (SEQ ID NO: 159) を含む。

【 0 4 3 5 】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、1つまたは複数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。いくつかの態様において、MMPはMMP-2である。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、一般式 P3 P2 P1 P1' (SEQ ID NO: 160) を含み、P3はP、VまたはAであり；P2はQまたはDであり；P1はAまたはNであり；かつP1'はL、IまたはMである。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、一般式 P3 P2 P1 P1' (SEQ ID NO: 161) を含み、P3はPであり；P2はQまたはDであり；P1はAまたはNであり；かつP1'はLまたはIである。いくつかの態様において、MMPの基質はアミノ酸配列 PAGL (SEQ ID NO: 162) を含む。

【 0 4 3 6 】

いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列 LEAD (SEQ ID NO: 146) とアミノ酸配列 RQAR (SEQ ID NO: 158) との組み合わせを含む。

【 0 4 3 7 】

いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列 LEAD (SEQ ID NO: 146) とアミノ酸配列 PAGL (SEQ ID NO: 162) との組み合わせを含む。

【 0 4 3 8 】

いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列 RQAR (SEQ ID NO: 158) とアミノ酸配列 PAGL (SEQ ID NO: 162) との組み合わせを含む。

【 0 4 3 9 】

いくつかの態様において、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列との組み合わせを含む。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、アミノ酸配列 LEAD (SEQ ID NO: 146) と、アミノ酸配列 RQAR (SEQ ID NO: 158) と、アミノ酸配列 PAGL (SEQ ID NO: 162) との組み合わせを含む。

【 0 4 4 0 】

切断可能なリンカーには、任意の公知のリンカーが含まれ得る。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US20160194399号；同第US20150079088号；同第US20170204139号；同第US20160289324号；同第US20160122425号；同第US20150087810号；同第US20170081397号；米国特許第US9644016号に記載される。

【 0 4 4 1 】

いくつかの態様において、切断可能なリンカーは、

10

20

30

40

TGLEADGSPAGLGRQARVG (SEQ ID NO: 163);
 TGLEADGSRQARVGPAGLG (SEQ ID NO: 164); TGSPAGLEADGSRQARVGS (SEQ ID NO: 162);
 TGPAGLGLLEADGSRQARVG (SEQ ID NO: 166); TGRQARVGLLEADGSPAGLG (SEQ ID NO: 167);
 TGSRQARVGPAGLEADGS (SEQ ID NO: 168); および TGPAGLGSRQARVGLLEADGS (SEQ ID
 NO:169); GPAGLGLLEPDGSRQARVG (SEQ ID NO: 170); GSGGGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO:
 171); GSGGGGGLEADTGGSGGS (SEQ ID NO: 172); GSIEPDIGS (SEQ ID NO: 173); GSLEADTGS
 (SEQ ID NO: 174); GSGGGGGIEPDGGSGGS (SEQ ID NO: 175); GSGGGGGIEPDVGGSGGS
 (SEQ ID NO: 176); GSGGGGGIEPDSGGSGGS (SEQ ID NO: 177); GSGGGGGIEPDTGGSGGS (SEQ
 ID NO: 178); GGSLEPDGSGS (SEQ ID NO: 179); および GPAGLGLLEADGSRQARVG (SEQ ID NO:
 180), GGEGGGSGSGSGGS (SEQ ID NO: 181); GSSAGSEAGSGGQAGVGS (SEQ ID NO: 182);
 GSGGGGGLEAEGSGGGGS (SEQ ID NO: 183); GSGGGGGIEPDPGSGGS (SEQ ID NO: 184);
 TGGSGGGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO: 185)

10

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 4 4 2 】

e . 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つまたは複数の共刺激受容体結合領域 (CRBR) を含む。いくつかの態様において、提供される多重特異性ポリペプチド構築物の1つまたは複数のCRBRは、T細胞上に発現している共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、共刺激受容体は、活性化T細胞の表面上で上方制御、誘導、または発現される。いくつかの局面において、CRBRは、共刺激受容体に結合し、共刺激受容体を刺激する。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチドのCRBRに対する共刺激受容体のアゴニスト結合は、T細胞において下流シグナル伝達を誘導し、CD3のエンゲージメント後にT細胞活性化または機能性を増強または亢進する。いくつかの態様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々は、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 (Anticalin) (操作されたりボカリン)、ダルピン (Darpin)、フィノマー (Fynomer)、センチリン (Centyrin) (操作されたフィブロネクチン (fibronectin) IIIドメイン)、シスチンノットドメイン、アフィリン (Affilin)、アフィボディ (Affibody)、または操作されたCH3ドメインである。

20

30

【 0 4 4 3 】

いくつかの態様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々、例えば、第1のCRBRおよび第2のCRBRは、抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数のコピーを含む。いくつかの態様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々、例えば、第1の抗原結合ドメインおよび第2のCRBRは、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数のコピーを含む。

【 0 4 4 4 】

いくつかの態様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々、例えば、第1のCRBRおよび第2のCRBRは、一本鎖抗体である。いくつかの例において、一本鎖は、scFv、scAb、シングルドメイン重鎖抗体、またはシングルドメイン軽鎖抗体である。

40

【 0 4 4 5 】

いくつかの態様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々、例えば、第1のCRBRおよび第2のCRBRは、1つまたは複数のシングルドメイン抗体 (sdAb) 断片、例えば V_HH、V_{NAR}、操作されたV_HまたはV_Kドメインを含む。V_HHは、天然のラクダ科の動物の重鎖のみの抗体、重鎖のみの抗体を生成する遺伝子改変げっ歯類、またはナイーブな/合成のラクダ科もしくはヒト化されたラクダ科の動物のシングルドメイン抗体ライブラリーから作製することができる。V_{NAR}は、軟骨魚類の重鎖のみの抗体から作製することが

50

できる。界面の操作および特定の生殖系列ファミリーの選択を含む、さまざまな方法が、従来のヘテロ二量体 V_H および V_K ドメインから単量体 sdAb を作製するために実行されている。

【0446】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物の CRBR、または CRBR の独立した各々、例えば、第1の CRBR および/または第2の CRBR は、共刺激受容体に結合する少なくとも1つの sdAb または scFv を含む。いくつかの態様において、共刺激受容体に結合する少なくとも1つの scFv または sdAb は、多重特異性ポリペプチド構築物の Fc 領域に対してアミノ末端におよび/または CD3 結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc 領域に対してアミノ末端 および/または CD3 結合領域に対してカルボキシ末端のいずれかに位置づけることができる、共刺激受容体に結合する scFv または sdAb を1つだけ含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc 領域に対してアミノ末端におよび/または CD3 結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、共刺激受容体に結合する2つの scFv または sdAb を含む。

10

【0447】

いくつかの態様において、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、抗 CD3 抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）の V_H ドメイン、および共刺激受容体に結合する scFv または sdAb 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、抗 CD3 抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）の V_L ドメイン、および任意で、共刺激受容体に結合する別の、同じまたは異なる scFv または sdAb 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 scFv または sdAb 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および/または CD3 結合領域の V_H もしくは V_L 鎖に対してカルボキシ末端に位置づけることができる。多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび/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 II.4 に記載されているような TAA に結合する抗原結合ドメインまたはその鎖も含む。いくつかの態様において、TAA に結合する抗原結合ドメインは、scFv または sdAb であり、多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび/または第2のポリペプチドの一部として含まれる。いくつかの態様において、TAA に結合する抗原結合ドメインは Fab 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追加的に形成され、ここで、少なくとも第1のおよび第2のポリペプチドは、TAA に結合する Fab の1つの鎖を含み（例えば、Fab の V_H -CH1 または V_L -CL）、第3のポリペプチドは、TAA に結合する Fab のもう一方の鎖を含む（例えば、Fab の V_H -CH1 または V_L -CL のもう一方）。

20

30

【0448】

いくつかの態様において、CRBR または CRBR の独立した各々、例えば、第1の CRBR および/または第2の CRBR は、2つ以上の鎖を含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物の CRBR または CRBR の独立した各々、例えば、第1の CRBR および/または第2の CRBR は、FAB として構築される V_H および V_L 配列を含む。

【0449】

いくつかの態様において、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抗原結合ドメインの独立した各々、例えば、第1の抗原結合ドメイン および/または第2の抗原結合ドメインは、共刺激受容体に結合する Fab 抗体の V_H -CH1 (Fd) および V_L -CL を含む。いくつかの態様において、 V_H -CH1 (Fd) および V_L -CL を含む Fab 抗体は、多重特異性ポリペプチド構築物の Fc 領域に対してアミノ末端におよび/または CD3 結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、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、 V_H -CH1 (Fd) または V_L -CL を含む Fab 抗体を1つだけ含み、Fc 領域に対してアミノ末端 および/または CD3 結合領域に対してカルボキシ末端のいずれかに位置づけることができる。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、一方が Fc 領域に対してアミノ末端に位置づけられかつもう一方が CD

40

50

3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられている、共刺激受容体に結合する、それぞれがVH-CH1 (Fd) およびVL-CLを含む2つのFab抗体断片を含む。

【0450】

いくつかの態様において、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、および任意で、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のもう一方を含む第3のポリペプチドとを含む、3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の、第2の、および/または第3のポリペプチドは、5T4 VHHドメイン、例えば記載されているいずれかも含み得る。 10

【0451】

いくつかの態様において、CRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体の天然（ネイティブな）同族結合パートナー（例えば、天然リガンド）、または共刺激受容体に対する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。

【0452】

いくつかの態様において、提供される多重特異性ポリペプチド構築物の1つまたは複数のCRBRは、T細胞上に発現している共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、共刺激受容体に結合する2以上のCRBRが存在し、CRBRの各々、例えば、第1のCRBRおよび第2のCRBRは、同じ共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、CRBRの各々、例えば、第1のCRBRおよびCRBRは、異なる共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、CRBRの各々、例えば、第1のCRBRおよび第2のCRBRは、同じ共刺激受容体上の異なるエピトープに結合する。いくつかの態様において、CRBRの各々、例えば、第1の抗原-CRBRおよびCRBRは、同じ共刺激受容体上の同じエピトープに結合する。 20

【0453】

いくつかの態様において、共刺激受容体に結合するCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体に対して一価、二価、三価、または四価の結合をもたらす。

【0454】

いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、TAAに対する一価、二価、三価、または四価の結合をもたらす。いくつかの態様において、TAAに対する二価結合は、同じ抗原の同じエピトープに結合する2つの抗原結合ドメインを含む（例えば、モノエピトープ（mono-epitopic））。いくつかの態様において、TAAに対する二価結合は、同じ抗原の異なるエピトープに結合する2つの抗原結合ドメインを含む（例えば、バイエピトープ（bi-epitopic））。いくつかの態様において、TAAに対する一価結合は、抗原の1つのエピトープに結合する1つの抗原結合ドメインを含む（例えば、モノエピトープ）。 30

【0455】

いくつかの態様において、共刺激受容体は、T細胞、例えば対象から得られた初代T細胞上に発現している。いくつかの態様において、共刺激受容体は、ヒトT細胞、例えばヒト対象から得られた初代ヒトT細胞上に発現している。 40

【0456】

いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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。いくつかの態様において、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。

【0457】

いくつかの態様において、共刺激受容体は、41BB（CD137）、OX40（CD134）、CD27、グルコ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 50

ーターおよびCAMLインタラクタ (TACI)、およびNKG2Dからなる群より選択される。いくつかの態様において、共刺激受容体は、41BB、OX40、GITR、ICOS、またはCD28から選択される。いくつかの態様において、共刺激受容体は、41BB、OX40、またはGITRから選択される。

【0458】

いくつかの態様において、共刺激受容体は41BBである。いくつかの態様において、共刺激受容体はOX40である。いくつかの態様において、共刺激受容体はGITRである。いくつかの態様において、共刺激受容体はICOSである。いくつかの態様において、共刺激受容体はCD28である。

【0459】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチドのCRBRは、共刺激受容体に対するアゴニスト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て、受容体の天然リガンドによって惹起、誘導、または刺激されるものと同様のまたはそれと同じ反応または活性を惹起、誘導、または刺激することができる。いくつかの局面において、共刺激受容体に対するCRBRの結合は、受容体の天然リガンドによって惹起、誘導、または刺激されるシグナルの5%を上回って、10%を上回って、20%を上回って、30%を上回って、40%を上回って、50%を上回って、60%を上回って、70%を上回って、80%を上回って、90%を上回って、または100%を上回って下流シグナルを誘導または刺激する。

【0460】

いくつかの態様において、1つまたは複数のCRBRは、共刺激受容体41BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD27、グルコ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。いくつかの態様において、1つまたは複数の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。いくつかの態様において、1つまたは複数の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それぞれ、PCT公報第WO2017123650号、同第WO2017123673号、および同第WO2017015623号に記載される。いくつかの態様において、1つまたは複数のCRBRは、共刺激受容体に結合するシングルドメイン抗体 (sdAb)、例えば、PCT公報第WO2017123650号、同第WO2017123673号、および同第WO2017015623号に記載されているものである。

【0461】

いくつかの例において、共刺激受容体結合領域 (CRBR) は、41BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD27、グルコ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 (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。いくつかの態様において、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)、増殖誘導リガンド (APRIL)、NKG2Dリガンド、またはその機能性断片から選択される。

【0462】

いくつかの態様において、共刺激受容体結合領域 (CRBR) は、41BBに結合する抗体または抗原結合断片である。特定の例において、41BBに結合するCRBRはシングルドメイン抗体である。いくつかの態様において、sdAbは、CDR1 GFSSFSINAMG (SEQ ID NO: 347に記載される)、CDR2 AIESGRNTV (SEQ ID NO: 348に記載される)、およびCDR3 LKGNRVVSPSVAY (SEQ ID NO: 349に記載される) を含む。41BBを標的とするsdAbの例は、PCT公報第WO2017123650号に記載される。

【0463】

10

20

30

40

50

CRBRの例示的な配列は表4に記載される。

【0464】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体41BBに結合する。いくつかの例において、CRBRは、sdAbまたはVHおよびVLを含有する断片（たとえばscFv）などの、41BBに特異的である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。いくつかの態様では、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、41BBの天然リガンド、またはその機能結合断片である。いくつかの態様では、41BB結合CRBRは、たとえばSEQ ID NO: 186に示される、UniProt No. P41273のアミノ酸50～254に対応する、細胞外ドメインまたはその切断型部分、あるいはSEQ ID NO: 202～209のいずれかに示される切断型部分またはその断片を含有する、41BBリガンド（41BBL）の機能断片である。例示的な41BB結合CRBRが、SEQ ID NO: 186～210、および359のいずれかに示される。いくつかの態様では、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、SEQ ID NO: 193～201のいずれかに示されるAnticalinである。いくつかの態様では、VHHなどのsdAbは、それぞれSEQ ID NO: 347、348、および349に示される配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する。sdAbなどの41BB結合CRBRは、SEQ ID NO: 210に示される配列を含み得る。sdAbなどの41BB結合CRBRは、SEQ ID NO: 359に示される配列を含み得る。いくつかの態様では、4-1BB結合ドメインは、VHとVLとがリンカーにより隔てられているたとえばscFvなどの一本鎖断片などの、VHおよびVLを含有する抗原結合抗体断片を含有する。いくつかの態様では、41BB結合CRBRは、SEQ ID NO: 187、189、および191のいずれかに示されるVH、ならびにSEQ ID NO: 188、190、または192のいずれかに示されるVL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CRBRの独立した各々は、前述のSEQ ID Noのいずれかに対して少なくとも85%、85%、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得、かつ41BBに結合する。

【0465】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体OX40に結合する。いくつかの例において、CRBRは、OX40に特異的であるかまたはそれに結合する抗体または抗原結合断片、例えば、sdAbまたはVHおよびVLを含む断片（例えば、scFv）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、OX40の天然リガンドであるか、またはその機能性結合断片である。そのようなOX40に結合するCRBRの例は、SEQ ID NO: 211～220のいずれかに記載される。いくつかの態様において、OX40に結合するCRBRは、SEQ ID NO: 216および218のいずれかに記載のVH、ならびにSEQ ID NO: 217および219のいずれかに記載のVLを含む。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CRBRの独立した各々は、前述のSEQ ID NOのいずれかに対して少なくとも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、かつOX40に結合することができる。

【0466】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体GITRに結合する。いくつかの例において、CRBRは、GITRに特異的であるかまたはそれに結合する抗体または抗原結合断片、例えば、sdAbまたはVHおよびVLを含む断片（例えば、scFv）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、GITRの天然リガンドであるか、またはその機能性結合断片である。そのようなGITRに結合するCRBRの例は、SEQ ID NO: 221～230のいずれかに記載される。いくつかの態様において、GITRに結合するCRBRは、SEQ ID NO: 222、224、226、および228のいずれかに記載のVH、ならびにSEQ ID NO: 223、225、227、および229のいずれかに記載のVLを含む。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CRBRの独立した各々は、前述のSEQ ID NOのいずれかに対して少なくとも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、かつGITRに結合することができる。

【0467】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体CD27に結合する。いくつかの例において、CRBRは、CD27に特異的であるかまたはそれに結合する抗体または抗原結合断片、例えば、sdAbまたはVHおよびVLを含む断片（例えば、scFv）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、CD27の天然リガンドであるか、またはその機能性結合断片である。そのようなCD27に結合するCRBRの例は、SEQ ID NO: 231のいずれかに記載される。いくつかの態様において、CD27に結合するCRBRは、SEQ ID NO: 232に記載のVHおよびSEQ ID NO: 233に記載のVLを含む。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CRBRの独立した各々は、前述のSEQ ID NOのいずれかに対して少なくとも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、かつCD27に結合することができる。

10

【0468】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体ICOSに結合する。いくつかの例において、CRBRは、ICOSに特異的であるかまたはそれに結合する抗体または抗原結合断片、例えば、sdAbまたはVHおよびVLを含む断片（例えば、scFv）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、ICOSの天然リガンドであるか、またはその機能性結合断片である。例示的なICOSに結合するCRBR配列は、SEQ ID NO: 234に記載される。

20

【0469】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、共刺激受容体CD28に結合する。いくつかの例において、CRBRは、CD28に特異的であるかまたはそれに結合する抗体または抗原結合断片、例えば、sdAbまたはVHおよびVLを含む断片（例えば、scFv）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、少なくとも1つのCRBR、またはCRBRの独立した各々は、CD28の天然リガンドであるか、またはその機能性結合断片である。例示的なCD28に結合するCRBR配列は、SEQ ID NO: 235に記載される。

30

【0470】

（表4）例示的なCRBR配列

40

50

CRBR	形式	参照	SEQ ID NO
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	US 2012/0237498 (SEQ ID NO: 43)	187
	VL	US 2012/0237498 (SEQ ID NO: 45)	188
BMS663513	VH	WO 2005/035584 (SEQ ID NO: 9)	189
	VL	WO 2005/035584 (SEQ ID NO: 6)	190
MSB7	VH	US 2017/0226215 (SEQ ID NO: 138)	191
	VL	US 2017/0226215 (SEQ ID NO: 28)	192
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 12)	193
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 13)	194
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 14)	195
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 15)	196
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 16)	197
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 17)	198
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 18)	199
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 SEQ ID NO: 19)	200
41BB Anticalin	Anticalin	WO 2016/177762 (SEQ ID NO: 20)	201
ヒト 41BBL の 71～254	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 3)	202
ヒト 41BBL の 85～254	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 4)	203
ヒト 41BBL の 80～254	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 5)	204
ヒト 41BBL の 52～254	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 6)	205
ヒト 41BBL の 71～248	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 7)	206
ヒト 41BBL の 85～248	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 8)	207
ヒト 41BBL の 80～248	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 9)	208
ヒト 41BBL の 52～248	41BB リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 10)	209
41BB sdAb	sdAb	US 2017/0198050	210
41BB sdAb	sdAb		359
OX40 結合 CRBR 配列			
OX40 リガンド	天然リガンド	UniProt アクセッション番号 P23510	211
OX40 リガンド	天然リガンド	US 7,959,925 (SEQ ID NO: 2)	212
ヒト OX40L: 51～183	天然リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 11)	213
ヒト OX40L: 51～183 N90D	天然リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 12)	214
ヒト OX40L: 52～183	天然リガンド	WO 2017/167672 (SEQ ID NO: 13)	215
1A07	VH	US 2015/0307617 (SEQ ID NO: 56)	216

10

20

30

40

50

	VL	US 2015/0307617 (SEQ ID NO: 59)	217
1949	VH	WO 2016/179517 (SEQ ID NO: 16)	218
	VL	WO 2016/179517	219
1D10v1	sdAb	US 9,006,399	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	US 2014/0348841 (SEQ ID NO: 104)	222
	VL	US 2014/0348841 (SEQ ID NO: 105)	223
TRX-518	VH	US 2013/0183321 (SEQ ID NO: 54)	224
	VL	US 2013/0183321 (SEQ ID NO: 44)	225
5H7v2	VH	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 282)	226
	VL	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 134)	227
41G5v2	VH	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 312)	228
	VL	US 2015/0064204 (SEQ ID NO: 124)	229
C06v3	sdAb	US 2017/0022284 (SEQ ID NO: 59)	230
CD27 結合 CRBR 配列			
CD70-ECD	天然リガンド	UniProt 番号 P32970	231
1F5	VH	US 2011/0274685	232
	VL	US 2011/0274685	233
CD28 結合 CRBR 配列			
CD28 sdAb	sdAb		235
ICOS 結合 CRBR 配列			
ICOS sdAb	sdAb		234

10

20

30

40

50

【 0 4 7 1 】

いくつかの態様において、1つまたは複数のCRBRは、リンカーを介して直接的にまたは間接的に、Fc領域および/またはCD3結合領域に連結される。いくつかの態様において、連結はリンカーを介する。いくつかの態様において、リンカーは、本明細書に記載されるような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。

【 0 4 7 2 】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、CRBRとFc領域との間に連結ペプチド(LP)を含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3結合領域とCRBRとの間に連結ペプチド(LP)を含む。

【 0 4 7 3 】

f. 抑制性受容体結合領域(IRBR)

本開示の多重特異性ポリペプチド構築物は、抑制性受容体に結合する1つまたは複数の抑制性受容体結合領域(IRBR)を含む。いくつかの態様において、提供される多重特異性ポリペプチド構築物の1つまたは複数のIRBRは、T細胞上に発現している抑制性受容体に結合する。いくつかの態様において、抑制性受容体は、活性化T細胞の表面上で上方制御、誘導、または発現される。いくつかの局面において、IRBRは、抑制性受容体とそのリガンドとの間の相互作用を遮断し、それによって、IRBRが結合する細胞、例えばT細胞における抑制性シグナルを低下、抑制、または低減させる。いくつかの態様において、IRBR、またはIRBRの独立した各々は、抗体または抗原結合断片、共刺激受容体の天然同

族結合パートナー、Anticalin（操作されたりボカリン）、ダルピン、フィノマー、センチリン（操作されたフィブロンネクチン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。

【0474】

いくつかの態様において、IRBR、またはIRBRの独立した各々、例えば第1のIRBRおよび第2のIRBRは、抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数のコピーを含む。いくつかの態様において、IRBRまたはIRBRの独立した各々、例えば、第1のIRBRおよび第2のIRBRは、Fab断片、 $F(ab')_2$ 断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片の1つまたは複数のコピーを含む。

10

【0475】

いくつかの態様において、IRBR、またはIRBRの独立した各々、例えば、第1のIRBRおよび第2のIRBRは、一本鎖抗体である。いくつかの例において、一本鎖は、scFv、scAb、シングルドメイン重鎖抗体、またはシングルドメイン軽鎖抗体である。

【0476】

いくつかの態様において、IRBR、またはIRBRの独立した各々、例えば、第1のIRBRおよび第2のIRBRは、1つまたは複数のシングルドメイン抗体（sdAb）断片、例えば、 V_H 、 V_NAR 、操作された V_H または V_K ドメインを含む。 V_H は、天然のラクダ科の動物の重鎖のみの抗体、重鎖のみの抗体を生成する遺伝子改変げっ歯類、またはナイーブな/合成のラクダ科もしくはヒト化されたラクダ科の動物のシングルドメイン抗体ライブラリーから作製することができる。 V_NAR は、軟骨魚類の重鎖のみの抗体から作製することができる。界面の操作および特定の生殖系列ファミリーの選択を含む、さまざまな方法が、従来のヘテロ二量体 V_H および V_K ドメインから単量体 sdAb を作製するために実行されている。

20

【0477】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のIRBR、またはIRBRの独立した各々、例えば、第1のIRBRおよび/または第2のIRBRは、抑制性受容体に結合する少なくとも1つのsdAbまたはscFvを含む。いくつかの態様において、抑制性受容体に結合する少なくとも1つのscFvまたはsdAbは、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端側に位置づけられる。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端のいずれかに位置づけることができる、抑制性受容体に結合するscFvまたはsdAbを1つだけ含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、抑制性受容体に結合する2つのscFvまたはsdAbを含む。

30

【0478】

いくつかの態様において、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、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）の V_H ドメイン、および抑制性受容体に結合するscFvまたはsdAb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、抗CD3抗体または抗原結合断片（例えば、Fv）の V_L ドメイン、および任意で、抑制性受容体に結合する別の、同じまたは異なるscFvまたはsdAb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。抑制性受容体に結合するscFvまたはsdAb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および/またはCD3結合領域の V_H または V_L 鎖に対してカルボキシ末端に位置づけることができる。多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび/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II.4に記載されているようなTAAに結合する抗原結合ドメインまたはその鎖も含む。いくつかの態様において、TAAに結合する抗原結合ドメインは、scFvまたはsdAbであり、多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび/または第2のポリペプチドの一部として含まれ

40

50

る。いくつかの態様において、TAAに結合する抗原結合ドメインはFab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追加的に形成され、ここで、少なくとも第1のおよび第2のポリペプチドは、TAAに結合するFabの1つの鎖を含み（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CL）、第3のポリペプチドは、TAAに結合するFabのもう一方の鎖を含む（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CLのもう一方）。

【0479】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、以下の順に：TAAに特異的な第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、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、およびTAAに特異的な第2の抗原結合ドメインを含む第1のポリペプチドと；IRBRを含みかつ以下の順でヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、リンカー、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み、ここで、IRBRは、Fc領域のアミノ末端に位置づけられる、かつ/またはCD3結合領域のC末端に位置づけられる。いくつかの態様において、IRBRは、第2のポリペプチド上でCD3結合領域のカルボキシ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、IRBRは、第2のポリペプチド上でFc領域のアミノ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、IRBRは、Fc領域のアミノ末端にかつCD3結合領域のC末端に位置づけられる。いくつかの態様において、第1のおよび第2の抗原結合ドメインは、TAAに特異的であり、同じである。いくつかの態様において、第1のおよび第2の抗原結合ドメインは、TAAに特異的であり、異なっている。いくつかの態様において、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は、異なるTAAに結合する。いくつかの態様において、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は、同じTAAの別個のまたは重複しないエピトープに結合するか、および/または同じTAAへの結合について競合する。

【0480】

いくつかの態様において、IRBRまたはIRBRの独立した各々、例えば、第1のIRBRおよび/または第2のIRBRは、2つ以上の鎖を含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物のIRBRまたはIRBRの独立した各々、例えば、第1のIRBRおよび/または第2のIRBRは、FABとして構築されるVHおよびVL配列を含む。

【0481】

いくつかの態様において、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抗原結合ドメインの独立した各々、例えば、第1の抗原結合ドメインおよび/または第2の抗原結合ドメインは、抑制性受容体に結合するFab抗体のVH-CH1（Fd）およびVL-CLを含む。いくつかの態様において、VH-CH1（Fd）およびVL-CLを含むFab抗体は、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端におよび/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、Fc領域に対してアミノ末端および/またはCD3結合領域に対してカルボキシ末端のいずれかに位置づけることができる、抑制性受容体に結合する、VH-CH1（Fd）またはVL-CLを含むFab抗体を1つだけ含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、一方がFc領域に対してアミノ末端に位置づけられかつもう一方がCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられている、抑制性受容体に結合する、それぞれがVH-CH1（Fd）およびVL-CLを含む2つのFab抗体断片を含む。

【0482】

いくつかの態様において、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、および抑制性受容体に結合する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、および任意で、抑制性受容体に結合する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；抑制性受容体に結合するFab抗体断片のVH-CH1（Fd）またはVL-CLのもう一方を含む第3のポリペプチドとを含む、3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の、第2の、および/または第3のポリペプチドは、セクションII.4記載されているようなTAAに結合する抗原結合ドメインまたはその鎖も含むことができる。いくつかの態様において、TAAに結合する抗原結合ドメインは、scFvまたはsdAbであり、多重特異性ポリペプチド構築物の第1のおよび/または第2のポリペプチドの一部として含まれる。いくつかの態様において、TAAに結合する抗原結合ドメインはFabであり、多重特異性ポリペプチド構築物は、第4のポリペプチドから追加的に形成され、ここで、少なくとも第1のおよび第2のポリペプチドは、TAAに結合するFabの鎖を含み（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CL）、第4のポリペプチドは、TAAに結合するFabのもう一方の鎖を含み（例えば、FabのVH-CH1またはVL-CLのもう一方）。

【0483】

10

いくつかの態様において、IRBR、またはIRBRの独立した各々は、抑制性受容体の天然（ネイティブな）同族結合パートナー（例えば、天然リガンド）、または抑制性受容体に対する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。

【0484】

いくつかの態様において、提供される多重特異性ポリペプチド構築物の1つまたは複数のIRBRは、T細胞上に発現している抑制性受容体に結合する。いくつかの態様において、抑制性受容体に結合する2以上のIRBRが存在し、IRBRのそれぞれ、例えば、第1のIRBRおよび第2のIRBRは、同じ共刺激受容体に結合する。いくつかの態様において、IRBRのそれぞれ、例えば、第1のIRBRおよび第2のIRBRは、異なる抑制性受容体に結合する。いくつかの態様において、IRBRのそれぞれ、例えば、第1のIRBRおよび第2のIRBRは、同じ抑制性受容体上の異なるエピトープに結合する。いくつかの態様において、IRBRのそれぞれ、例えば、第1のIRBRおよび第2のIRBRは、同じ抑制性受容体上の同じエピトープに結合する。

20

【0485】

いくつかの態様において、抑制性受容体に結合するIRBR、またはIRBRの独立した各々は、抑制性受容体に対して一価、二価、三価、または四価の結合をもたらす。

【0486】

いくつかの態様において、抑制性受容体は、T細胞、例えば対象の初代T細胞上に発現している。いくつかの態様において、抑制性受容体は、ヒトT細胞、例えばヒト対象の初代ヒトT細胞上に発現している。

30

【0487】

いくつかの態様において、抑制性受容体は、腫瘍壊死因子（TNF）受容体ファミリーのメンバーである。いくつかの態様において、抑制性受容体は、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。

【0488】

いくつかの態様において、抑制性受容体は、プログラム細胞死タンパク質1（PD-1）、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）、IgとITIMドメインとをもつT細胞免疫受容体（TIGIT）、T細胞活性化のVドメイン免疫グロブリン抑制因子（V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation）（VISTA）、T細胞免疫グロブリンとムチンドメイン含有3（TIM3）、またはリンパ球活性化遺伝子3（LAG3）である。いくつかの態様において、1つまたは複数のIRBRは、抑制性受容体PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、TIM3、またはLAG3に結合する抗体またはその断片である。特定の態様において、抗体または抗原結合断片はヒト化されているか、またはヒトである。

40

【0489】

いくつかの例において、抑制性受容体結合領域（IRBR）は、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、またはTIM3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。いくつかの態様において、天然同族結合パートナーは、PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、CD155、CD112、もしくはVSIG-3/IGSF11、またはその機能性断片から選択される。

【0490】

いくつかの例において、IRBRは、抑制性受容体、例えば、PD-1、CTLA-4、TIGIT、V

50

ISTA、またはTIM3に結合する抗体の可変軽（VL）鎖および可変重（VH）鎖を含む抗体断片、例えばscFvを含む。いくつかの例において、IRBRは、例えば、PCT公報第WO2018068695号または同第WO2018068201号に記載される、抑制性受容体、例えば、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、またはTIM3に特異的に結合するシングルドメイン抗体またはVHHドメインを含む。

【0491】

いくつかの態様において、抑制性受容体はPD-1である。いくつかの態様において、1つまたは複数のIRBRは、PD-1に結合する抗体断片である。

【0492】

いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：304～320、326、もしくは364～381のいずれかから選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO：304～320、326、もしくは364～381のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列に含まれる、CDR1、CDR2、およびCDR3を含むPD-1に結合するVHHドメインであるかまたはそれを含む。

【0493】

いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：326に記載のVHHドメイン、またはSEQ ID NO：326に記載の選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列に含まれる、CDR1、CDR2、CDR3を含むVHHドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：326に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO：326に記載の選択されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列を有する、VHHドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：326に記載のアミノ酸配列のヒト化バリエーションであるVHHドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO：321、322、または323のいずれか1つに記載のCDR1、SEQ ID NO：324に記載のCDR2、およびSEQ ID NO：325に記載のCDR3を含むVHHドメインを有する。

【0494】

いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO：322、324、および325にそれぞれ記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO：321、324、および325にそれぞれ記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO：323、324、および325にそれぞれ記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。

【0495】

いくつかの局面において、IRBRは、SEQ ID NO：304～320のいずれかから選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO：304～320のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列に含まれる、CDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインであるかまたはそれを含む。

【0496】

いくつかの場合において、IRBRは、SEQ ID NO：304～320のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO：304～320のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合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VHHドメインを含む。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO：304～320のいずれか1つに記載のアミノ酸の配列を有するヒト化VHHドメイン

であるVHHドメイン配列であるかまたはそれを含む。

【0497】

いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO : 364に記載のVHHドメイン、またはSEQ ID NO : 364に記載の選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列に含まれる、CDR1、CDR2、CDR3を含むVHHドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO : 364に記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 364に記載の選択されるアミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列を有する、VHHドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO : 364に記載のアミノ酸配列のヒト化バリエーションであるVHHドメインであるか、またはそれを

10

【0498】

いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、SEQ ID NO : 321、322、または323のいずれか1つに記載のCDR1、SEQ ID NO : 324に記載のCDR2、およびSEQ ID NO : 325に記載のCDR3を含むVHHドメインを有する。

【0499】

いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、それぞれ、SEQ ID NO : 322、324、および325に記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、それぞれ、SEQ ID NO : 321、324、および325に記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。いくつかの態様において、PD-1に結合するIRBRは、それぞれ、SEQ ID NO : 323、324、および325に記載のCDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインを有する。

20

【0500】

いくつかの局面において、IRBRは、SEQ ID NO : 365~381のいずれかから選択されるVHHアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 365~381のいずれかから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合するアミノ酸配列に含まれる、CDR1、CDR2、およびCDR3を含むVHHドメインであるかまたはそれを含む。

30

【0501】

いくつかの場合において、IRBRは、SEQ ID NO : 365~381のいずれかに記載のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO : 365~381のいずれか1つから選択されるVHH領域アミノ酸に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有しかつPD-1に結合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VHHドメインを含む。いくつかの態様において、IRBRは、SEQ ID NO : 365~381のいずれか1つに記載のアミノ酸の配列を有するヒト化VHHドメインであるVHHドメイン配列であるか、またはそれを含む。

【0502】

いくつかの態様において、1つまたは複数のIRBRは、Fc領域および/またはCD3結合領域に、リンカーを介して直接的にまたは間接的に連結される。いくつかの態様において、連結はリンカーを介する。いくつかの態様において、リンカーは、セクションII.3などに記載されるような任意の可動性または剛性リンカーを含むことができる、連結ペプチド(LP)であるが、概してIRBR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。

40

【0503】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、IRBRとFc領域との間に連結ペプチド(LP)を含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3結合領域とIRBRとの間に連結ペプチド(LP)を含む。

【0504】

50

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、2以上のIRBRを含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、第1のIRBRとFc領域との間に第1の連結ペプチド(LP1)を含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、CD3結合領域と第2のIRBRとの間に第2の連結ペプチド(LP2)を含む。いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、第1のIRBRとFc領域との間に第1の連結ペプチド(LP1)およびCD3結合領域と第2のIRBRとの間に第2の連結ペプチド(LP2)を含む。いくつかの局面において、多重特異性ポリペプチド構築物は、N末端からC末端へ以下の構造配置を有する：IRBRおよび/または抗原結合ドメイン-LP1-Fc領域-リンカー-CD3結合領域-LP2-IRBRおよび/または抗原結合ドメイン。いくつかの態様において、2つの連結ペプチドは互いに同一ではない。

10

【0505】

いくつかの態様において、LP(例えば、LP1またはLP2)は独立して、約1~20アミノ酸の長さのペプチドである。いくつかの態様において、LP1またはLP2は独立して、SEQ ID NO: 1~4、125~127、129に記載のような任意のGly-Serリンカー、またはGGsであるかまたはそれを含む、ペプチドである。

【0506】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、CRBRおよびIRBRの両方を含む。いくつかの態様において、CRBRまたはIRBRの一方は、Fc領域に対してアミノ末端に位置づけられ、CRBRまたはIRBRのもう一方は、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づけられる。いくつかの態様において、CRBRおよびIRBRは、ポリペプチドの少なくとも1つがTAAに特異的な少なくとも1つの抗原結合ドメインも含んでいる、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の異なるポリペプチドに存在する。いくつかの態様において、CRBRおよびIRBRは、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物の同じポリペプチド(第1のポリペプチド)に存在し、TAAに特異的な少なくとも1つの抗原結合ドメインは、ヘテロ二量体多重特異性ポリペプチド構築物のもう一方の(または第2の)ポリペプチド上である。

20

【0507】

いくつかの態様において、多重特異性ポリペプチド構築物は、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。いくつかの局面において、第1のポリペプチドは、以下の順で：TAAに特異的な第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、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、およびTAAに特異的な第2の抗原結合ドメインを含み；かつ第2のポリペプチドは、以下の順で：IRBRまたはCRBRの一方、ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、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、およびIRBRまたはCRBRのもう一方を含む。いくつかの態様において、IRBRは、第2のポリペプチド上でCD3結合領域のカルボキシ末端に位置づけられ、CRBRは、第2のポリペプチド上でFc領域のアミノ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、IRBRは、第2のポリペプチド上でFc領域のアミノ末端に位置づけられ、CRBRは、第2のポリペプチド上でCD3結合領域のカルボキシ末端に位置づけられる。いくつかの態様において、第1のおよび第2の抗原結合ドメインは、TAAに特異的であり、同じである。いくつかの態様において、第1のおよび第2の抗原結合ドメインは、TAAに特異的であり、異なっている。いくつかの態様において、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は、異なるTAAに結合する。いくつかの態様において、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は、同じTAAの別個のまたは重複しないエピトープに結合するか、および/または同じTAAへの結合について競合する。

30

40

【0508】

3. NK動員

いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは、本明細書において提供される少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、およびナチュラルキラー(NK)細胞上に発現している表面分子に結合するか/またはNK細胞を動員することができる少なくとも1つの追加の

50

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。特定の局面において、多重特異性構築物は、5T4およびNK細胞表面分子に対して二重特異性である。いくつかの態様において、表面分子はCD16 (Fc RIII) である。特に、提供される二重特異性5T4結合ポリペプチドは、ヒトNK細胞上に発現しているNK活性化受容体、例えばヒトCD16aに特異的に結合することができる。

【0509】

抗体依存性細胞傷害 (ADCC) に関与することが公知の、一部のIgGのFc部分に対する低親和性受容体である、CD16は、NK細胞による標的細胞溶解の誘発を担う、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)。一般に、ヒトNK細胞の大部分 (およそ90%) は、CD56を低密度で (CD56dim) およびFc RIII (CD16) を高レベルで発現する (Cooper et al., 2001, Trends Immunol. 22:633-640)。ヒトFc RIII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種類のアイソフォーム、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)。特定の態様において、追加の結合分子は、CD16aに特異的に結合することができる。

【0510】

CD16aは、マクロファージ、マスト細胞、およびNK細胞上に膜貫通受容体として発現される。NK細胞上で、CD16aの鎖は、Fc RI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活性化モチーフ (ITAM) と会合して、シグナル伝達を媒介する (Wirthmueller et al., 1992, J. Exp. Med. 175:1381-1390)。CD16aと、および鎖のホモ二量体およびヘテロ二量体のさまざまな組み合わせとの相互作用は、NK細胞で観察されており、NK細胞においてCD16a複合体のバリエーションを介するさまざまなシグナル伝達経路を介してシグナル伝達を媒介することができることを示唆する (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を介する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と、例えばCD16aに特異的に結合できるアゴニスト結合分子等とのエンゲージメントは、CD16aを発現するNK細胞の活性化をもたらすことができ、それによって、生物学的反応、特にシグナル伝達反応を誘発する。いくつかの場合において、結合分子は、そのような細胞へのその結合のために、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) と類似した方法で、細胞殺傷を誘発することができる。

【0511】

特定の例において、5T4結合ポリペプチドは、抗原を持つ細胞がNK細胞媒介性細胞殺傷を介して根絶され得るように、5T4およびCD16aに特異的に結合できる二重特異性分子を含み、NK細胞をそのような抗原を持つ細胞に標的指向させてもよい。例えば、腫瘍細胞上に発現している5T4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指向させ得る。いくつかの場合において、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、腫瘍細胞の殺傷をもたらすことができる。

【0512】

いくつかの態様において、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')₂断片、Fv断片、scFv、ジスルフィド安定化Fv断片 (dsFv)、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体 (VHH)、またはシングルドメイン軽鎖抗体から選択される抗原結合断片である。いくつかの態様において、追加の結合ドメインは、CD16aなどの活性化T/NK細胞受容体への結合について一価である。

【0513】

いくつかの場合において、追加の結合ドメインはCD3結合ドメインを認識し、CD16aを認識する。いくつかの態様において、抗CD16a結合ドメインは、抗CD16a Fab断片、抗CD16a F(ab')₂断片、抗CD16a Fv断片、抗CD16a scFv、抗CD16a dsFv、抗CD16a scAb、抗CD16a dAb、抗CD16aシングルドメイン重鎖抗体 (VHH)、およ

10

20

30

40

50

び抗CD16aシングルドメイン軽鎖抗体の1つまたは複数のコピーを含む。いくつかの態様において、抗CD16a結合ドメインは、CD16aへの結合について一価である。いくつかの態様において、BH73結合ポリペプチドは、BH73に結合しかつCD16aの活性をアゴナイズする二重特異性構築物である。

【0514】

CD16aに特異的な抗体およびその抗原結合断片は公知であり、例えば、NM3E2を含む (McCall et al. (1999) Mol. Immunol., 36:433-045)。他の抗CD16a抗体もまた、本明細書において提供される構築物において用いることができ、それらには、公開米国特許出願第US10160280795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に記載のいずれかが含まれる。特定の例において、抗CD16aは抗CD16a scFvである。いくつかの態様において、抗CD16aは、TandAb分子中に含まれる抗CD16a抗体である (例えば、Reush et al. (2014) Mabs, 6:727-738を参照)。いくつかの局面において、抗CD16aは、米国特許第9,035,026号に記載の抗CD16aまたは抗原結合断片、例えばscFvである。

10

【0515】

提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、および活性化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、例えばCD16a結合ドメインを含む複数の形式のいずれかの形式で作製することができる。

【0516】

1つの態様において、二重特異性構築物は、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、例えば抗CD16a Fabに直接的にまたは間接的に連結される、記載されるような少なくとも1つの5T4 VHHドメインを含む、二重特異性シングルドメイン抗体連結Fab (S-Fab) である。いくつかの態様において、5T4 VHHドメインは、抗CD16a FabのVHまたはVL鎖のC末端に連結される。いくつかの態様において、S-Fabは、例えば、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 (例えばアルブミン)、ポリグルタミン酸、またはPAS化によるコンジュゲーションによって、さらに改変することができる (Pan et al. (2018) International Journal of Nanomedicine, 2018:3189-3201)。

20

【0517】

別の態様において、二重特異性構築物は、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を含むscFvに直接的にまたは間接的に連結される、記載されるような少なくとも1つの5T4 VHHを含んでいる、scFv-シングル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、記載されるようなVHおよびVL配列のいずれかを含むことができる。いくつかの態様において、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連結される。いくつかの態様において、ペプチドリンカーは、本明細書において記載されるようなペプチドリンカーであり得る。いくつかの態様において、VHHドメインおよびscFvはそれぞれ、Fc領域、例えばFc領域のN末端に、任意でヒンジ領域またはリンカー (例えば、ペプチドリンカー) を通じて、連結される。Fc領域は、本明細書において記載されるいずれか、例えば、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であり得る。特定の例において、Fc領域は、異なるポリペプチドを二量体化してヘテロ二量体を得る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改変されている、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ドメインにより形成される。

30

40

【0518】

さらなる態様において、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、シングルドメイン抗体、例えば、CD16aに特異的に結合するVHHドメインである。CD16aに結合するVHHドメインを含む、シングルドメイン抗体は公知である、例えば、公開米国特許出願第US20160280795号を参照。そのような局面において、本明細

50

書において提供される二重特異性構築物は、少なくとも1つの5T4 VHHドメインおよび少なくとも1つのCD16a VHHドメインを含むことができる。構築物の形式設定では、いくつかの場合において、各VHHドメインは、任意でヒンジ領域またはリンカー（例えば、ペプチドリンカー）を通じて、Fc領域、例えばFc領域のN末端に連結される。Fc領域は、本明細書において記載されるいずれか、例えばヒト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であり得る。特定の例において、Fc領域は、異なるポリペプチドを二量体化してヘテロ二量体を得る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改変されている、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ドメインにより形成される。

【0519】

上の諸態様では、以下のたとえば表3に記載されるいずれかを含む、ヘテロ二量体化を促進するFc領域の例示的な改変が知られる。いくつかの態様では、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 328（たとえばSEQ ID NO: 103または107）、334（たとえばSEQ ID NO: 115または117）のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcのもう一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 329（たとえばSEQ ID NO: 104または108）、332（たとえばSEQ ID NO: 111または113）、336（たとえばSEQ ID NO: 119または121）のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含有する。いくつかの態様では、ヘテロ二量体Fcの一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 330（たとえばSEQ ID NO: 105または109）、335（たとえばSEQ ID NO: 116または118）のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、ヘテロ二量体Fcのもう一方のFcポリペプチドは、SEQ ID NO: 331（たとえばSEQ ID NO: 106または110）、333（たとえばSEQ ID NO: 112または114）、337（たとえばSEQ ID NO: 120または122）のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む。

【0520】

4. サイトカイン融合および/またはサイトカイン受容体ターゲティング

いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは、サイトカイン-抗体融合タンパク質（5T4 VHH-サイトカイン融合とも呼ばれる）である多重特異性ポリペプチド構築物である。いくつかの局面において、本明細書において提供される少なくとも1つの5T4 VHHドメインは、少なくとも1つのサイトカイン、例えばインターフェロンに、直接的にまたは間接的に連結される。特定の態様において、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できる、インターフェロンである。いくつかの態様において、本明細書において提供される5T4 VHH-サイトカイン融合のインターフェロンは、IFNAR1および/またはIFNAR2で構成される受容体に結合することができる。さまざまなアッセイのいずれかが、IFNAR1および/もしくはIFNAR2への結合、がん細胞の成長速度および/もしくは増殖速度の低下もしくは減少、腫瘍サイズの低下、腫瘍の除去、またはがん細胞の死の誘導（例えば、アポトーシスを介して）に対するそのような融合タンパク質の作用を評価するために用いることができる。そのようなアッセイには、5T4を発現することが公知の種々のがん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利用するインビボアッセイが含まれる。

【0521】

いくつかの態様において、インターフェロンは、I型インターフェロン、例えばヒトI型インターフェロンまたはそのバリエーションである。いくつかの局面において、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。いくつかの態様において、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- γ （IFN- γ ； 2および天然高親和性バリエーション、例えば 14）、インターフェロン（IFN- α ）、ならびにその変異体および/または切断型である。いくつかの態様において、インターフェロンは、II型インターフェロン、例えばヒトII型インターフェロンまたはそのバリエーションである。いくつかの局面において、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。いくつかの態様において、II型インターフェロンまたはそのバ

10

20

30

40

50

リアントは、野生型ヒトインターフェロン（IFN- ）ならびにその変異体および/または切断型である。いくつかの態様において、提供されるサイトカイン-抗体融合タンパク質は、5T4を発現または過剰発現する標的細胞（例えば、がん細胞）の成長および/または増殖を抑制するために用いることができる。

【0522】

いくつかの態様において、5T4 VHH-サイトカイン融合タンパク質は、国際PCT公開出願第WO2014194100号；米国特許出願第9,803,021号；Valedkarimi 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形式において類似する。

【0523】

特定の態様において、インターフェロン、例えば、I型インターフェロン、例えばヒトI型インターフェロン（例えば、IFN- 、IFN- 、またはIFN- ）は、好ましくは、ネイティブな野生型インターフェロン（その単離された形態で）の少なくとも60%のレベル、または少なくとも80%もしくは少なくとも約80%、例えば、少なくとも90%、95%、98%、99%、100%のレベルで、またはそれを上回るレベルで、ネイティブなまたは野生型インターフェロンの内因性結合親和性および/または活性を持つものである。

【0524】

インターフェロンおよびインターフェロン変異体は、周知でありかつよく特徴付けられているサイトカインのグループである（例えば、WO 2002/095067；WO 2002/079249；WO 2002/101048；WO 2002/095067；WO 2002/083733；WO 2002/086156；WO 2002/083733；WO 2003/000896；WO 2002/101048；WO 2002/079249；WO 2003/000896；WO 2004/022593；WO 2004/022747；WO 2003/023032；WO 2004/022593、さらに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かは、提供されるサイトカイン-抗体融合タンパク質において用いることができる。

【0525】

いくつかの態様において、インターフェロンはヒトI型インターフェロンである。ヒトインターフェロンファミリーの遺伝子/タンパク質のアレルは公知であり、例えば、Pestka (1983) 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を参照のこと。

【0526】

いくつかの態様において、インターフェロンは、全長IFN- （例えば、ヒトIFN- ）、全長IFN- （例えば、ヒトIFN- ）、または全長IFN- （例えば、ヒトIFN- ）である。いくつかの態様において、インターフェロンは、生物学的に活性な切断型 IFN- （例えば、ヒトIFN- ）、生物学的に活性な切断型 IFN- （例えば、ヒトIFN- ）、または生物学的に活性な切断型 IFN- （例えば、ヒトIFN- ）である。いくつかの態様において、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末端で切断されており、かつネイティブなまたは野生型インターフェロンの少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、もしくはそれを上回る長さ、または少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%

10

20

30

40

50

、もしくはそれを上回る長さを含む、野生型のまたはネイティブなインターフェロンのアミノ酸の連続した配列を含む。インターフェロンの生物学的活性を評価するためのさまざまな標準的なアッセイのいずれかを用いることができる。例えば、IFN- 活性は、特定の検査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アッセイできる。IFN- 活性についてアッセイ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)alphabetakittを参照）。いくつかの局面において、IFN- は、IFN-a2a（例えば、Acc. No. CAA23805）、IFN-a-c（Acc. No. P01566）、IFN-a-d（Acc. No. AAB59403）；IFNa-5（Acc. No. CAA26702）；IFNa-6（Acc. No. AA26704）；IFNa-4（Acc. No. NP_066546）；IFNa-4b（Acc. No. CAA26701）；IFNa-I（Acc. No. AAA52725）；IFNa-J（Acc. No. CAA23792）；IFNa-H（Acc. No. CAA23794）；IFNa-F（Acc. No. AAA52718）；IFNa-7（Acc. No. CAA26903）であるか、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの局面において、IFN- は、Acc. No. AAC41702に記載のIFN- であるか、またはその生物学的に活性な断片である。いくつかの局面において、IFN- は、Acc. No. P01579に記載のIFN- であるか、またはその生物学的に活性な断片である。

10

20

30

40

50

【0527】

いくつかの態様において、提供される5T4 VHH-サイトカイン融合物は、バリエーションまたは変異体インターフェロン 2（IFNa2）を含むことが企図される。ある特定の変異体には、57位にあるHis、および/または58位にあるE、および/または61位にあるQの変異が含まれる。ある特定の態様において、変異体は、変異H57Y、および/またはE58N、および/またはQ61Sを含む。ある特定の態様において、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）。他の態様において、変異体は、57位にあるHis、および/または58位にあるE、および/または61位にあるQのA（アラニン）への変異を含む。ある特定の態様において、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）。ある特定の態様において、変異体インターフェロンは、57位にあるHisのA、Y、もしくはMへの変異、および/または58位にあるEの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位にあるQのA、もしくはS、もしくはL、もしくはDへの変異を含む。[0244] ある特定の態様において、変異体は、インターフェロン 8（IFN-a8）の変異体、例えば、R145のV、I、もしくはLへの、および/またはA146のN、もしくはSへの、および/またはM149のYへのアミノ酸置換に対応するアミノ酸置換、例えば、R145V/A146N/M149Y）、R145I/A146S/M149Y、またはR145L/A146S/M149Yを有するバリエーションを含む（例えば、Yamamoto et al. (2009) J. Interferon & cytokine Res, 29: 161-170を参照）。

【0528】

いくつかの態様において、提供される5T4 VHH-サイトカイン融合物は、アミノ酸 17にある天然に生じるシステインに対して置換されたセリンを含む変異体またはバリエーションIFN- を含む（例えば、Hawkins et al. (1985) Cancer Res., 45, 5914-5920を参照）。

【0529】

いくつかの態様において、提供される5T4 VHH-サイトカイン融合物は切断型インターフェロンを含む。1つの態様において、切断型インターフェロンは、ネイティブなまたは野生型のヒトIFN- の活性を保持することが示されている、最大で、最初の15個のアミノ末端アミノ酸残基、および/または、最大で、最後の10～13個のカルボキシル末端アミノ酸残基の欠失を有するヒトIFN- を含む（例えば、Ackerman (1984) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 81: 1045-1047を参照）。いくつかの態様において、切断型ヒトIFN- は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13個のカルボキシル末端アミノ酸残基が欠失されている、および/または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のアミノ末端アミノ酸残基が欠失されている。

【 0 5 3 0 】

いくつかの態様において、提供される5T4 VHH-サイトカイン融合物は、切断型インターフェロン、例えば、公開米国特許出願第US2009/0025106号に記載されるものを含む。いくつかの態様において、提供される5T4 VHH-サイトカイン融合物は、N末端および/またはC末端の欠失を含む切断型IFN-、例えば、Lundell et al. (1991) Protein Neg., 4:335-341; Pan et al. (1987) Eur. J. Biochem., 166:145-149)に記載されるものを含む。

【 0 5 3 1 】

いくつかの態様において、インターフェロン、例えばヒトインターフェロンは、改変されていない、典型的には野生型のタンパク質と比較して、タンパク質分解に対して抵抗性を有する変異体インターフェロンである、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。

【 0 5 3 2 】

提供される5T4 VHH-サイトカイン融合タンパク質の諸局面では、抗体と、サイトカインたとえばインターフェロンとは、ペプチドリンカーなどのリンカーを介し、直接または間接的に付着している。付着が抗体の5T4に対する結合を妨げないかぎり、付着はVHHドメインのN末端でもC末端でもよい。本明細書に記載される任意のリンカー、たとえばペプチドリンカーを使用することができる。いくつかの態様では、リンカーは、GGSGGS,すなわち, (GGG)₂ (SEQ ID NO: 1); GGSGSGGS,すなわち, (GGG)₃ (SEQ ID NO: 2); GGSGSGSGGS,すなわち, (GGG)₄ (SEQ ID NO: 3);およびGGSGSGSGSGGS,すなわち, (GGG)₅ (SEQ ID NO: 4)

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むGSリンカーである。いくつかの態様では、リンカーは、(GGGGG)_nであり、nは1～5であり (SEQ ID NO: 123); (GGGGG)_nであり、nは1～4であり (SEQ ID NO: 124); GGGGS (SEQ ID NO:125); GGGGS (SEQ ID

NO:126); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:127); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:128); GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:129)

である。いくつかの態様では、リンカーは、非限定例として GG, GGG, GGGG

(SEQ ID NO: 5), GGGGG (SEQ ID NO: 6), GGGGGG (SEQ ID NO: 7), および PGGGG (SEQ ID NO:327)

などのグリシン残基を含む可動性リンカーである。いくつかの態様では、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み得る。

【 0 5 3 3 】

D. キメラ受容体および操作された細胞

本明細書において、本明細書において提供される5T4 VHHドメイン、例えば本明細書において提供される5T4 VHHドメインの配列のいずれか、の1つまたは複数を含む、細胞外ドメインを有するキメラ抗原受容体 (CAR) が、提供される。本明細書において提供されるCAR構築物は、1つまたは複数の5T4 VHH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領域を含む。CARの抗原結合ユニットを形成する1つまたは複数の5T4 VHHドメインは、十分な親和性で5T4、すなわち、標的に「結合する」かまたは「結合することができ」、そのようなCARは、5T4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。

【 0 5 3 4 】

CARは、単一の融合分子において1つまたは複数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している細胞外ターゲティング/結合部分を典型的に含む合成受容体である。したがって、CARは、単一の融合分子において、抗原特異性特性とT細胞活性化特性を組み合わせている。第1世代CARは典型的には、それらのシグナル伝達ドメインとしてCD3 またはFcγR受容体 鎖の細胞質領域を含んだ。第1世代CARは、卵巣がん、腎がん、リンパ腫、および神経芽腫を有する患者における第I相臨床試験で試験されており、中程度の奏効をもたらしている (Sadelain et al., Curr Opin Immunol, 21 (2): 215-223, 2009において概説される)。第2世代CARは、共刺激分子のシグナル伝達ドメイン、例えばCD28、およびCD3 を含み、活性化シグナルおよび共刺激シグナルの直接の組み合わせに対する二重シグナル伝達を提供する。第3世代CARは、3以上のシグナル伝達ドメインを有し、より複雑である (Sadelain et al., Cancer Discovery (3), 388-398, 2013 and Dotti et al, Immuno. Rev, 257 (1), 1-36, 2014において概説される)。

【0535】

いくつかの態様において、提供されるCARは、5T4を標的とするかまたは5T4に特異的に結合することができる5T4 VHHドメインを含む少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。いくつかの態様において、CARは、1つまたは複数の抗原を標的とする少なくとも2つの抗原結合ドメイン (少なくとも1つは5T4 VHHドメインを含む) を含む。1つの態様において、CARの抗原結合ドメインは、5T4に特異的な2つのまたは少なくとも2つの5T4 VHHドメインを含み、よって、二価結合分子を提供する。1つの態様において、抗原結合ドメインは、5T4に特異的であるが、該抗原上の異なるエピトープに結合する、2つのまたは少なくとも2つの5T4 VHHドメインを含む。そのような場合において、抗原結合ドメインは、5T4の第1のエピトープに結合する第1の5T4 VHHドメインおよび5T4の第2のエピトープに結合する第2の VHHドメインを含む。エピトープは重複してしてもよい。よって、いくつかの態様において、抗原結合ドメインはバイパラトピック (biparatopic) であり、CARはバイパラトピックCARである。さらに別の態様において、抗原結合ドメインは、5T4に特異的でありかつ5T4上の同じエピトープに結合する、2つの5T4 VHHドメインを含む。

【0536】

本明細書において提供される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もしくは貫通することができ、かつ細胞外抗原結合ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインを含む小胞体部分とに直接的にまたは間接的に (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) 連結される、ドメインである。1つの態様において、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) の膜貫通領域、人工疎水性配列、またはそれらの組み合わせである。1つの態様において、膜貫通ドメインは、CD3 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は、当業者に明らかであり、本明細書で提供されるCARの態様に関連して用いられ得る。

【0537】

本明細書において提供されるCARの細胞内シグナル伝達領域は、CARの抗原結合ドメインのエンゲージメント時に、例えば、抗原への結合時に、シグナルをT細胞に伝達する1つまたは複数の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、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む、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。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 鎖に由来するシグナル伝達ドメインまたはそのホモログのいずれか (例えば、 鎖、FcγR1y および 鎖、MB 1 (Igα) 鎖、B29 (Ig) 鎖等)、ヒトCD3 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、ZAP 70等)、srcファミリーチロシンキナーゼ (Lck、Fyn、Lyn等)、ならびにT細胞伝達に参与する他の分子、例えば、CD2、CD5、OX40、およびCD28が挙げられる。特定の態様において、細胞内シグナル伝達領域は、ヒトCD3 鎖に由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0538】

いくつかの態様において、エンドドメインはCD3- シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、CD3- シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 236に記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 236に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%またはそれを上回る配列同一性示しかつT細胞シグナル伝達の活性を保持するアミノ酸の配列を含む。

【0539】

いくつかの態様において、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むことができる。そのような例において、そのようなシグナル伝達ドメインは、例えば、シグナル伝達ドメイン、例えばCD3を含むITAMのみを含むCARと比較して、抗原特異的エンゲージメント後に、増殖の増強、メモリー細胞の生存および/または発生などを介して、CAR-T細胞活性を増強し得る。いくつかの態様において、共刺激ドメインは、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から選択されるタンパク質から得られる機能性シグナル伝達ドメインである。特定の態様において、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。いくつかの局面において、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。

【0540】

いくつかの態様において、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28または4-1BBに由来し、かつSEQ ID NO: 237~240のいずれかに記載のアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 237~240に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%またはそれを上回る配列同一性を示しかつT細胞共刺激シグナル伝達の活性を保持する、アミノ酸の配列を含む。

【0541】

特定の態様において、CARは、細胞外抗原結合ドメインおよび膜貫通ドメインを連結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、その結果生じるCARのさまざまな長さおよび可動性を達成するために用いることができる。用いることができるヒンジまたはスペーサー領域の例としては、これらに限定されないが、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。他のヒンジまたはスペーサー領域は、当業者に明らかであり、用いられ得る。1つの態様において、ヒンジはIgG4ヒンジまたはCD8Aヒンジである。

【0542】

いくつかの態様において、スペーサーおよび膜貫通ドメインは、ヒンジ、およびCD8に由来する膜貫通ドメイン、例えば、SEQ ID NO: 241~243に記載の例示的な配列またはSEQ ID NO: 241~243に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくはそれを上回る配列同一性を示すアミノ酸の配列を有する膜貫通ドメインである。

【0543】

本明細書において、本明細書において提供されるようなCARをコードする少なくとも1つの核酸を含む単離された核酸構築物もまた提供される。いくつかの局面において、構築物は、細胞におけるCARの発現用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本技術分野において周知であり、例えば、Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2013)に記載される。いくつかのウイルスに基づく

システムが、哺乳類細胞内への遺伝子導入のために開発されている。例えば、レトロウイルス、例えばアデノウイルスベクターが用いられる。1つの態様において、レンチウイルスベクターが用いられる。

【0544】

さらなる局面において、上記に記載のような1つまたは複数の核酸構築物を含む単離された細胞または細胞集団もまた提供される。本明細書において提供されるCARを発現するように遺伝子改変されている単離された細胞または細胞集団もまた提供される。よって、本明細書において提供されるCARを含む、例えば安定的に発現する、遺伝子操作された細胞が本明細書において提供される。1つの態様において、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、造血性幹細胞、および/または多能性胚性/人工幹細胞からなる群より選択される。いくつかの場合において、細胞は、T細胞、例えばCD4および/またはCD8 T細胞である。いくつかの態様において、細胞は、対象に対して自家性である。例えば、いくつかの態様において、T細胞は、CAR核酸構築物による操作、例えば、トランスフェクションまたは形質導入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）。

10

【0545】

例示的な例において、初代T細胞は、エキスピボで精製され（CD4細胞もしくはCD8細胞または両方）、TCR/CD28アゴニスト、例えば抗CD3/抗CD28コーティングビーズで刺激され得る。2日または3日の活性化プロセス後、CARをコードする組換え発現ベクターを、標準的なレンチウイルスまたはレトロウイルス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戦略を通じて初代T細胞内に安定に導入することができる。細胞は、例えば、抗エピトープタグまたはネイティブな親分子と交差反応する抗体を用いるフローサイトメトリーによって、CAR発現についてモニターすることができる。CARを発現するT細胞は、抗エピトープタグ抗体によるソーティングを通じて濃縮されるか、または適用に応じて高発現または低発現について濃縮され得る。

20

【0546】

CAR操作されたT細胞は、さまざまな手段によって適切な機能についてアッセイすることができる。いくつかの場合において、インビトロでの細胞傷害性、増殖、またはサイトカインアッセイ（例えば、IFN- γ 発現）を、操作されたT細胞の機能を評価するために用いることができる。例示的な標準的なエンドポイントは、腫瘍株のパーセント溶解、操作されたT細胞の増殖、または培養上清中のIFN- γ タンパク質の発現である。いくつかの場合において、例えば抗原を介する、CARの刺激時のT細胞の活性化を刺激する能力は、例えば、活性化マーカー、例えば、CD69、CD44、もしくはCD62Lの発現、増殖および/またはサイトカイン産生をモニターすることによって、評価することができる。

30

【0547】

本明細書において、本明細書において提供されるCARを含む操作された細胞を対象に投与する工程を含む、対象における疾患または状態、例えばがんの予防および/または処置のための方法も提供される。一般に、対象は、疾患または状態について処置の必要がある対象である。本発明の細胞および/または薬学的組成物の薬学的に活性な量。

【0548】

IV. ポリペプチド発現および生成

提供されるsdAbおよび5T4結合ポリペプチドのいずれかをコードするポリペプチドを含む核酸分子が提供される。いくつかの態様において、提供される核酸配列および特にDNA配列は、本明細書において提供される融合タンパク質をコードする。前述の態様のいずれかにおいて、核酸分子は、5T4結合ポリペプチドの分泌に導くリーダー配列もコードしてもよく、該リーダー配列は典型的には、分泌された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、ネイティブな重鎖（またはVHH）のリーダー配列であってもよく、または別の異種リーダー配列であってもよい。

【0549】

核酸分子は、当技術分野において通常の組換えDNA技術を用いて構築することができる

40

50

。いくつかの態様において、核酸分子は、選択された宿主細胞での発現に適している発現ベクターである。

【0550】

本明細書に記載される5T4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、これらに限定されないが、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等が挙げられる。いくつかの態様において、ベクターは、選択され、所望の細胞型、例えば、CHOもしくはCHO由来細胞、またはNSO細胞におけるポリペプチドの発現について最適化される。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)において記載される。

10

【0551】

特に、所望の5T4結合ポリペプチド、例えば融合タンパク質をコードするDNAベクターは、本明細書に記載される5T4結合ポリペプチドを調製する方法を促進するため、および有意量を得るために用いることができる。DNA配列は、適切な発現ベクター、すなわち、挿入されるタンパク質コード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含むベクター内に挿入することができる。多種多様な宿主-ベクター系が、タンパク質コード配列を発現させるために利用され得る。これらには、ウイルス（例えば、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等）に感染させた哺乳類細胞系；ウイルス（例えば、バキュロウイルス）に感染させた昆虫細胞系；微生物、例えば、酵母ベクターを含有する酵母、またはバクテリアファージDNA、プラスミドDNA、もしくはコスミドDNAで形質転換した細菌などが

20

【0552】

本開示はまた、細胞が、本明細書に記載される5T4結合ポリペプチドをコードする単離された核酸分子、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んでいる、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5T4結合ポリペプチドを生成する方法も提供する。

【0553】

いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは、原核細胞、例えば、細菌細胞；または真核細胞、例えば、真菌細胞（酵母など）、植物細胞、昆虫細胞、および哺乳類細胞において発現され得る。そのような発現は、例えば、当技術分野において公知の手法により、行われ得る。ポリペプチドを発現させるために用いられ得る例示的な真核細胞には、これらに限定されないが、COS 7細胞を含むCOS細胞；293-6E細胞を含む293細胞；CHO-S、DG44、Lec13 CHO細胞、およびFUT8 CHO細胞を含むCHO細胞；PER.C6（登録商標）細胞（CruCell）；ならびにNSO細胞が挙げられる。いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは酵母において発現させてもよい。例えば、米国公報第US 2006/0270045 A1号を参照。いくつかの態様において、具体的な真核生物宿主細胞は、ポリペプチドに対して望ましい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、いくつかの態様において、CHO細胞は、293細胞で産生された同じポリペプチドより高いシアリル化レベルを有するポリペプチドを産生する。

30

40

【0554】

所望の宿主細胞内への1つまたは複数の核酸（例えばベクター）の導入は、これらに限定されないが、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染等を含む、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、Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載される。核酸は、任意の適した方法により、望ましい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。

【0555】

50

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また提供される。いくつかの態様において、本明細書に記載される5T4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る5T4結合ポリペプチドは、任意の適した方法によって精製することができる。そのような方法には、これらに限定されないが、親和性マトリ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。適切な親和性リガンドには、ROR1 ECD、およびFc領域に結合する作用物質が含まれる。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が、Fc領域に結合するためおよびFc領域を含む5T4結合ポリペプチドを精製するために用いられ得る。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また、抗体などの一部のポリペプチドを精製するのに適している場合がある。イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィーおよび/または陽イ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適している場合がある。ミックスモードクロマトグラフィー（例えば、逆相/陰イオン交換、逆相/陽イオン交換、親水性相互作用/陰イオン交換、親水性相互作用/陽イオン交換等）もまた、抗体などの一部のポリペプチドを精製するのに適している場合がある。ポリペプチドを精製する多数の方法が当技術分野において公知である。

10

【0556】

いくつかの態様において、5T4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、Sitaraman et al., *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo et al., *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003)に記載される。

20

【0557】

いくつかの態様において、上記に記載される方法によって作製される5T4結合ポリペプチドが提供される。いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは宿主細胞において作製される。いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは無細胞系で作製される。いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドは精製される。いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドを含む細胞培養培地が提供される。

【0558】

いくつかの態様において、上記に記載される方法によって作製される抗体を含む組成物が提供される。いくつかの態様において、組成物は、宿主細胞において作製された5T4結合ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、組成物は、無細胞系で作製された5T4結合ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、組成物は、精製された5T4結合ポリペプチドを含む。

30

【0559】

V. 薬学的組成物および製剤

本明細書において提供される5T4結合ポリペプチドのいずれかまたはそれと同じものを発現する操作された細胞を含む薬学的組成物が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチド、例えば、本開示の融合タンパク質（本明細書においてとも「活性化合物」呼ばれる）、ならびにその誘導体、断片、類似体、およびホモログが、投与に適した薬学的組成物内に取り込まれ得る。いくつかの態様において、本明細書において提供される5T4結合ポリペプチドを含むキメラ受容体、例えばキメラ抗原受容体を発現する操作された細胞が、投与に適した薬学的組成物内に取り込まれ得る。

40

【0560】

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む。本明細書において用いられる場合、用語「薬学的に許容される担体」は、薬学的投与に適合性のある、任意かつ全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などを含むことが意図される。適切な担体は、参照により本明細書に組み入れられる、この分野における標準的な参考書であるRemington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に記載される。そのような担体または希釈剤の適した例には、これらに限定されないが、水、生理食塩水、リンガー液、デキストロース液、および5%ヒト血清アルブミンが含まれ

50

る。リボソームおよび非水性ビヒクル、例えば固定油もまた用いられ得る。薬学的に活性な物質に対するそのような媒体および作用物質の使用は当技術分野において周知である。従来の媒体または作用物質が活性化合物に不適合である場合を除いて、組成物におけるその使用が企図される。補足の活性化合物もまた、組成物内に組み入れることができる。

【0561】

本開示の薬学的組成物は、その目的とす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、または皮下適用で用いられる溶液または懸濁液としては、以下の構成成分：無菌希釈剤、例えば、注射用の水、食塩水溶液、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；酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；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、アセタート、シトレート、またはホスフェート、および張度調節用の作用物質、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロースを挙げることができる。pHは、酸または塩基、例えば、塩酸または水酸化ナトリウムによって調整することができる。非経口製剤は、ガラスまたはプラスチックから作られたアンプル、使い捨て可能な注射器、または複数用量バイアルに封入することができる。

10

【0562】

注射での使用に適した薬学的組成物は、無菌水性溶液剤（水溶性である場合）または分散剤、および無菌の注射液もしくは分散剤の即時調製用の無菌粉剤を含む。静脈内投与では、適した担体は、生理学的食塩水、静菌水（bacteriostatic water）、CREMOPHOREL（商標）（BASF, Parsippany, N.J.）、またはリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）を含む。全ての場合において、組成物は、無菌でなければならず、容易に注射可能な程度に流動性であるべきである。それは、製造および保存の条件下に安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護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等）およびそれらの適した混合物を含有する溶媒または分散媒であることができる。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り、分散剤の場合には必要とされる粒径の維持により、および界面活性剤の使用により、維持することができる。微生物の作用の阻止は、種々の抗バクテリア剤および抗真菌剤、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、チメロサル等により達成することができる。多くの場合において、組成物中に等張剤、例えば糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能な組成物の吸収の延長は、吸収を遅延する作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中に含ませることにより、もたらすことができる。

20

30

【0563】

無菌の注射液は、必要とされる量での活性成分を適切な溶媒中に、必要に応じて、上記に列挙した成分の一つまたは組み合わせと共に組み入れ、その後続けて過滅菌を行うことによって調製することができる。一般に、分散剤は、基本的な分散媒と上記に列挙したもののから必要とされるその他の成分とを含む滅菌ビヒクルの中に活性化合物を組み入れることによって調製される。無菌の注射液の調製用の滅菌粉末の場合、調製の方法は、予め滅菌したその溶液から任意の付加的な望ましい成分を加えた活性成分の粉末をもたらす真空乾燥法および凍結乾燥法である。

40

【0564】

経口用組成物は概して、不活性希釈剤または食用の担体を含む。それらはゼラチンカプセルの中に封入されるか、または錠剤に圧縮され得る。治療的な経口投与を目的として、活性化合物を賦形剤と共に組み入れて、錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で 사용할ことができる。経口組成物はまた、口腔洗浄剤として用いるために液体担体を使用して調製することもでき、ここで、液体担体中の化合物は経口的に適用され、かつ口内でゆすが

50

れ(swished)、かつ喀出されまたは嚥下される。薬学的に適合する結合剤および/またはアジュバント物質を、組成物の一部として含めることができる。この錠剤、丸剤、カプセル、トローチなどは、以下の成分のいずれか、または類似の性質の化合物を含むことができる：結合剤、例えば、微結晶性セルロース、トラガカントゴム、もしくはゼラチン；賦形剤、例えば、でんぶんもしくはラクトース、崩壊剤、例えば、アルギン酸、Primogel、もしくはとうもろこしでんぶん；滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムもしくはSterote；流動促進剤、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、もしくはオレンジ風味。

【0565】

10

吸入による投与では、化合物は、適した噴射剤、例えば二酸化炭素などの気体を含有する加圧容器もしくは分注器、または噴霧器からエアロゾルスプレイの形態で送達される。

【0566】

全身投与は、経粘膜的または経皮的な手段によるものとすることもできる。経粘膜投与または経皮投与では、透過されるべきバリアに対して適切な浸透剤が製剤中に用いられる。そのような浸透剤は一般に当技術分野において公知であり、例えば、経粘膜投与では、界面活性剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻腔用スプレイまたは坐剤の使用により達成することができる。経皮投与では、活性化化合物は、当技術分野において一般に公知である軟膏剤、膏薬、ゲル、またはクリームに製剤化される。

【0567】

20

化合物はまた、坐剤（例えば、カカオバターまたは他のグリセリドなど通常の坐剤基剤と共に）または直腸送達用の停留浣腸の形態でも調製することができる。

【0568】

1つの態様において、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した送達系を含む、体内からの迅速除去に対して化合物を保護する担体、例えば、放出制御製剤と共に調製される。生体分解性の生体適合性高分子、例えば、エチレン酢酸ビニル、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、およびポリ乳酸を用いることができる。そのような製剤の調製のための方法は当業者に明らかである。その材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc.から商業的に入手することもできる。リボソーム懸濁剤もまた、薬学的に許容される担体として用いることができる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されているような、当業者に公知の方法により調製することができる。

30

【0569】

投与の容易さおよび投与量の均一性のために、経口または非経口組成物を投与量単位形態で製剤化することが特に有利である。投与量単位形態は、本明細書において用いられる場合、処置される対象にとって単一投与量として適した物理的に分離した単位を指し；各単位は、必要とされる薬学的担体と関連して所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化化合物を含有する。本開示の投与量単位形態の規格は、活性化化合物の特有の特徴および達成されるべき特定の治療効果、ならびに個々人の処置向けのそのような活性化化合物の調剤の分野における固有の制限によって決定づけられ、それらに直接的に依拠する。

40

【0570】

薬学的組成物は、キット、容器、パッケージ、または分注器の中に投与のための指示書と一緒に含めることができる。これらの薬学的組成物は、診断用キット中に使用のための指示書と共に含めることができる。

【0571】

薬学的組成物は、特定の適用の処置または予防に有効な量で投与される。治療的有效量は典型的には、処置される対象の体重、対象の身体的状態もしくは健康状態、処置される状態の広範さ、または処置される対象の年齢によって決まる。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重～約50 mg/kg 体重の範囲の量で投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重～約5

50

0 mg/kg体重の範囲の量で投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約100 µg/kg体重～約20 mg/kg体重の範囲の量で投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約0.5 mg/kg体重～約20 mg/kg体重の範囲の量で投与され得る。

【0572】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約10 mg～約1,000 mgの範囲の量で投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約20 mg～約500 mgの範囲の量で投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約20 mg～約300 mgの範囲の量で投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、用量当たり約20 mg～約200 mgの範囲の量で投与され得る。

10

【0573】

薬学的組成物は、必要に応じて対象に投与され得る。いくつかの態様において、有効用量の薬学的組成物は、対象に1回または複数回投与される。種々の態様において、有効用量の薬学的組成物は、1ヶ月に1回、1ヶ月に1回未満、例えば、2ヶ月毎、3ヶ月毎、または6ヶ月毎に、対象に投与される。他の態様において、有効用量の薬学的組成物は、1ヶ月に1回を上回って、例えば、2週間毎、毎週、週に2回、週に3回、毎日、または1日当たり複数回、投与される。有効用量の薬学的組成物は、対象に少なくとも1回投与される。いくつかの態様において、有効用量の薬学的組成物は、少なくとも1ヶ月、少なくとも6ヶ月、または少なくとも1年の期間を含み、複数回投与され得る。いくつかの態様において、薬学的組成物は、必要とする対象に投与され、状態の1つまたは複数の症状を軽減する。

20

【0574】

VI. 処置および使用の方法

本明細書に記載される5T4結合ポリペプチドまたはそれと同じものを発現する操作された細胞は、さまざまな治療的、診断的、および予防的適用で有用である。例えば、5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、対象におけるさまざまな疾患および障害を処置するのに有用である。そのような方法および使用には、例えば、疾患、状態、または障害、例えば、腫瘍またはがんを有する対象への分子もしくは操作された細胞、またはそれと同じものを含有する組成物の投与を伴う、治療的方法および使用が挙げられる。いくつかの態様において、分子または操作された細胞は、疾患または障害の処置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処置における、ならびにそのような治療方法を行うための医薬の調製における、5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞を含む分子の使用が含まれる。いくつかの態様において、方法は、疾患または状態を有するかまたは有することが疑われる対象に5T4結合ポリペプチドもしくは操作された細胞、またはそれと同じものを含む組成物を投与することによって行われる。いくつかの態様において、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処置する。

30

【0575】

1つの態様において、本開示の5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、治療剤として用いられてもよい。そのような剤は一般に、対象における疾患または病態を診断、予後を予測、モニター、処置、軽減、および/または予防するために利用される。治療レジメンは、標準的な方法を用いて対象、例えば、障害を患っている（または発症するリスクがある）ヒト患者または他の哺乳動物を同定することによって行われる。いくつかの場合において、5T4を発現する腫瘍を有することが知られている、それが疑われる、またはそれが特定されている、対象が選択される。5T4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る。5T4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、その標的との結合のために概して作用を有する。

40

【0576】

いくつかの態様において、提供される5T4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、例えば、細胞におけるCD3のエンゲージメントおよび/または

50

CD3シグナルなどによって、対象に投与されると免疫応答を調節する、例えば増加することができる。いくつかの態様において、提供される多重特異性構築もしくは操作された細胞、またはその薬学的組成物の治療的有効量を投与することによって、対象における免疫応答を調節する方法が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、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または増強する。例えば、増加または増強された応答は、細胞性免疫の増加であってもよい。いくつかの例において、方法は、T細胞活性、例えば細胞溶解性T細胞（CTL）活性を増加させる。いくつかの態様において、調節された（例えば、増加された）免疫応答は腫瘍またはがんに対する。

【0577】

いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチド、例えば、Fc領域を含有する5T4-Fc融合タンパク質または多重特異性構築の投与は、多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域によるFc Rのエンゲージメント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/または増加させ得る。制約付き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の構成成分と第2の構成成分とを連結するリンカーがプロテアーゼによって切断されると、かつ/または標的細胞（例えば、腫瘍細胞）上の5T4に結合すると、T細胞を活性化し、それによって、抗CD3結合部分をT細胞上のCD3に結合させ得る。いくつかの場合において、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/または増加させ得る。

【0578】

いくつかの態様において、提供される方法は、提供される5T4結合ポリペプチドもしくは操作された細胞またはその薬学的組成物のいずれかの治療的有効量を投与することによって、対象における疾患または状態を処置するためのものである。いくつかの態様において、疾患または状態は腫瘍またはがんである。一般に、疾患または障害の軽減または処置は、疾患または障害に関連する1つまたは複数の症状または医学的問題を緩和することを伴う。例えば、がんの場合、薬物の治療的有効量は、以下の1つまたは組み合わせを達成することができる：がん細胞の数の低減；腫瘍サイズの低減；末梢器官内へのがん細胞浸潤の抑制（すなわち、ある程度まで減少および/または停止）；腫瘍転移の抑制；腫瘍成長をある程度まで抑制；および/またはがんに関連する症状の1つまたは複数がある程度まで軽減。いくつかの態様において、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、コンパニオンアニマル（例えば、ネコ、イヌ、ウマ）、家畜、使役動物（work animal）、動物園の動物、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用いることができる。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用いられる。

【0579】

いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドもしくは操作された細胞、またはその薬学的組成物は、哺乳類がん細胞（例えばヒトがん細胞）の成長を抑制するために用いることができる。がんを標的とする方法は、がんを有する対象に本明細書に記載される薬学的組成物のいずれかの有効量を投与する工程を含むことができる。有効量の薬学的組成物は、がんの進行を抑制、停止、または元に戻すために投与することができる。ヒトがん細胞はインビボまたはエクスピボで処置することができる。ヒト患者のエクスピボ処置では、がん細胞を含有する組織または体液が体外で処置され、次いで、組織または体液が患者に再導入される。いくつかの態様において、がんは、患者内への治療組成物の投与によって、ヒト患者のインビボで処置される。

【0580】

疾患の非限定的な例としては、がんの全ての種類（乳房、肺、結腸直腸、前立腺、黒色腫、頭頸部、脾臓等）、関節リウマチ、クローン病、SLE、心血管損傷、虚血等が挙げられる。例えば、適用には、T細胞急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）を含む白血病、多発性

10

20

30

40

50

骨髓腫を含むリンパ芽球性疾患、ならびに肺のがん、結腸直腸のがん、前立腺のがん、膵臓のがん、およびトリプルネガティブ乳がんを含む乳房のがんを含む固形腫瘍が挙げられる。例えば、適用には、初代腫瘍起源に関係なく、がんにおける骨の疾患または転移；非限定的例として、ER/PR+乳がん、Her2+乳がん、トリプルネガティブ乳がんを含む乳がん；結腸直腸がん；子宮内膜がん；胃がん（gastric cancer）；神経膠芽腫；食道がんなど頭頸部がん；非限定的例として、非小細胞肺がんなどの肺がん；多発性骨髓腫卵巣がん；膵臓がん；前立腺がん；骨肉腫などの肉腫；非限定的例として、腎細胞がんなどの腎がん；および/または非限定的例として、扁平上皮がん、基底細胞がん、もしくは黒色腫などの皮膚がんが含まれる。いくつかの態様において、がんは扁平上皮がんである。いくつかの態様において、がんは皮膚扁平上皮がんである。いくつかの態様において、がんは食道扁平上皮がんである。いくつかの態様において、がんは頭頸部扁平上皮がんである。いくつかの態様において、がんは肺扁平上皮がんである。

10

【0581】

いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドもしくは操作された細胞、またはその薬学的組成物は、がんまたは他の腫瘍性状態の症状を処置、軽減する、がんまたは他の腫瘍性状態を寛解させる、および/またはその進行を遅らせるのに有用である。いくつかの態様において、がんは、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、卵巣がん、前立腺がん、精巣がん、食道がん、消化管がん、膵臓がん、結腸直腸がん、結腸がん、腎臓がん、頭頸部がん、肺がん、胃がん（stomach cancer）、胚細胞がん、骨がん、肝臓がん、甲状腺がん、皮膚がん、中枢神経系の腫瘍、リンパ腫、白血病、骨髓腫、肉腫、およびウイルス関連がんである。ある特定の態様においてがんは、転移性がん、難治性がん、または再発がんである。

20

【0582】

いくつかの態様において、本開示の5T4結合ポリペプチド、例えば融合タンパク質または多重特異性ポリペプチド構築物の治療的有効量は概して、治療目的を達成するのに必要とされる量に関係する。典型的には、投与されるべき本開示の組成物の正確な量は、患者（患者）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、および状態における個体差を考慮した上で医師によって決定することができる。

【0583】

いくつかの態様において、治療的有効用量は、非限定的例として、約0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重～約10 mg/kg 体重であり得る。いくつかの態様において、治療的有効用量は、非限定的例として、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回の範囲であり得る。

30

【0584】

いくつかの態様において、本開示の操作された細胞組成物の治療量が投与される。一般に、本明細書に記載されるような操作された細胞、例えばT細胞を含む薬学的組成物は、これらの範囲内の全ての整数値を含む、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞/kg体重、例えば $10^5 \sim 10^6$ 細胞/kg体重の投与量で投与され得ると言うことができる。操作された細胞組成物、例えばT細胞組成物はまた、これらの投与量で複数回投与されてもよい。細胞は、免疫療法で一般に知られている注入技術を用いることによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al, New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988を参照）。特定の患者向けの最適な投与量および処置レジメンは、疾患の徴候について患者をモニターし、それによって処置を調整することによって、医学分野の当業者によって容易に決定することができる。

40

【0585】

処置の効能は、特定の障害を診断または処置するための任意の公知の方法に関連して決定される。望ましい特異性を持つ5T4結合ポリペプチドまたはそれと同じものを含有する操作された細胞のスクリーニングのための方法としては、これらに限定されないが、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）および当技術分野において公知の他の免疫を介する技術が挙げられる。提供される5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞の投与が、望ましくない免疫応答を媒介するかまたは媒介することができる免疫細胞を排除、隔離、もし

50

くは不活性化すること；防御免疫応答を媒介するかまたは媒介することができる免疫細胞を誘導、生成、もしくは活性化すること；免疫細胞の物理的または機能的特性を変化させること；またはこれらの作用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どうかを決定するための、多種多様な手段が公知である。免疫学的活性の調節の測定の例としては、これらに限定されないが、免疫細胞集団の有無の検査（フローサイトメトリー、免疫組織化学的検査、組織学的検査、電子顕微鏡検査、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抵抗性を含む、免疫細胞の機能的能力の測定（例えば、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、PMA（ホルボール12-ミリストート13-アセタート）、ペプチドまたはタンパク質抗原を積載した抗原提示細胞による刺激後の3H-チミジン組み込みに基づく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用いて）；他の細胞を殺傷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、および細胞の他の産物の測定（例えば、フローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着検定法、ウエスタンブロット解析、タンパク質マイクロアレイ分析、免疫沈降分析による）；免疫細胞の活性化または免疫細胞内のシグナル伝達経路の生化学的マーカーの測定（例えば、チロシン、セリン、またはスレオニンリン酸化、ポリペプチド切断、およびタンパク質複合体の形成または解離のウエスタンブロット解析および免疫沈降分析；プロテインアレイ分析；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用いるDNA転写プロファイリング）；アポトーシス、ネクローシス、または他のメカニズム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、組織学的検査；蛍光発生カスパーゼアッセイ、カスパーゼ基質のウエスタンブロット解析）；免疫細胞によって生成された遺伝子、タンパク質、および他の分子の測定（例えば、ノーザンブロット解析、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、2次元ゲル電気泳動、ウエスタンブロット解析、酵素結合免疫吸着検定法、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の測定による、臨床症状または臨床転帰、例えば、自己タンパク質または自己ポリペプチドに関する自己免疫疾患、神経変性疾患、および他の疾患の改善の測定（臨床スコア、追加療法の使用の必要性、機能状態、画像診断）が挙げられる。

【0586】

提供される5T4結合ポリペプチドはまた、多種多様な診断用および予防用製剤でも有用である。1つの態様において、5T4結合ポリペプチドは、前述の障害の1つまたは複数を発症するリスクがある患者に投与される。障害の1つまたは複数に対する患者または器官の素因は、遺伝子型、血清型、または生化学的マーカーを用いて決定することができる。

【0587】

本開示の別の態様において、5T4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つまたは複数に関連する臨床適応症と診断されているヒト個体に投与される。診断時に、そのような治療剤は、臨床適応症の影響を軽減するまたは元に戻すために投与される。

【0588】

組み合わせ療法

本開示の5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、単独でまたは他の処置の様式、例えば抗がん剤との組み合わせで投与することができる。それらは、他の処置の様式の前に、それと実質的に同時期に、またはその後（すなわち、同時にまたは連続して）提供することができる。いくつかの態様において、本明細書に記載される処置の方法は、放射線療法、化学療法、ワクチン接種、標的指向腫瘍療法、CAR-T療法、腫瘍溶解性ウイルス療法、がん免疫療法、サイトカイン療法、外科的切除、クロマチン改変、アブレーション、寒冷療法、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microRNA剤もしくは抗がん/腫瘍剤、または生物学的製剤、例えば、抗体、サイトカイン、もしくは受容体細胞外ドメイン-Fc融合物を施与することをさらに含み

得る。

【 0 5 8 9 】

いくつかの態様において、本明細書において提供される5T4結合ポリペプチドは、1つまたは複数の化学療法剤、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/または他のチェックポイント分子、例えば、VISTA、gpNMB、B7H4、HHLA2、CD73、CTLA4、TIGIT等を標的とする剤と同時に与えられる。

【 0 5 9 0 】

いくつかの態様において、本開示の5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、他の抗腫瘍剤、例えば、抗HER-2抗体、抗CD20抗体、上皮増殖因子受容体（EGFR）アンタゴニスト（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））、血小板由来増殖因子阻害剤（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-、BlyS、APRIL、BCMA、PD-1、PDL1、PDL2、CTLA4、もしくはVEGF受容体、TRAIL/Apo2の1つまたは複数に結合するアンタゴニスト（例えば、中和抗体）、ならびに他の生理活性剤および有機化学剤等との組み合わせで用いられる。

【 0 5 9 1 】

いくつかの態様において、本明細書において提供される5T4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（Tesarro/AnaptysBio、ANB-011）；STI-A1010（Sorrento Therapeutics）；STI-A1110（Sorrento Therapeutics）；およびプログラム死（programmed death）-1（PD-1）またはプログラム死リガンド 1（PD-L1）に対して向けられている他の剤が挙げられる。

【 0 5 9 2 】

いくつかの態様において、本開示の5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、化学療法剤との組み合わせで用いられてもよい。化学療法剤の例としては、これらに限定されないが、チオテパおよびCYTOXAN（登録商標）シクロホスファミドなどのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファンなどのアルキルスルホネート；ベンゾドパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドパ（meturedopa）、およびウレドパ（uredopa）などのアジリジン；アルトレートアミン（altretamine）、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（triethylenethiophosphoramidate）、およびトリメチローロメラミン（trimethylolomelamine）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（特にプラタシンおよびプラタシノン）；カンプトテシン（合成類似体トポテカンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびピ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）；エリユテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン（chlornaphazine）、クロロホスファミド、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、ノベムビシン（novembichin）、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどの窒素マスタード；カルムスチン、クロロゾトシン

、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムヌスチン (ranimnustine) などのニトロソ尿素；エンジン抗生物質（例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシン 11 およびカリケアミシン 11（例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994) を参照）などの抗生物質；ジネミシン A を含むジネミシン；クロドナートなどのビスホスホナート；エスベラミシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモホアおよび関連色素タンパク質エンジン抗生物質クロモホア）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オウトラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン (carabycin)、カミノマイシン、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) ドキソルピシン (モルホリノ-ドキソルピシン、シアノモルホリノ-ドキソルピシン、2-ピロリノ-ドキソルピシン、およびデオキシドキソルピシンを含む)、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 C などのマイトマイシン、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 (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルピシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗薬、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 (pteropterin)、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、アンシタビン、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、エノシタビン、フロクスウリジン；男性ホルモン剤、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；葉酸補充薬、例えば、フロリン酸 (frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド (aldophosphamide glycoside)；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 (edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルチン；ジアジクオン；エルフォルミチン (elfornithine)；酢酸エリブチニウム；エボチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン (lonidainine)；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；モピダモール (mopidanmol)；ニトラエリン (nitraerine)；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；トリアジコン；2,2',2"-トリクロロトリエチルアミン；トリコテシン（特に、T-2 トキシシン、ベラクリン A (verracurin A)、ロリジン A、およびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン (gacytosine)；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 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE (登録商標) パクリタキセルのクレモフォールを含まないアルブミン操作されたナノ粒子製剤 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、および TAXOTERE (登録商標) ドセタキセル (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；GEMZAR (登録商標) ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチン；ビンブラスチン；白金；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) ビノレルビン；ノバントロン；テニボシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ (xeloda)；イバンドロナート；イリノテカン (Camptosar, CP T-11) (イリノテカンの 5-FU およびロイコボリンとの処置レジメンを含む)；トポイ

ソメラゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸などのレチノイド；カペシタピン；コンプレタスタチン；ロイコボリン（LV）；オキサリプラチン処置レジメンを（FOLFOX）を含むオキサリプラチン；細胞増殖を低下させる、PKC-、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。

【0593】

さらなる非限定的な例示的な化学療法剤としては、がんに対するホルモンの作用を調節または抑制するように作用する抗ホルモン剤、例えば、タモキシフェン（NOLVADEX（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調節剤（SERM）；副腎におけるエストロゲン産生を調節する、酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、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）酢酸メゲストロール、AROMASIN（登録商標）エキセメスタン、ホルメスタニー（formestanie）、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；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）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、具体的には、異常な細胞増殖に関するシグナル伝達経路における遺伝子、例えば、PKC-、Ralf、およびH-Rasなど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；ABARELIX（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、または誘導体が挙げられる。

【0594】

いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドおよび追加の剤は、単一の治療的組成物内に処方され、5T4結合ポリペプチドおよび追加の剤は、同時に投与される。あるいは、5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、互いに分かれている、例えば、各々が別個の治療的組成物内に処方され、5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、同時に投与されるか、または5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、処置レジメンの間の異なる時点で投与される。例えば、5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、追加の剤の投与前に投与されるか、5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞は、追加の剤の投与に続いて投与されるか、または5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、交互に投与される。5T4結合ポリペプチドおよび追加の剤は、単回用量でまたは複数回用量で投与されてもよい。

【0595】

いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、同時に投与される。例えば、5T4結合ポリペプチドおよび追加の剤は、単一組成物で処方されるか、または2つ以上の別々の組成物として投与され得る。いくつかの態様において、5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、連続して投与されるか、または5T4結合ポリペプチドまたは操作された細胞および追加の剤は、処置レジメンの間の異なる時点で投与される。

【0596】

VII. 例示的な態様

提供される態様は以下のとおりである：

10

20

30

40

50

1 .

5T4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（5T4 VHHドメイン）と、5T4以外の標的に結合する1つまたは複数の追加の結合ドメインとを含む、5T4結合ポリペプチド構築物。

2 .

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、

SEQ ID NO: 86 ~ 87、および288 ~ 292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）；

SEQ ID NO: 88 ~ 99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2（CDR2）；ならびに

SEQ ID NO: 100 ~ 102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3（CDR3）

を含む、態様1の5T4結合ポリペプチド構築物。

3 .

SEQ ID NO: 86 ~ 87、および288 ~ 292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）；

SEQ ID NO: 88 ~ 99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2（CDR2）；ならびに

SEQ ID NO: 100 ~ 102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3（CDR3）

を含む、少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイン（5T4 VHHドメイン）

を含む、5T4結合ポリペプチド構築物。

4 .

前記5T4がヒト5T4である、態様1 ~ 3のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

5 .

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインがヒト化されている、態様1 ~ 4のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

6 .

前記1つまたは複数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、態様1、2、4、および5のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

7 .

前記免疫細胞がT細胞である、態様6の5T4結合ポリペプチド構築物。

8 .

前記活性化受容体がCD3（CD3）である、態様6または7の5T4結合ポリペプチド構築物。

9 .

5T4およびCD3に対して二重特異性である、態様8の5T4結合ポリペプチド構築物。

10 .

前記免疫細胞がナチュラルキラー（NK）細胞である、態様6の5T4結合ポリペプチド構築物。

11 .

前記活性化受容体がCD16（CD16a）である、態様6または10の5T4結合ポリペプチド構築物。

12 .

5T4およびCD16aに対して二重特異性である、態様11の5T4結合ポリペプチド構築物。

13 .

前記1つまたは複数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、態様1、2、4、および5のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

14 .

前記1つまたは複数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、態様

10

20

30

40

50

1、2、および4～13のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

15.

前記1つまたは複数の追加の結合ドメインが一価である、態様1、2、および4～14のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

16.

前記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、シングルドメイン抗体(sdAb)である、態様14または15の5T4結合ポリペプチド構築物。

17.

前記1つまたは複数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できるその切断型断片もしくはバリエーションである、態様13の5T4結合ポリペプチド構築物。

18.

前記サイトカインが、インターフェロンであるか、またはその切断型断片もしくはバリエーションである、態様17の5T4結合ポリペプチド構築物。

19.

前記インターフェロンが、I型インターフェロンもしくはII型インターフェロン、またはI型インターフェロンの切断型断片もしくはバリエーション、またはII型インターフェロンの切断型断片もしくはバリエーションである、態様18の5T4結合ポリペプチド構築物。

20.

前記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、またはその切断型断片もしくはバリエーションであり、あるいは

前記II型インターフェロンが、IFN-ガンマであるか、またはその切断型断片もしくはバリエーションである、

態様19の5T4結合ポリペプチド構築物。

21.

免疫グロブリンFc領域を含む、態様1～20のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

22.

前記ポリペプチドが、

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインと前記1つまたは複数の追加の結合ドメインとを連結する免疫グロブリンFc領域

を含む、態様1、2、および4～21のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

23.

二量体である、態様1～22のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

24.

前記Fc領域がホモ二量体Fc領域である、態様21～23のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

25.

前記Fc領域が、SEQ ID NO: 8、10、11、12、もしくは13のいずれかに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 8、10、11、12、もしくは13のいずれかに対して少なくとも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、態様21～24のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

26.

前記Fc領域がヒトIgG1である、態様21～25のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

27.

前記Fc領域が、SEQ ID NO: 8に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 8に対して少なくとも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、態

10

20

30

40

50

様26の5T4結合ポリペプチド構築物。

28.

前記Fc領域がヘテロ二量体Fc領域である、態様21～23のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

29.

前記Fc領域がエフェクター機能を示す、態様21～28のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

30.

前記Fc領域が、

エフェクター機能を低減させ、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に対する結合を低減させる、1つまたは複数のアミノ酸改変を含むポリペプチド

10

を含む、態様21～29のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

31.

前記1つまたは複数のアミノ酸改変が、Glu233、Leu234、またはLeu235のうちの1つまたは複数の欠失である、態様30の5T4結合ポリペプチド構築物。

32.

前記Fc領域が、SEQ ID NO: 9に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 9に対して少なくとも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、態様30または31の5T4結合ポリペプチド構築物。

20

33.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 245～253、255～287、294、295、302、および360のいずれかに示される配列、またはSEQ ID NO: 245～253、255～287、294、295、302、および360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様1～32のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

34.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、ヒト5T4のエピトープに結合するが、マウス5T4との交差反応結合は示さない、態様1～33のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

30

35.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382のアミノ酸60～112間のアミノ酸残基に結合する、態様1～34のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

36.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382のアミノ酸173～224間のアミノ酸残基に結合する、態様1～35のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

37.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 245に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 245のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 245に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様1～36のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

40

38.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、

SEQ ID NO: 288および289からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびに

SEQ ID NO: 100に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様1～37のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

50

39.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO: 288、88、および100、またはそれぞれSEQ ID NO: 289、88、および100に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様1~38のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

40.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 246~253、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 246~253、および360に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様1~39のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

10

41.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 246~253、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様1~40の5T4結合ポリペプチド構築物。

42.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 255に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 255のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 255に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様1~36のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

20

43.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 86、290~292からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1; SEQ ID NO: 89~94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;およびSEQ ID NO: 101に示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、態様1~36および42のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

44.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO: 290、90、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、92、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 292、94、および101;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、94、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様1~36、42、および43のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

30

45.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 256~275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 256~275に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様1~36、および42~44のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

40

46.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 256~275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様1~36、および43~45のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

47.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 276に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 276のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 276に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様1~36のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

50

48.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、
SEQ ID NO: 86および87からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;
SEQ ID NO: 95~99からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびに
SEQ ID NO: 102に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、態様1~33、および47のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

49.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO: 87、95、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、96、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、97、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、99、
および102;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、98、および102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様1~36、47、および48のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

10

50.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 277~287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 277~287に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様1~36、および47~49のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

20

51.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 277~287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様1~36、および47~50の5T4結合ポリペプチド構築物。

52.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 294に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様1~36のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

30

53.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、
SEQ ID NO: 296に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;
SEQ ID NO: 298に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および
SEQ ID NO: 300に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、態様1~36および52のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

54.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、態様1~36および52のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

55.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、
SEQ ID NO: 288、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;ならびに/または
SEQ ID NO: 88、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2
を含む、態様1~36、および52のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

40

56.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 295に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 295のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 295に対して少なくとも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、かつ5

50

T4に結合する、態様1～36のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

57.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、

SEQ ID NO: 297に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 299に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 301に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様1～36、および56のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

58.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 302に示される配列、

(ii) SEQ ID NO: 302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 302に対し

て少なくとも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、かつ5

T4に結合する、態様1～36のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

59.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、

SEQ ID NO: 288に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 303に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様1～36、および56のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

60.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、(i) SEQ ID NO: 294、295、もしくは

302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302のヒト化バリエア

ント、または(iii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に対して少なくとも85%、8

6%、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、かつ5T4に結合する、態様1

～36のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

61.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、それぞれSEQ ID NO: 296、298、およ

び300;それぞれSEQ ID NO: 297、299、および301;またはそれぞれSEQ ID NO: 2

88、88、および303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様1～36、お

よび60のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物。

62.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 245、249、255、270、2

76、294、295、または302に示される、態様1～36、60、および61のいずれかの5T

4結合ポリペプチド構築物。

63.

(a) 第1のFcポリペプチドと第2のFcポリペプチドとを含むヘテロ二量体Fc領域を含む

、第1の構成要素、および(b)可変重鎖領域(VH)と可変軽鎖領域(VL)とを含む抗C

D3抗体または抗原結合断片を含む、第2の構成要素

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構成するVHおよびVLが、ヘテロ二量体Fcの相対する

ポリペプチドに連結されており、
第1および第2の構成要素が、リンカーによりカップリングされ、ヘテロ二量体Fc領域が、

抗CD3抗体のN末端に位置づけられ;かつ

第1および第2の構成要素の一方または両方が、少なくとも1つの重鎖のみの可変ドメイ

ン(5T4 VHHドメイン)を含む、

多重特異性ポリペプチド構築物。

64.

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C

D3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;ならび

10

20

30

40

50

に (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、任意で、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ドメインのもう一方を含む、第2のポリペプチド

を含み、

第1および第2のポリペプチドの一方または両方が、少なくとも1つの5T4 VHHドメインを含む、

態様63の多重特異性ポリペプチド構築物。

65.

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1および前記第2のFcポリペプチドの一方または両方が、ホモ二量体Fc領域のポリペプチドと比べて、任意で、SEQ ID NO: 8に示されるFcポリペプチドまたはその免疫活性断片と比べて、ヘテロ二量体化を誘導する少なくとも1つの改変を含む、態様63または64の多重特異性ポリペプチド構築物。

66.

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1および前記第2のFcポリペプチドの各々が、独立して、少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、態様65の多重特異性ポリペプチド構築物。

67.

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1および前記第2のFcポリペプチドの各々が、ノブ-イントゥ-ホール(knob-into-hole)改変を含む、または該ポリペプチドの静電的相補性を増加させる電荷の変異を含む、態様65または66の多重特異性ポリペプチド構築物。

68.

前記アミノ酸改変がノブ-イントゥ-ホール改変である、態様65~67の多重特異性ポリペプチド構築物。

69.

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第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改変を含み、かつ前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、改変Thr366Trpを含む、態様63~68のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

70.

前記第1および前記第2のFcポリペプチドが、非システイン残基のシステイン残基への改変をさらに含み、該第1のポリペプチドの改変が、位置Ser354およびTyr349のうちの一方にあり、かつ該第2のFcポリペプチドの改変が、位置Ser354およびTyr349のうちのもう一方にある、態様69の多重特異性ポリペプチド。

71.

前記アミノ酸改変が、前記ポリペプチドの静電的相補性を増加させる電荷の変異である、態様65~67のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

72.

前記第1および/もしくは前記第2のFcポリペプチド、または前記第1および前記第2のFcポリペプチドの各々が、相補的な位置にアミノ酸改変を含み、該改変が、もう一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換である、態様63~67、および71のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

73.

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1または前記第2のFcポリペプチドのうちの一方が、残基Ile253に改変をさらに含む、態様63~72のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

74.

前記改変がIle253Argである、態様73の多重特異性ポリペプチド構築物。

75.

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1または前記第2のFcポリペプチドのうちの一方が、残基His435に改変をさらに含む、態様63~74のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

20

30

40

50

76 .

前記改変がHis435Argである、態様75の多重特異性ポリペプチド構築物。

77 .

前記Fc領域が、Lys447を欠如しているポリペプチドを含む、態様63～76のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

78 .

前記Fc領域が、FcRn結合を増強する少なくとも1つの改変を含むポリペプチドを含む、態様63～77のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

79 .

前記少なくとも1つの改変が、Met252、Ser254、Thr256、Met428、Asn434、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される位置にある、態様78の多重特異性ポリペプチド構築物。

10

80 .

前記少なくとも1つの改変が、Met252Y、Ser254T、Thr256E、Met428L、Met428V、Asn434S、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、態様78または79の多重特異性ポリペプチド構築物。

81 .

前記少なくとも1つの改変が、位置Met252および位置Met428にある、態様78～80のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

82 .

20

前記少なくとも1つの改変が、Met252YおよびMet428Lである、態様78～81のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

83 .

前記少なくとも1つの改変が、Met252YおよびMet428Vである、態様78～81のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

84 .

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 103、107、115、117、328、または334のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつ前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 104、108、111、113、119、121、329、332、または336のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、態様63～83のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

85 .

前記Fc領域が、エフェクター機能を低減させ、かつ/またはFcガンマ受容体およびC1qから選択されるエフェクター分子に対する結合を低減させる、少なくとも1つのアミノ酸改変を含むポリペプチド

を含む、態様21～84のいずれかのポリペプチド構築物。

86 .

前記少なくとも1つのアミノ酸改変が、Glu233、Leu234、およびLeu235のうちの1つまたは複数の欠失である、態様85の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

87 .

前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 105、109、116、118、330、または335のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含み、かつ前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチドが、SEQ ID NO: 106、110、112、114、120、122、331、333、または337のいずれかに示されるアミノ酸の配列を含む、態様63～86のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

88 .

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が一価である、態様63～87のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

89 .

50

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、一本鎖抗体ではなく、任意で、一本鎖可変断片（scFv）ではない、態様63～88のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

90.

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、Fv抗体断片である、態様63～89のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

91.

前記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、態様90の多重特異性ポリペプチド構築物。

92.

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、
アミノ酸配列TYAMN（SEQ ID NO: 29）を含むVH CDR1；
アミノ酸配列
RIRSKYNNYATYYADSVKD（SEQ ID NO: 30）

10

を含むVH CDR2；
アミノ酸配列
HGNFGNSYVSWFAY（SEQ ID NO: 31）

を含むVH CDR3、
アミノ酸配列
RSSTGAVTTSNYAN（SEQ ID NO: 32）

20

を含むVL CDR1；
アミノ酸配列GTNKRAP（SEQ ID NO: 33）を含むVL CDR2；および
アミノ酸配列ALWYSNLWV（SEQ ID NO: 34）を含むVL CDR3
を含む、態様63～91のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

93.

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、
SEQ ID NO: 27、35～65、341、343、および358のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 27、35～65、341、343、および358のいずれかに対して少なくとも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し、かつCD3に結合する、VH；
SEQ ID NO: 28、66～84、293、340、および342のいずれかのアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 28、66～84、293、340、および342、および293のいずれかに対して少なくとも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し、かつCD3に結合する、VL
を含む、態様63～92のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

94.

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 75のアミノ酸配列を含む、態様63～93のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

95.

前記抗CD3抗体または抗原結合断片が、SEQ ID NO: 47のアミノ酸配列およびSEQ ID NO: 293のアミノ酸配列を含む、態様63～93のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

96.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、前記多重特異性ポリペプチド構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/または前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、態様63～92のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

97.

50

5T4に特異的に結合する第1の5T4 VHHドメインと、5T4に特異的に結合する第2の5T4 VHHドメインを含む、態様63～96のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

98.

前記第1または前記第2の5T4 VHHドメインが、前記多重特異性構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端に位置づけられ、かつ該第1または該第2の5T4 VHHドメインのもう一方が、該多重特異性構築物の前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、態様97の多重特異性ポリペプチド構築物。

99.

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、5T4に結合する第1の5T4 VHHドメイン、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチド、前記リンカー、前記抗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5T4に結合する第2の5T4 VHHドメインを含み;かつ

前記第2の構成要素が、N末端からC末端への順序で、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチド、前記リンカー、任意で、前記第1の構成要素中に存在するのと同じリンカー、および前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方を含む、

態様97または98の多重特異性ポリペプチド構築物。

100.

前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインが同じである、態様97～99のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

101.

前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインが異なっている、態様97～99のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

102.

前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインが、5T4の別個のもしくは重複しないエпитープに結合し、かつ/または5T4に対する結合について競合しない、態様101の多重特異性ポリペプチド構築物。

103.

前記第1の5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 245～253、295、302、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO: 245～253、295、302、および360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合し;かつ

前記第2の5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 255～287、294、302のいずれか1つに示されるアミノ酸配列、そのヒト化バリエーション、またはSEQ ID NO: 255～287、294、302のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、
態様102の多重特異性ポリペプチド構築物。

104.

前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 294;SEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 276;SEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 255;SEQ ID NO: 245およびSEQ ID NO: 295;SEQ ID NO: 295およびSEQ ID NO: 294;SEQ ID NO: 249およびSEQ ID NO: 270;SEQ ID NO: 302およびSEQ ID NO: 302;またはSEQ ID NO: 360およびSEQ ID NO: 287から選択される、態様102の多重特異性ポリペプチド構築物。

105.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 245～253、255～287、294、295、302、および360のいずれかに示されるVHHドメイン配列、またはSEQ ID NO: 245～2

10

20

30

40

50

53、255～287、294、295、302、および360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様63～104のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

106.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、ヒト5T4のエピトープに結合するが、マウス5T4との交差反応結合は示さない、態様63～105のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

107.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382のアミノ酸60～112間のアミノ酸残基に結合する、態様63～106のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

108.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメインが、SEQ ID NO: 382のアミノ酸173～224間のアミノ酸残基に結合する、態様63～107のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

109.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 245に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 245のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 245に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様63～108のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

110.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO: 86～87、および288～292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 88～99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびに

30

SEQ ID NO: 100～102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様63～109のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

111.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO: 288、88、および100;それぞれSEQ ID NO: 289、88、および100;それぞれSEQ ID NO: 290、89、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、90、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、92、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 292、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 86、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 87、95、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、96、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、97、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、99、および102;それぞれSEQ ID NO: 86、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 296、298、および300;それぞれSEQ ID NO: 297、299、および301;またはそれぞれSEQ ID NO: 288、88、および303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様63～110のいずれかの多重特異性構築物。

40

112.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHド

50

メインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 246 ~ 253、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 246 ~ 253、および360に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様63 ~ 111のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

1 1 3 .

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 246 ~ 253、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様63 ~ 112のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

1 1 4 .

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 255に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 255のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 255に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様63 ~ 108のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

1 1 5 .

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、

20

SEQ ID NO: 86、290 ~ 292からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 89 ~ 94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 101に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様63 ~ 108、および114のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

1 1 6 .

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO: 290、89、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、90、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、92、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 292、94、および101;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、94、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様63 ~ 108、114、および115のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

1 1 7 .

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 256 ~ 275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 256 ~ 275に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様63 ~ 108、および114 ~ 116のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

1 1 8 .

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 256 ~ 275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様63 ~ 108、および114 ~ 117の多重特異性ポリペプチド構築物。

1 1 9 .

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 276に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 276のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 276に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態

50

様63～108のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

120.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO: 86および87からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 95～99からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびに

SEQ ID NO: 102に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様63～108、および119のいずれかの多重特異性ポリペプチド。

121.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO: 87、95、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、96、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、97、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、99、および102;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、98、および102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様63～108、119、および120のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

122.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 277～287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 277～287に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様63～108、および119～121のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

123.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 277～287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様63～108、および119～122のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

124.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 294に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様63～108のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

30

125.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO: 296に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 298に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 300に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様63～108、および124のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

40

126.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 295に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 295のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 295に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様63～106のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

127.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHド

50

メインの各々が、独立して、

SEQ ID NO: 297に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 299に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 301に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様63~106、および126のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

128.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様63~106のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

129.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、

SEQ ID NO: 288に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 303に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様63~106、および126のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

130.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、(i) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様63~106のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

131.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、それぞれSEQ ID NO: 296、298、および300;それぞれSEQ ID NO: 297、299、および301;またはそれぞれSEQ ID NO: 288、88、および303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様63~106、および130のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

132.

前記少なくとも1つの5T4 VHHドメイン、または前記第1および前記第2の5T4 VHHドメインの各々が、独立して、SEQ ID NO: 245、249、255、270、276、294、295、302、または360に示される、態様63~106、130、および131のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

133.

前記第1および前記第2の構成要素の一方または両方が、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(CRBR)を含む、態様63~132のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

134.

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域(CRBR)が、前記多重特異性ポリペプチド構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/または前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、態様133の多重特異性ポリペプチド構築物。

135.

共刺激受容体結合領域(CRBR)を1つだけ含む、態様133または134の多重特異性ポリペプチド構築物。

136.

10

20

30

40

50

同じであっても異なっているもよい2つの共刺激受容体結合領域 (CRBR) を含む、態様133~135のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

137.

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域 (CRBR) が、前記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、または前記共刺激受容体に対する結合活性を示すそのバリエーションである、あるいはそれを含む、態様133~136のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

138.

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域 (CRBR) が、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片である、態様133~136のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

139.

前記抗体またはその抗原結合断片が、Fv、scFv、Fab、またはシングルドメイン抗体 (sdAb) である、態様138の多重特異性ポリペプチド構築物。

140.

前記抗体または抗原結合断片がsdAbである、態様138または139の多重特異性ポリペプチド構築物。

141.

前記sdAbが、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、態様140の多重特異性ポリペプチド構築物。

142.

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域 (CRBR) 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CAMLインタラクター (Transmembrane activator and CAML interactor) (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、態様133~141のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

143.

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域 (CRBR) が、41BB (CD137)、OX40 (CD134)、およびグルコシルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質 (GITR) のの中から選択される共刺激受容体に結合する、態様133~142のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

144.

前記少なくとも1つの共刺激受容体結合領域 (CRBR) が、SEQ ID NO: 210に示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 210に示される配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有する配列、を含み、かつ4-1BBに結合する、態様133~143のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

145.

前記第1および前記第2の構成要素の一方または両方が、抑制性受容体に結合する少なくとも1つの抑制性受容体結合領域 (IRBR) を含む、態様63~144のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

146.

前記少なくとも1つの抑制性受容体結合領域 (IRBR) が、前記多重特異性ポリペプチド構築物の前記Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/または前記CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、態様145の多重特異性ポリペプチド構築物。

147.

抑制性受容体結合領域 (IRBR) を1つだけ含む、態様145または146の多重特異性ポリ

10

20

30

40

50

ペプチド構築物。

148.

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、5T4に結合する第1の5T4 VHHドメイン、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチド、前記リンカー、前記抗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5T4に結合する第2の5T4 VHHドメインを含み;かつ

前記第2の構成要素が、IRBRを含み、かつ、N末端からC末端への順序で、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第2のFcポリペプチド、前記リンカー、任意で、前記第1の構成要素に存在するのと同じリンカー、前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方を含み、

該IRBRが、該第2の構成要素の該Fc領域に対してアミノ末端に、かつ/または該抗CD3抗体または抗原結合断片に対してカルボキシ末端に位置づけられた、

態様145~147のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

149.

前記少なくとも1つのIRBRが、

前記抑制性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、または前記抑制性受容体に対する結合活性を示すそのバリエーション

である、あるいはそれを含む、態様145~148のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

150.

前記少なくとも1つのIRBRが、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、scFv、scAb、dAb、シングルドメイン重鎖抗体、およびシングルドメイン軽鎖抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合断片である、態様139~142のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

151.

前記抗体またはその抗原結合断片が、Fv、scFv、Fab、シングルドメイン抗体(sdAb)である、態様150の多重特異性ポリペプチド構築物。

152.

前記抗体または抗原結合断片がsdAbである、態様150または151の多重特異性ポリペプチド構築物。

153.

前記sdAbが、ヒトsdAbまたはヒト化sdAbである、態様152の多重特異性ポリペプチド構築物。

153.

前記少なくとも1つのIRBRが、PD-1、CTLA-4、TIGIT、VISTA、およびTIM3の中から選択される抑制性受容体に結合する、態様145~153のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

155.

前記少なくとも1つのIRBRが、PD-1に結合する、態様145~154のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

156.

前記第1の構成要素が、N末端からC末端への順序で、5T4に結合する第1の5T4 VHHドメイン、前記ヘテロ二量体Fc領域の前記第1のFcポリペプチド、前記リンカー、前記抗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5T4に結合する第2の5T4 VHHドメインを含み;かつ

前記第2のポリペプチドが、N末端からC末端への順序で、前記IRBRまたは前記CRBRの一方、前記ヘテロ二量体Fc領域の第2のFcポリペプチド、前記リンカー、任意で、前記第1の構成要素に存在するのと同じリンカー、前記抗CD3抗体または抗原結合断片のVHまたはVLドメインのもう一方、および前記CRBRまたは前記IRBRのもう一方を含む、

態様145~155のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

10

20

30

40

50

157.

前記リンカーが、ペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカーであり、任意で、該リンカーが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、態様63～156のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

158.

前記リンカーが、切断不可能なリンカーである、態様63～157のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

159.

前記切断不可能なリンカーが、GGである、またはGGを含む、態様158の多重特異性ポリペプチド構築物。

160.

前記切断不可能なリンカーが、GS, GGS, GGGGS (SEQ ID NO:125), GGGGGS (SEQ ID NO:126)

10

、またはそれらの組み合わせを含む、態様158の多重特異性ポリペプチド構築物。

161.

前記リンカーが、配列
GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:127)

である、またはそれを含む、態様63～158のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

20

162.

前記リンカーが、切断可能リンカーである、態様63～157のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

163.

前記切断可能リンカーが、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、態様162の多重特異性ポリペプチド構築物。

164.

前記プロテアーゼが、免疫エフェクター細胞により、腫瘍細胞により、または腫瘍微小環境に存在する細胞により産生される、態様163の多重特異性ポリペプチド構築物。

30

165.

前記プロテアーゼが、免疫エフェクター細胞により産生され、該免疫エフェクター細胞が、活性化したT細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、またはNK T細胞である、態様163または164の多重特異性ポリペプチド構築物。

166.

前記プロテアーゼが、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の中から選択される、態様163～165のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

167.

前記プロテアーゼがグランザイムBである、態様166の多重特異性ポリペプチド構築物。

40

168.

前記切断可能リンカーが、アミノ酸配列
GGSGGGIEPDIGGSGGS (SEQ ID NO:171)

を含む、態様163～167のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物。

169.

SEQ ID NO: 86～87および288～292、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域1（CDR1）；

SEQ ID NO: 88～99、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域2（CDR2）；ならびに

50

SEQ ID NO: 100~102、300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む相補性決定領域3 (CDR3)

を含む、5T4に結合する単離されたシングルドメイン抗体 (sdAb)。

170.

前記少なくとも1つの5T4 VHドメインが、ヒト5T4のエピトープに結合するが、マウス5T4との交差反応結合は示さない、態様169の単離されたシングルドメイン抗体 (sdAb)。

171.

前記少なくとも1つの5T4 VHドメインが、SEQ ID NO: 382のアミノ酸60~112間のアミノ酸残基に結合する、態様169または170の単離されたシングルドメイン抗体 (sdAb)。

10

172.

前記少なくとも1つの5T4 VHドメインが、SEQ ID NO: 382のアミノ酸173~224間のアミノ酸残基に結合する、態様169~171のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体 (sdAb)。

173.

SEQ ID NO: 245~253、255~287、294、295、302、および360のいずれかに示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 245~253、255~287、294、295、302、および360のいずれかに対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様169の単離されたシングルドメイン抗体。

20

174.

前記シングルドメイン抗体が、(i) SEQ ID NO: 245に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 245のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 245に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様169~173のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

175.

前記sdAbが、

30

SEQ ID NO: 288および289からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびに

SEQ ID NO: 100に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様169~174のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

176.

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO: 288、88、および100;またはそれぞれSEQ ID NO: 289、88、および100に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様169~175のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

177.

前記sdAbが、SEQ ID NO: 246~253、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 246~253、および360に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様169~176のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

40

178.

前記sdAbが、SEQ ID NO: 246~253、および360のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様169~177のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

179.

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 255に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 255のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 255に対して少なくとも85%、86%、87%

50

、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、かつ5T4に結合する、態様169~173のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

180.

前記sdAbが、

SEQ ID NO: 86、290~292に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 89~94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;および

SEQ ID NO: 101に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様169~173、および179のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

181.

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO: 290、89、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、90、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、91、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、92、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、93、および101;それぞれSEQ ID NO: 290、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 291、94、および101;それぞれSEQ ID NO: 292、94、および101;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、94、および101に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様169~173、179、および180のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

182.

前記sdAbが、SEQ ID NO: 256~275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 256~275に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様169~173、および179~181のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

183.

前記sdAbが、SEQ ID NO: 256~275のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様169~173、および179~182のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

184.

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 276に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 276のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 276に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様169~173のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

185.

前記sdAbが、

SEQ ID NO: 86および87からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;

SEQ ID NO: 95~99からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2;ならびに

SEQ ID NO: 102に示されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む、態様169~173、または184のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

186.

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO: 87、95、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、96、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、97、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、98、および102;それぞれSEQ ID NO: 87、99、および102;またはそれぞれSEQ ID NO: 86、98、および102に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様169~173、184、および185のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

187.

前記sdAbが、SEQ ID NO: 277~287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO: 277~287に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様169~173、および184~186のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

10

20

30

40

50

188.

前記sdAbが、SEQ ID NO: 277～287のいずれか1つに示されるアミノ酸の配列を含む、態様169～173、および184～187のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

189.

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 294に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 294に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様169～173のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

190.

前記sdAbが、
SEQ ID NO: 296に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;
SEQ ID NO: 298に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および
SEQ ID NO: 300に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、態様169～173、または189の単離されたシングルドメイン抗体。

191.

前記sdAbが、SEQ ID NO: 300、301、および303からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む、態様169～173、または189の単離されたシングルドメイン抗体。

192.

前記sdAbが、
SEQ ID NO: 288、296、および297からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1;ならびに/または
SEQ ID NO: 88、298、および299からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR2
を含む、態様169～173、または189の単離されたシングルドメイン抗体。

193.

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 295に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 295のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 295に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様169～173のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

194.

前記sdAbが、
SEQ ID NO: 297に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;
SEQ ID NO: 299に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および
SEQ ID NO: 301に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、態様169～173、および193のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

195.

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 302のヒト化バリエーション、または(iii) SEQ ID NO: 302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様169～173のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

196.

前記sdAbが、
SEQ ID NO: 288に示されるアミノ酸配列を含むCDR1;
SEQ ID NO: 88に示されるアミノ酸配列を含むCDR2;および
SEQ ID NO: 303に示されるアミノ酸配列を含むCDR3
を含む、態様169～173、および193のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

197.

10

20

30

40

50

前記sdAbが、(i) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に示される配列、(ii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302のヒト化パリアント、または(iii) SEQ ID NO: 294、295、もしくは302に対して少なくとも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、かつ5T4に結合する、態様169~173のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

198.

前記sdAbが、それぞれSEQ ID NO: 296、298、および300;それぞれSEQ ID NO: 297、299、および301;またはそれぞれSEQ ID NO: 288、88、および303に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、態様169~173、および197のいずれかの単離されたシングルドメイン抗体。

10

199.

態様1~62のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物をコードする、ポリヌクレオチド。

200.

態様63~168のいずれか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。

201.

態様63~168のいずれか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、該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、

20

該第1の核酸配列と該第2の核酸配列とが、配列内リボソーム進入部位(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り、隔てられている、

ポリヌクレオチド。

202.

前記第1の核酸配列および前記第2の核酸配列が、同じプロモーターに機能的に連結されている、態様201のポリヌクレオチド。

203.

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前記核酸が、T2A、P2A、E2A、またはF2Aから選択される、態様201または202のポリヌクレオチド。

30

204.

態様169~198のいずれかのシングルドメイン抗体をコードする、ポリヌクレオチド。

205.

態様199~204のいずれかのポリヌクレオチドを含む、ベクター。

206.

発現ベクターである、態様205のベクター。

207.

ウイルスベクターまたは真核生物ベクターであり、任意で、該真核生物ベクターが哺乳類ベクターである、態様205または206のベクター。

40

208.

態様199~204のいずれかの1つもしくは複数のポリヌクレオチド、または態様205~207のいずれかの1つもしくは複数のベクターを含む、細胞。

209.

組換えであるかまたは単離されている、態様208の細胞。

210.

哺乳類細胞である、態様209の細胞。

211.

ポリペプチドを産生する方法であって、

態様199~204のいずれかの1つもしくは複数のポリヌクレオチド、または態様205~2

50

07のいずれかの1つもしくは複数のベクターを細胞中に導入する工程、および多重特異性ポリペプチド構築物を産生する条件で該細胞を培養する工程を含む、方法。

2 1 2 .

前記ポリペプチドを前記細胞から単離する工程または精製する工程をさらに含む、態様211の方法。

2 1 3 .

態様211または212の方法により産生される、ポリペプチド。

2 1 4 .

態様169~198のいずれかのシングルドメイン抗体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
を含むキメラ抗原受容体を含む、操作された免疫細胞。

2 1 5 .

前記細胞がリンパ球である、態様214の操作された免疫細胞。

2 1 6 .

前記細胞が、T細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞である、態様214または215の操作された免疫細胞。

2 1 7 .

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、免疫受容体活性化チロシンモチーフ(ITAM)シグナル伝達ドメインを含む、態様214~216のいずれかの操作された免疫細胞。

2 1 8 .

前記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、任意で、ヒトCD3ゼータシグナル伝達ドメインである、またはそれを含む、態様214~217のいずれかの操作された免疫細胞。

2 1 9 .

前記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、態様214~218の操作された免疫細胞。

2 2 0 .

前記共刺激分子が、CD28、ICOS、41BB、またはOX40、任意で、ヒトCD28、ヒトICOS、ヒト41BB、またはヒトOX40である、態様219の操作された免疫細胞。

2 2 1 .

態様1~62のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物、態様63~168のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物、態様169~198のいずれかのシングルドメイン抗体、または態様214~220のいずれかの操作された免疫細胞を含む、薬学的組成物。

2 2 2 .

薬学的に許容される担体を含む、態様221の薬学的組成物。

2 2 3 .

無菌である、態様221または222の薬学的組成物。

2 2 4 .

対象において免疫応答を刺激するかまたは誘導する方法であって、それを必要とする対象に、態様1~62のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物、態様63~168のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物、態様169~198のいずれかのシングルドメイン抗体、または態様214~220のいずれかの操作された免疫細胞、または態様221~223の薬学的組成物を投与する工程を含む、方法。

2 2 5 .

前記免疫応答が、腫瘍またはがんに対して、任意で、5T4を発現する腫瘍またはがんに対して、増加する、態様224の方法。

2 2 6 .

10

20

30

40

50

前記対象において疾患または状態を治療する、態様224または態様225の方法。

227.

対象において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、態様1~59のいずれかの5T4結合ポリペプチド構築物、態様60~161のいずれかの多重特異性ポリペプチド構築物、態様162~188のいずれかのシングルドメイン抗体、または態様214~220のいずれかの操作された免疫細胞、または態様221~223の薬学的組成物を投与する工程

を含む、方法。

228.

前記疾患または状態が、腫瘍またはがんである、態様226または227の方法。

10

229.

前記対象がヒトである、態様224~228のいずれかの方法。

【実施例】

【0597】

VIII. 実施例

以下の実施例は、説明目的で含まれるだけであり、本発明の範囲を限定するものではない。

【0598】

実施例1: 5T4 sdAbの作製

ラマおよびアルパカの免疫化により、ヒト5T4を標的とするシングルドメイン抗体を作製した。ラマおよびアルパカは、SEQ ID NO: 362および以下に示される組換えバージョンのヒト5T4細胞外ドメイン(ECD; ヒト5T4のアミノ酸32~355、たとえばUniProt No. Q13641)で免疫化した。

20

SSPTSSASSFSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEVPTDLPAYVRN
LFLTGNQLAVLPAGAFARRPPLAELAALNLSGSRLDEV RAGAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLS
PFAFSGSNASVSAPSPLVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALLAGRALQGLRRLELASNH
FLYLPRDVLAQLPSLRHLDLNNSLVSLTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVHLHNGTLAELQGL
PHIRVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKETEVVQGDRLTCAYPEKMRNRVLELNSADLD
CDPILPPSLQTS

30

【0599】

特異的な抗5T4抗体力価(titer)の発生後に、ラマ/アルパカの末梢血単核球(PBMC)を、免疫化動物の血液500 mLから単離し、Qiagen RNeasy Maxi Kitを用いて全mRNAを単離し、続いてThermo Superscript IV Reverse TranscriptaseおよびオリゴdTプライミングを用いてファーストストランドcDNAに変換した。このcDNAを鋳型として用いてPCRでシングルドメイン抗体(sdAb; VHHとも呼ばれる)配列を特異的に増幅し、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であった(SEQ ID NO: 8に示される)。

【0600】

40

これらのsdAbを提示する酵母ライブラリーを、組換え型の5T4 ECDを用いて、磁気ビーズ単離およびその後の蛍光標識細胞選別(FACS)により濃縮した。選別した酵母をプレートイングし、単離したコロニーを96ウェルブロックに採取し、培地で成長させて、sdAb-Fcの発現を表面提示から培地中分泌に切り換えた。96ウェル酵母分泌培養物の上清をOvcar-5(5T4陽性)またはCCRF-CEM細胞(5T4陰性)に加え、洗浄し、蛍光体標識した抗ヒトFc二次抗体で処理し、そして96ウェルフローサイトメトリーで分析した。

【0601】

5T4陽性細胞へ結合したが5T4陰性細胞には結合しなかった結合体を、sdAb-Fcとして、哺乳類発現ベクターにクローニングし、ポリエチレンイミンを用いて一過性トランスフ

50

エクシオンによりHEK293 freestyle細胞（293F細胞）またはCHO細胞で発現させた。上清中に分泌された組換えタンパク質を3～7日後に回収し、プロテインAクロマトグラフィーにより精製した。

【0602】

例示的な特定されたsdAbを表E1Aに示す。いくつかの場合では、sdAbは、Fcまたは別のsdAbなどの、別のポリペプチドとの連結のための、可動性リンカー（たとえばGG）を含み得る。

【0603】

（表E1A）5T4 sdAb

クローン名	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
L12E9	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYS	100	245
L14B5	ERPFGTAMG	290	AVSRNGGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	101	255
L16G10	GRPFSSAMG	87	AVSRNGGSSY	95	RSAAYSRSSEYTEKHDTY	102	276
7E1	GRTRSLRTMA	296	AISWRSDSTY	298	GGWLATTPDEYTY	300	294
14F4	GVTWNSYTMA	297	AIRWTVDTTY	299	GRKWPKADDY	301	295
4D3	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQTWGTKFTDYS	303	302

10

【0604】

実施例2：フローサイトメトリーによる、5T4発現細胞に対するsdAbの結合

精製sdAb-Fcの特異性および相対的親和性を5T4発現細胞で評価した。5T4-sdAb-Fc融合タンパク質の結合を、5T4発現細胞を用いてフローサイトメトリーにより評価した。融合タンパク質の滴定系列を、96ウェルプレートでFACS緩衝液（PBS 1% BSA、0.1% NaN₃ pH7.4）中30分間、4℃で、5T4発現細胞株とインキュベートした（細胞およそ2.5×10⁴～5×10⁴個/ウェル）。FACS緩衝液での3回の洗浄工程に続いて、APCコンジュゲート抗ヒトFc 特異的二次抗体（Jackson ImmunoResearch）を添加し、30分間4℃でインキュベートした。FACS緩衝液での3回の洗浄工程に続いて、結合した抗体をフローサイトメトリー（IQE Intellicyte）により検出した。

20

【0605】

図1A～1Bは、例示的な5T4 sdAb、すなわち4D3（SEQ ID NO: 302）、12E9（SEQ ID NO: 245）、7E1（SEQ ID NO: 294）、14B5（SEQ ID NO: 255）、16G10（SEQ ID NO: 276）、14F4（SEQ ID NO: 295）の結果を示す。

30

【0606】

例示的な作製されたsdAbを用いて5T4に対する結合に関するエピトープマッピングアッセイを実施し、抗体をペアにして、抗原のエピトープへの相手方の結合の阻止について試験した。結果を表E1Bに示す。

【0607】

（表E1B）エピトープマッピング

12E9	ビン1
7E1	ビン2
14B5	ビン2
16G10	ビン2
4D3	ビン1
14F4	ビン1

40

【0608】

実施例3：ラクダ科由来5T4 sdAbのヒト化

ヒトVH3-23生殖系列をスキャフォールドとして用いて、例示的なラクダ科由来の5T4

50

sdAbである12E9、14B5、および16G10をヒト化した。可溶性、特異性、安定性、および/または親和性に寄与するラクダ科の残基は無改変のままとした。それに加えて、すべてのヒト化バリエーションは、Leu11Glu(L11E)の改変、ならびにSer112Lys(S112K)およびSer113Pro(S113P)のカルボキシ末端の改変を含有したが、それは、(US 20160207981に記載されるように)これらがsdAbに向けられる既存のADAの認識を防止するまたは減少させることが知られているからである。

【0609】

表E2は、例示的な5T4 sdAbヒト化バリエーションを示す。

【0610】

(表E2) 5T4 sdAbヒト化バリエーション

クローン名	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
L12E9ヒト化バリエーション							
hz12E9v1	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	246
hz12E9v2	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	247
hz12E9v3	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	248
hz12E9v4	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	249
hz12E9v5	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	250
hz12E9v6	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	251
hz12E9v7	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	252
hz12E9v8	RRPFSSKTMA	288	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	253
hz12E9v9	GRPFSSKTMA	289	AVRWIGGATR	88	GQAWGTKFTDYSD	100	254
L14B5ヒト化バリエーション							
hz14B5v1	ERPFGTYAMG	290	AVSRNNGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	256
hz14B5v2	ERPFGTYAMG	290	AVSRNNGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	257
hz14B5v3	ERPFGTYAMG	290	AVSRNNGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	258
hz14B5v4	ERPFGTYAMG	290	AVSRNNGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	259
hz14B5v5	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASQ	90	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	260
hz14B5v6	ERPFGTYAMG	290	AVSRNTGASQ	91	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	261
hz14B5v7	ERPFGTYAMG	290	AVSRQGGASQ	92	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	262
hz14B5v8	ERPFGTYAMG	290	AVSRGGGASQ	93	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	263
hz14B5v9	ERPFGTYAMG	290	AVSRNNGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	264
hz14B5v10	ERPFGTYAMG	290	AVSRNNGASQ	89	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	265
hz14B5v11	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASQ	90	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	266
hz14B5v12	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASQ	90	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	267
hz14B5v13	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASQ	90	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	268
hz14B5v14	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASQ	90	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	269
hz14B5v15	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASY	94	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	270
hz14B5v16	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASQ	90	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	271
hz14B5v17	ERPFGTYAMG	290	AVSRNAGASY	94	RSAAYSRSSEVYTGKDE YYY	101	272

10

20

30

40

50

クローン名	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
hz14B5v18	ERPFSSYAMG	291	AVSRNAGASY	94	RSAAYSRSEVYTGKDE YYY	101	273
hz14B5v19	GRPFGTYAM G	292	AVSRNAGASY	94	RSAAYSRSEVYTGKDE YYY	101	274
hz14B5v20	GRPFSSYAMG	86	AVSRNAGASY	94	RSAAYSRSEVYTGKDE YYY	101	275
L16G10 ヒト化バリエーション							
hz16G10v1	GRPFSSSAMG	87	AVSRNGGSSY	95	RSAAYSRSEYTEKHD YTY	102	277
hz16G10v2	GRPFSSSAMG	87	AVSRNGGSSY	95	RSAAYSRSEYTEKHD YTY	102	278
hz16G10v3	GRPFSSSAMG	87	AVSRNGGSSY	95	RSAAYSRSEYTEKHD YTY	102	279
hz16G10v4	GRPFSSSAMG	87	AVSRQGGSSY	96	RSAAYSRSEYTEKHD YTY	102	280
hz16G10v5	GRPFSSSAMG	87	AVSRGGGSSY	97	RSAAYSRSEYTEKHD YTY	102	281
hz16G10v6	GRPFSSSAMG	87	AVSRNAGSSY	98	RSAAYSRSEYTEKHD YTY	102	282
hz16G10v7	GRPFSSSAMG	87	AVSRNTGSSY	99	RSAAYSRSEYTEKHD YTY	102	283
hz16G10v8	GRPFSSSAMG	87	AVSRNGGSSY	95	RSAAYSRSEYTEKHD YTY	102	284
hz16G10v9	GRPFSSSAMG	87	AVSRNGGSSY	95	RSAAYSRSEYTEKHD YTY	102	285
hz16G10v10	GRPFSSSAMG	87	AVSRNAGSSY	98	RSAAYSRSEYTEKHD YTY	102	286
hz16G10v11	GRPFSSYAMG	86	AVSRNAGSSY	98	RSAAYSRSEYTEKHD YTY	102	287

10

20

30

40

50

【 0 6 1 1 】

5T4 sdAbのヒト化バリエーションが5T4発現細胞に結合する能力を、実質的に実施例2に記載されるように試験し、結合を親sdAbと比べた。これらの研究では5T4発現T47D細胞を用いた。ヒト化バリエーションの結合が確認された結果を、図2A～2Fに示す。いくつかの場合では、結合は親sdAbと比べて増加していた。

【 0 6 1 2 】

実施例4：5T4を標的とする制約付きCD3結合タンパク質を産生する方法

制約付き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、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づけられた上述の1つまたは複数の5T4 sdAbを含有する、多重特異性ポリペプチド構築物を作製した。図3A～3Eに示すように、さまざまな構成の多重特異性構築物を作製した。いくつかの場合では、制約付きCD3エンゲージング構築物は、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づけられた、少なくとも1つの共刺激受容体結合領域（CRBR）を含有した。

【 0 6 1 3 】

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作製し、プラスミドにクローニングして発現させた。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（たとえばSEQ ID NO: 112、またはいくつかの場合はSEQ ID NO: 114に示される）；プロテアーゼの基質認識部位を1つまたは複数含有するものなどの、切断可能なリンカー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（VL）ドメイン（たとえばSEQ ID NO: 75に示される）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（たとえばSEQ ID NO: 105、またはいくつかの場合はSEQ ID NO: 109に示される）;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抗体の可変重ドメイン（たとえばSEQ ID NO: 47に示される）を含んだ。構築物は、例示的な切断不可能なリンカーである
GGGGGSGGGGSGGGGGS (SEQ ID NO:127)

、またはグランザイムBの基質認識部位を含有する、例示的な切断可能なリンカーである
GGSGGGGIEPDIGSGGS (SEQ ID NO:171)

10

を用いて作製した。ポリペプチド鎖の一方または両方は、Fcドメインのアミノ末端側および/またはCD3結合領域のカルボキシ末端側の1つまたは複数の5T4 sdAb、かつ/あるいはFcドメインのアミノ末端側および/またはCD3結合領域のカルボキシ末端側の共刺激受容体結合ドメインを、さまざまな構成で、追加でコードした。

【0614】

ヘテロ二量体制約付きCD3結合タンパク質の各鎖をコードする別々のプラスミドを、ポリエチレンイミンを用いて、等モル比で哺乳類細胞（HEK293またはCHO）に一過性にトランスフェクトした。上清中に分泌された組換えタンパク質を3～7日後に回収し、プロテインAクロマトグラフィーにより精製し、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）を行った。ヘテロ二量体タンパク質は、ヘテロ二量体Fcの一方の鎖の位置I253RまたはH435R（ふつうはホール-Fc）に設計された変異が理由でプロテインAに結合しないので、選択的に精製された。SEC（Superdex-200樹脂を用いるAKTA）またはFT-HIC（ブチル/フェニルセファロースを用いるAKTA）での2回目のクロマトグラフィー工程により、より疎水性であって、かつ期待される分子量の2倍である、2つのヘテロ二量体Fcを含有する望ましくないクロスペア種を除去した。

20

【0615】

この方法は、記載したようなヘテロ二量体Fcとジスルフィド安定化抗CD3 Fv（たとえばSEQ ID NO: 47に示される変異G44Cを有する抗CD3 VH、およびSEQ ID NO: 293に示される変異G100Cを有するVL）との適切なペア種を含有する、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であった。精製されたヘテロ二量体制約付き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、または増加したタンパク質濃度であってもクロスペア種が蓄積しなかった。

30

【0616】

表E3は、例示的な作製された制約付き多重特異性構築物を示す。cx3315の5T4結合ドメインは、制約付きCD3エンゲージング構築物内でN末端およびC末端に位置づけられたFABである。

【0617】

（表E3）5T4 VHH制約付き多重特異性構築物

40

構築物 #	鎖	N末端 sdAb (標的) (SEQ ID NO)	Fc	リンカー	CD3結合 ドメイン	C末端 sdAb (標的) (SEQ ID NO)
cx3253	1	12E9 (5T4) (245)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	7E1 (5T4) (294)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx3497	1	12E9 (5T4) (245)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	16G10 (5T4) (276)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx3499	1	12E9 (5T4) (245)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	14B5 (5T4) (255)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx4224	1	14F4 (5T4) (295)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	7E1 (5T4) (294)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx3262	1	12E9 (5T4) (245)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	7E1 (5T4) (294)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx4910	1	hz12E9v4 (5T4) (249)	xELL-ノブ	(G5S)3	Con1 VH	hz14B5v15 (5T4) (270)
	2	-	xELL-ホール	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx4912	1	hz14B5v15 (5T4) (270)	xELL-ノブ	(G5S)3	Con1 VH	hz12E9v4 (5T4) (249)
	2	-	xELL-ホール	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx4911	1	hz12E9v4 (5T4) (249)	xELL-ノブ	(G5S)3	Con1 VH	hz14B5v15 (5T4) (270)
	2	-	xELL-ホール	(G5S)3	Con1 VL	-
cx4913	1	hz14B5v15 (5T4) (270)	xELL-ノブ	(G5S)3	Con1 VH	hz12E9v4 (5T4) (249)
	2	-	xELL-ホール	(G5S)3	Con1 VL	-
cx3546	1	12E9 (5T4) (245)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	14B5 (5T4) (255)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx3547	1	12E9 (5T4) (245)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	16G10 (5T4) (276)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx3264	1	4D3 (5T4) (302)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	4D3 (5T4) (302)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con2 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)

10

20

30

40

cx3265	1	4D3 (5T4) (302)	hFc-ノブ	IEPDI	Con1 VH	4D3 (5T4) (302)
	2	-	hFc-ホール	IEPDI	Con1 VL	-
cx5185	1	hz12E9v9 (5T4) (360)	xELL-ノブ	(G5S)3	Con1 VH	hz16G10v11(5T4) (287)
	2	-	xELL-ホール	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx7859	1	hz12E9v9 (5T4) (360)	xELL-ノブ	(G5S)3	Con1 VH	hz12E9v9 (5T4) (360)
	2	-	xELL-ホール	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)
cx7860	1	hz16G10v11(5T4) (287)	xELL-ノブ	(G5S)3	Con1 VH	hz16G10v11(5T4) (287)
	2	-	xELL-ホール	(G5S)3	Con1 VL	RH3v5-1 (41BB) (210)

10

【 0 6 1 8 】

実施例5： 単離初代T細胞対5T4発現がん細胞に対する結合の比較

表E3に示される例示的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の、初代T細胞表面のCD3および5T4発現細胞（Ovcar-5）に対する結合を、フローサイトメトリーにより評価した。T細胞は、健常ヒトドナーのleukopakから単離したPBMCからネガティブ濃縮した初代T細胞であった。結合した構築物を、ヒトFcに特異的な蛍光体コンジュゲート二次抗体（抗ヒトIgG APC二次抗体）を用いて検出し、フローサイトメトリーにより結合を測定した。二次抗体のみとインキュベートした細胞を陰性対照とした。二次抗体のみとインキュベートした細胞を陰性対照とした。

20

【 0 6 1 9 】

各構築物200 nMでの正規化された細胞数対蛍光を表示するフローサイトメトリーのヒストグラムの結果を、図4A（cx3253）、図4B（cx3264）、図4C（cx3497）、図4D（cx3499）、図4E（cx3547）、図4F（cx3546）、図4G（cx4224）、図4H（cx4913）、図4I（cx3265）、図4J（cx4912）、図4K（cx3262）、図4L（cx4911）、および図4M（cx4910）に示す。図示のように、代表的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージャーは、5T4を発現するOvcar-5細胞に結合したことが見出された（各図の左上および下のパネル）。ところが、各図の右上および下のパネルに示すように、同じ構築物は単離状態のT細胞に結合できなかった。

30

【 0 6 2 0 】

フローサイトメトリーで決定したこれらの研究の例示的な分子の5T4またはCD3に対する親和性を表E4にまとめる。

【 0 6 2 1 】

（表E4）構築物の結合親和性

40

50

構築物 #	親和性 5T4	親和性 CD3
cx3253	0.120 nM	>200 nM
cx3497	0.646 nM	>200 nM
cx3499	0.653 nM	>200 nM
cx4224	0.871 nM	>200 nM
cx3262	0.116 nM	>200 nM
cx4910	0.575 nM	>200 nM
cx4912	0.119 nM	>200 nM
cx4911	0.259 nM	>200 nM
cx4913	0.348 nM	>200 nM
cx3546	0.436 nM	>200 nM
cx3547	0.419 nM	>200 nM
cx3264	0.145 nM	>200 nM
cx3265	0.156 nM	>200 nM

10

【 0 6 2 2 】

20

実施例 6： レポーターアッセイを用いての 5T4 依存性 CD3 レポーター T 細胞活性化の評価

この実施例は、さまざまな代表的な 5T4 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物が、5T4 発現 Ovar-5 細胞または 5T4 陰性細胞株 CCRF-CEM との共培養において CD3 NFAT レポーター Jurkat 細胞株を活性化する能力の評価を記載する。レポーターアッセイでは、Jurkat 細胞における CD3 のエンゲージメントの結果、NFAT シグナル伝達が生じ、緑色蛍光が産生される。これらのアッセイを用いて、（実施例 5 に示すように）単離された T 細胞では CD3 結合ドメインを介する T 細胞結合は制限または阻害されるが、本明細書で提供される 5T4 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物が同族抗原に結合すると、それらは T 細胞にエンゲージしかつ T 細胞活性化を媒介する能力を有することが実証された。

30

【 0 6 2 3 】

抗原を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物を、5T4 発現標的細胞 Ovar-5 および NFAT 駆動緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する操作された Jurkat 細胞との共培養物に対して滴定した。接着性の標的細胞を用いたレポーターアッセイのために、標的細胞を播種し、均一に分布するように室温で静置させ、数時間 37℃ でインキュベートして接着させてから、レポーター細胞、および抗原を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物を添加した。アッセイプレートを IncuCyte ZOOM システムを用いて連続的に画像化し、合計の緑色オブジェクト積分強度を測定することで CD3 レポーター細胞活性化を決定した。図示のように、評価した 5T4 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物は、5T4 陽性細胞を含有する培養物ではレポーター活性を誘導した（図 5A、5C、および 5E）が、T 細胞を 5T4 陰性細胞株（CCRF-CEM）と培養した場合は測定できるレポーター活性は観測されなかった（図 5B、5D、および 5F）。

40

【 0 6 2 4 】

実施例 7： 機能活性の評価

この実施例は、例示的な作製された 5T4 を標的とする制約付き CD3 エンゲージング構築物のヒト初代 T 細胞インビトロアッセイの評価および特徴決定について記載する。

【 0 6 2 5 】

A. T 細胞媒介性細胞傷害性

標的細胞を CytoID red で蛍光標識した。接着性の標的細胞 Ovar-5 または CCRF-CEM を用いた細胞傷害性アッセイのために、標的細胞を播種し、均一に分布するように室温で

50

静置させ、数時間37℃でインキュベートして接着させてから、その他のアッセイ構成要素を添加した。初代T細胞を、健常ヒトドナーのleukopakから単離したPBMCからネガティブ濃縮し、T細胞対標的細胞比10:1～40:1で添加した。アポトーシス中の細胞の核DNAを蛍光標識する緑色カスパーゼ-3/7試薬を添加した。共培養物に対して抗体を滴定し、アッセイプレートをIncucyte ZOOMシステムを用いて連続的に画像化した。合計の赤色/緑色重複オブジェクト面積を測定することで、標的細胞死を決定した。

【0626】

図6Aに示すように、評価した5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物は、5T4陽性（Ovcar-5）細胞株の強力なT細胞媒介性細胞傷害性を誘導した。図6Bに示すように、5T4陰性細胞株（CCRF-CEM）に対しては測定可能なT細胞細胞傷害性は観測されず、このことは抗原依存的T細胞活性化を強力に誘導する能力と一致する。これらの観測は、本明細書で提供される抗原を標的とする制約付きCD3のフォーマットが、他のCD3エンゲージングフォーマットと比べて、単離状態のT細胞に結合しない、または結合の減少を示すが、5T4依存性T細胞細胞傷害性を誘導する強力な能力を維持していることを裏付けている。

10

【0627】

B. T細胞活性化

T細胞活性化を評価するために、T細胞媒介性細胞傷害性アッセイ由来の浮遊細胞を回収し、live/deadステイン、ならびに蛍光体コンジュゲート抗CD4、抗CD8、抗CD25、抗CD69、および/または抗CD71抗体で染色した。SONY SA3800スペクトル型アナライザーを用いて細胞を分析し、CD4+T細胞またはCD8+T細胞の活性化を、CD25、CD69、もしくはCD71の発現レベル、またはCD25、CD69、もしくはCD71陽性のパーセントを測定して決定した。

20

【0628】

図7A～7Bおよび図7C～7Dは、例示的な構築物の存在下で、T細胞を、5T4陽性（Ovcar-5）または5T4陰性（CCRF-CEM）細胞株と培養した後の、CD4 T細胞およびCD8 T細胞それぞれのCD25発現の結果を表す。図8A～8Bおよび図8C～8Dは、例示的な構築物の存在下で、T細胞を、5T4陽性（Ovcar-5）または5T4陰性（CCRF-CEM）細胞株と培養した後の、CD4細胞およびCD8 T細胞それぞれのCD69発現の結果を表す。図9A～9Bおよび図9C～9Dは、例示的な構築物の存在下で、T細胞を、5T4陽性（Ovcar-5）または5T4陰性（CCRF-CEM）細胞株と培養した後の、CD4 T細胞およびCD8 T細胞それぞれのCD71発現の結果を表す。これらの結果は、CD25、CD69、およびCD71の発現がCD4+およびCD8+T細胞で増加したことを証拠として、例示的な評価された5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が、CD3結合を介し、用量依存的5T4依存性T細胞活性化を媒介したことを示した。

30

【0629】

このように、これらの結果は、本発明の5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が、CD4 T細胞およびCD8 T細胞両方の強力な抗原依存的活性化を誘導したことを実証した。

【0630】

40

C. T細胞のサイトカイン産生（ELISA）

T細胞媒介性細胞傷害性アッセイの上清のIFN- γ 含量を、サンドイッチELISA（米国Bio Legend）により分析した。製造業者の使用説明にしたがい、標準曲線を作製し、そこから上清サンプルのサイトカイン濃度値を内挿した。検出の下限を下回る吸光値を有したサンプルには、最低標準濃度の半分に当たるサイトカイン濃度を割り当てた。図10Aに示すように、例示的な評価された5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物は、5T4陽性（Ovcar-5）ではT細胞によるIFN- γ 産生を惹起したが、5T4陰性細胞株（CCRF-CEM）では測定可能なIFN- γ 産生は観測されなかった。

【0631】

D. T細胞のサイトカイン産生（FluoroSpot）

50

FluoroSpot膜を、4 で一晩、IFN 捕捉抗体およびTNF 捕捉抗体でコーティングした。PBSで膜を洗浄し、滴定した抗体、標的細胞、およびPBM CまたはPBM Cからネガティブ濃縮した精製T細胞を添加した。細胞を、標的細胞対エフェクター細胞比1:10で播種した。アッセイプレートをおよそ24時間、37 でインキュベートし、膜を製造業者 (C.T.L.) の使用説明にしたがい準備した。CTL-ImmunoSpot S6 Universal Analyzerを用いて膜を画像化した。アッセイウェル全体で均一の曝露時間および強度設定を用いて、サイトカインスポット数を測定した。図10B (IFN) および図10C (TNF) は、例示的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が、PBM CまたはT細胞から5T4依存性様式でサイトカイン産生を惹起する能力を表す。

【0632】

10

実施例8: NK細胞活性化の評価

A. 初代NK細胞の活性化

sdAb-IgG1-Fcが5T4陽性細胞の存在下でNK細胞を活性化する能力を評価するために、A549細胞 (2.5×10^3 細胞/ウェル) およびPBM C (1.55×10^6 細胞/ウェル; 2.5×10^4 NK細胞/ウェル) の共培養物を、滴定した抗体で、4時間、37 で処理した。細胞をFITC抗CD56およびAPC抗CD107aで染色した。NK活性化は、フローサイトメリーによりCD56+細胞上のCD107aのレベルを測定して決定した。図11Aに示すように、sdAb-Fcとしてフォーマットした12E9および4D3は、標的依存性NK細胞活性化を惹起する能力がある。

【0633】

20

B. ADCCレポーター活性化

例示的な5T4標的sdAbのFcエフェクター機能を評価するために、NFAT駆動ルシフェラーゼレポーター遺伝子を有する、CD16aを安定発現するように操作されたJurkatレポーター細胞株を用いた。Jurkatレポーター細胞を、5T4発現細胞 (T47D; およそ 3×10^4 細胞/ウェル) の存在下または非存在下で播種した (およそ 6×10^4 細胞/ウェル)。50ナノモルの抗体を細胞に添加し、アッセイプレートを37 で6時間インキュベートし、最終アッセイ量は75マイクロリットルであった。アッセイプレートを室温まで平衡化させ、75マイクロリットルのBio-Gloをサンプルウェルに添加し、アッセイプレートを室温で10分間インキュベートした。100マイクロリットルのアリコート白色96ウェルプレートに移し、Clariostarマイクロプレートリーダーを用いて発光を測定した。図11Bは、12E9-Fc、4F7-Fc、4F11-Fc、hz12E9v9-Fc、およびhz16G10v11-Fcが、抗原依存性様式でCD16レポーター細胞を活性化する能力を表す。図11Cおよび11Dは、cx7884 (hz12E9v9-Fc) およびcx7885 (hz16G10v11-Fc) が、抗原および用量依存性様式でCD16レポーター細胞を活性化する能力を表す。

【0634】

30

実施例9: 5T4標的CD3エンゲージング構築物の比較

A. がん細胞および初代T細胞に対する結合

この実施例は、例示的な構築物の、T細胞またはがん細胞に対する結合を評価する研究について記載する。これらの研究は、互いに別々にT細胞のみまたはがん細胞のみを含有する単培養で実行した。

【0635】

40

初代T細胞表面のCD3との、および5T4発現Ovcar5細胞との、本開示の例示的なCD3エンゲージング構築物の結合を評価した。初代T細胞は、健常ヒトドナーのleukopakから単離したPBM Cからネガティブ濃縮した。結合した構築物を、蛍光体コンジュゲート二次抗体を用いて検出し、フローサイトメリーにより結合を測定した。二次抗体のみとインキュベートした細胞を陰性対照とした。

【0636】

例示的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物を評価した。表E3に示すように、cx3497には共刺激受容体結合領域 (CRBR) として41BB結合ドメインを組み込んでいたが、cx3547にはCRBRを組み込んでいなかった。例示的なcx3497構築物は

50

、CRBRとして41BB共刺激受容体を標的とするsdAb（それぞれSEQ ID NO: 347、348、および349に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する;たとえばSEQ ID NO: 210に示される）を含有した。cx3497の41BB結合ドメインのほか、シングルドメイン抗体が両構築物の5T4結合ドメインとして組み込まれた。図12Aおよび12Bに示すように、両構築物は、5T4発現細胞Ovcar-5に対する結合を示した。しかし、これらの構築物は単離状態のT細胞には結合できなかった（図12Cおよび12D）。

【0637】

B. T細胞媒介性細胞傷害性

この実施例は、ヒト初代T細胞インビトロアッセイで試験された制約付きCD3エンゲージング構築物の評価および特徴決定について記載する。

【0638】

標的細胞をCytold redで蛍光標識した。接着性の標的細胞について、標的細胞を播種し、均一に分布するように室温で静置させ、数時間37℃でインキュベートして接着させてから、その他のアッセイ構成要素を添加した。初代T細胞を、健常ヒトドナーのleukopakから単離したPBMCからネガティブ濃縮し、T細胞対標的細胞比10:1～40:1で添加した。アポトーシス中の細胞の核DNAを蛍光標識する緑色カスパーゼ-3/7試薬を添加した。共培養物に対して抗体を滴定し、アッセイプレートにIncuCyte ZOOMシステムを用いて連続的に画像化した。合計の赤色/緑色重複オブジェクト面積を測定することで、標的細胞死を決定した（図13Aおよび13Bに示す）。ここで標的細胞はCytold redにより赤く標識され、アポトーシスは緑色蛍光カスパーゼ-3/7基質により観察されているので、アポトーシス標的細胞は赤色および緑色で二重標識されている。

【0639】

例示的アッセイでは、試験された多重特異性構築物は、41BB結合共刺激受容体結合領域ありの、5T4を標的とする制約付きCD3構築物（cx3497）を含んだ。対照として、共刺激受容体結合領域なしの、対応する5T4を標的とする制約付きCD3構築物も試験した（cx3547）。標的細胞は5T4陽性Ovcar5細胞または5T4陰性CCRF細胞であった。図13Aおよび13Bに示すように、代表的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物cx3547は、抗原特異的細胞傷害性を媒介する能力がなかったが、41BB結合ドメインの付加によって5T4発現細胞株Ovcar-5に対する特異的T細胞細胞傷害性が誘導され、しかし5T4陰性細胞株CCRF-CEMに対しては誘導されなかった。注目すべきことに、cx3497が媒介するT細胞媒介性細胞傷害性はおよそ40時間までは観察されず、そのことはTCRシグナル伝達後の41BBの上方制御の動態に一致する。

【0640】

これらの結果は、41BBなどの共刺激受容体を標的とする共刺激受容体結合領域の付加により、41BB結合ドメインをもたない構築物よりもT細胞媒介性細胞傷害性の効力が増大したことを示す。これらの観測は、本明細書で提供される、追加の共刺激能を有する、抗原を標的とする制約付きCD3フォーマットが、他のCD3エンゲージングフォーマットと比べて、抗原エンゲージメントが存在しないT細胞に実質的に結合することなく、媒介性細胞傷害性の効力の増大を示すことを裏付ける。

【0641】

C. T細胞のサイトカイン産生（ELISA）

上述のT細胞媒介性細胞傷害性アッセイの上清のIFN- γ 成分を、サンドイッチELISA（米国BioLegend）により分析した。製造業者の使用説明にしたがい、標準曲線を作製し、そこから上清サンプルのサイトカイン濃度値を内挿した。検出の下限を下回る吸光値を有したサンプルには、最低標準濃度の半分に当たるサイトカイン濃度を割り当てた。

【0642】

図14は、代表的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が、41BB結合ドメインが構築物に組み込まれている場合（cx3499およびcx3497対cx3546およびcx3547）、T細胞による抗原依存性様式のIFN- γ 産生の増大を惹起することが観測されたことを示す。

10

20

30

40

50

【 0 6 4 3 】

実施例 10: 共刺激結合領域ありまたはなしの、抗原結合 5T4 標的ドメインを含有する CD3 制約付き多重特異性構築物の作製および評価

リンカー（たとえば切断不可能なリンカー）により CD3 結合領域にカップリングされている免疫グロブリンのヘテロ二量体 Fc 領域、および多重特異性ポリペプチド構築物の Fc 領域に対してアミノ末端に、かつ CD3 結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、5T4 腫瘍関連抗原（TAA）に結合する抗原結合ドメインを含有する、追加の多重特異性構築物を作製した。構築物は、CRBR としての 4-1BB を標的とする sdAb ありまたはなしで作製し、さまざまなアッセイで T 細胞活性を比較した。

【 0 6 4 4 】

A. 構築物の設計および作製

図 3A ~ E に表すようなフォーマットの、例示的な多重特異性構築物を作製した。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作製し、プラスミドにクローニングして発現させた。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、第 1 の Fc ポリペプチド（たとえば Fc ホールポリペプチド）；切断不可能なリンカー；および抗 CD3 抗体の可変軽（VL）ドメインを含んだ。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、第 2 の Fc ポリペプチド（たとえば Fc ノブポリペプチド）；第 1 のポリペプチド鎖と同じ切断不可能なリンカー；および抗 CD3 抗体の可変重（VH）ドメインを含んだ。抗 CD3 抗体は、表 E5 に示すように、ジスルフィド安定化（dsFv）抗体（変異 G44C を有する抗 CD3 VH および変異 G100C を有する VL）を含んだ。一方のポリペプチド鎖が、Fc ドメインのアミノ末端側に 1 つ、および CD3 結合領域のカルボキシ末端に 1 つの、2 つの 5T4 抗原結合ドメインを追加でコードした。例示的な構築物 cx5951 を CRBR なしで作製したが、構築物 cx5185 は、CD3 結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、CRBR としての 4-1BB 抗原結合ドメイン（たとえば sdAb）、たとえば（それぞれ SEQ ID NO: 347、348、および 349 に示される CDR1、CDR2、および CDR3 を含有する；たとえば SEQ ID NO: 210 に示される）sdAb を含有した。

【 0 6 4 5 】

5T4 標的 sdAb ドメインを有する例示的な制約付き CD3 結合構築物の構成要素を下の表 E5 に示す。実施例 4 に記載されるようにして、構築物を発現させ、実質的に精製した。

【 0 6 4 6 】

（表 E5）5T4 VHH 制約付き多重特異性構築物

構築物	鎖	N 末端 sdAb (標的)	Fc	リンカー	CD3 結合 ドメイン	C 末端 sdAb (標的)	ジスル フィド 安定化
cx5951	1	5T4 sdAb hz12E9v09 (360)	xELL- ノブ (105)	GGGGGSGGGGSGGGGGS (127)	VH13 (47)	5T4 sdAb hz16G10v11 (287)	あり
	2	なし	hxELL- ホール (106)	GGGGGSGGGGSGGGGGS (127)	VL10 (75)	なし	
cx5185	1	5T4 sdAb hz12E9v09 (360)	xELL- ノブ (105)	GGGGGSGGGGSGGGGGS (127)	VH13 (47)	5T4 sdAb hz16G10v11 (287)	あり
	2	なし	xELL- ホール (112)	GGGGGSGGGGSGGGGGS (127)	VL10 (75)	4-1BB sdAb RH3v5-1 (210)	

【 0 6 4 7 】

B. T 細胞活性

上述の構築物が CD3 にエンゲージする活性をさまざまなアッセイで比較した。

【0648】

1. 細胞傷害性活性

41BB結合共刺激受容体結合領域あり (cx5185) の、またはCRBRなし (cx5951) の例示的な5T4標的構築物の存在下、標的細胞に対する細胞傷害性活性を評価した。細胞傷害性アッセイでは、5T4を発現するOvcar-5細胞または5T4を発現しない対照CCRF-CEM細胞を標的細胞として用い、播種し、均一に分布するように室温で静置させ、数時間37℃でインキュベートして接着させてから、その他のアッセイ構成要素を添加した。初代T細胞を、健常ヒトドナーのleukopakから単離したPBMCからネガティブ濃縮し、T細胞対標的細胞比10:1~40:1で添加した。ここで標的細胞はCytold redにより赤く標識され、アポトーシスは緑色蛍光カスパーゼ-3/7基質により観察されているので、アポトーシス標的細胞は赤色および緑色で二重標識されているものである。アッセイプレートをIncucyte ZOOMシステムを用いて連続的に画像化した。合計の赤色/緑色重複オブジェクト面積を測定することで、標的細胞死を決定した。

10

【0649】

図15Aに示すように、48時間後、41BB結合共刺激受容体結合領域ありの、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物cx5185で、41BB結合共刺激受容体結合領域をもたない同じ構築物cx5951と比べて、5T4発現標的細胞に対するT細胞媒介性標的細胞細胞傷害性の効力の顕著な差が観測された。非標的細胞に対する細胞傷害性活性は観測されなかった (図15B)。

【0650】

これらの観測は、本明細書で提供される、追加の共刺激能を有する抗原依存性制約付きCD3フォーマットが、他のCD3エンゲージングフォーマットと比べて、媒介性細胞傷害性の増大した効力を示すことを裏付ける。

20

【0651】

2. T細胞活性化

例示的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物に媒介されるT細胞活性化を評価するために、cx5185およびcx5951を、T細胞および5T4発現標的細胞のA375細胞、Ovcar-5細胞、またはSHP-77細胞のいずれかの共培養物中でインキュベートした。T細胞活性化を評価するために、細胞を回収し、live/deadステイン、ならびに蛍光体コンジュゲート抗CD4、抗CD8、および/または抗CD25抗体で染色した。SONY SA 3800スペクトル型アナライザーを用いて細胞を分析し、CD4+T細胞またはCD8+T細胞の活性化を、CD25の発現レベルを測定して決定した。T細胞活性化を、CD4およびCD8集団のCD25発現により評価した。CD25の発現により測定したT細胞活性化は、例示的な構築物の存在下で5T4発現標的細胞とインキュベートされたCD4 (図16A) T細胞およびCD8 (図16B) T細胞で顕著であった。図16A~Bに示すように、41BB結合ドメインが組み込まれた、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物 (cx5185) は、41BB結合ドメインをもたない同様の構築物cx5951と比べて、CD4 T細胞およびCD8 T細胞両方に対して増大した活性化能を示した。

30

【0652】

3. T細胞のサイトカイン産生 (ELISA)

例示的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物への41BB結合ドメインの組み込みがT細胞媒介性IFN γ 産生に与える影響を、さまざまな5T4発現細胞株、A375、SHP-77、およびOvcar5を用いて評価した。T細胞および5T4発現標的細胞の共培養後、上清のIFN γ 成分をサンドイッチELISAにより分析した (米国BioLegend)。製造業者の使用説明にしたがい、標準曲線を作製し、そこから上清サンプルのサイトカイン濃度値を内挿した。検出の下限を下回る吸光値を有したサンプルには、最低標準濃度の半分にあたるサイトカイン濃度を割り当てた。図17に示すように、41BB結合ドメインが組み込まれた、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物cx5185は、41BB結合ドメインをもたない同様の構築物cx5951と比べて、増大したIFN γ 産生を示した。

40

【0653】

50

4. T細胞の増殖

T細胞の増殖を、フローサイトメトリーにより、標識CD4+またはCD8+T細胞内CellTrace (商標) Violet色素 (Thermo Fisher Scientific) の希釈物を測定して、評価した。T細胞をPBMCからネガティブ濃縮し、製造業者のプロトコールにしたがいCellTrace (商標) Violetで標識した。5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物を、標識T細胞ならびに5T4発現細胞、A375、Ovcar-5、およびSHP-77の共培養物に対して滴定し、アッセイプレートで37℃で5日間インキュベートした。生死判別色素ヨウ化プロピジウムならびに蛍光体コンジュゲート抗CD4および抗CD8抗体で細胞を染色し、SONY SA3800スペクトル型アナライザーを用いて分析した。増殖CD4+またはCD8+T細胞のパーセントは、然るべき生T細胞サブ集団をゲートし、そして無処理共培養物由来のT細胞よりもCellTrace (商標) Violetの強度が低い細胞のパーセンテージを測定して、決定した。

10

【0654】

41BB結合ドメインが組み込まれた、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物cx5185は、41BB結合ドメインをもたない同様の構築物cx5951と比べて、CD4 T細胞 (図18) およびCD8 T細胞 (図19) 両方の増殖を増大させた。

【0655】

5. T細胞ミトコンドリアの評価

41BBシグナル伝達はミトコンドリア機能を増大させるといわれている。ミトコンドリア機能は、活性ミトコンドリア内に蓄積するミトコンドリア選択性蛍光プローブMitoTracker Green (Thermo Fisher Scientific) を用いて観察することができる。T細胞のミトコンドリア機能を評価するために、T細胞を、5T4発現細胞株、A375、Ovcar-5、およびSHP-77と、例示的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物の存在下で5日間共培養した。生死判別色素ヨウ化プロピジウムならびに蛍光体コンジュゲート抗CD4および抗CD8抗体のほか、MitoTracker Greenを細胞染色終濃度100 nMで添加し、SONY SA3800スペクトル型アナライザーを用いて細胞を分析した。CD4+またはCD8+ T細胞のMitoTracker Green蛍光強度の中央値を、然るべき生T細胞サブ集団をゲートして決定した。41BB結合ドメインが組み込まれた、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物cx5185は、41BB結合ドメインをもたない同様の構築物cx5951と比べて、CD4 T細胞 (図20) およびCD8 T細胞 (図21) 両方のミトコンドリア機能を増大させた。

20

30

【0656】

6. T細胞レポーターアッセイ

5T4標的sdAbを含有する制約付きCD3エンゲージング構築物が41BB共刺激シグナル伝達経路の特異的アゴニズムを媒介する能力も評価した。Jurkat 41BB NF- κ B-ルシフェラーゼレポーター細胞株を用いて、共刺激受容体結合ドメインなし (cx5951) または41BB結合ドメインあり (cx5185) の例示的な5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物を試験した。組換えプレート結合5T4を、抗原ソースとして用いた。図22に示すように、41BB結合ドメインが組み込まれたcx5185が、標的の共刺激受容体の特異的アゴニズムを誘導することが見出された。

40

【0657】

C. まとめ

まとめると、これらの結果は、5T4標的sdAbドメインを含有するCD3エンゲージング構築物は、CRBRがあってもなくても、抗原依存的にT細胞を活性化させる能力があることを実証している。注目すべきことに、41BB結合ドメインが組み込まれた、5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物は、41BB結合ドメインなしの5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物よりも優れた抗原依存性および活性を示した。

【0658】

実施例11: 抗原標的ドメインを含有するCD3制約付き多重特異性構築物におけるCD3結合領域の向きの比較

50

A. 構築物の設計および作製

図23A～Bに示すように多重特異性ポリペプチド構築物を作製し、これらは、リンカー（たとえば切断不可能なリンカー）によりCD3結合領域にカップリングされている免疫グロブリンのヘテロ二量体Fc領域、CD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、CRBRとしての抗原結合ドメイン（たとえばsdAb）、および多重特異性ポリペプチド構築物のFc領域に対してアミノ末端に、かつCD3結合領域に対してカルボキシ末端に位置づけられた、腫瘍関連抗原（TAA）に結合する2つの抗原結合ドメインを含有した。

【0659】

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作製し、プラスミドにクローニングして発現させた。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、第1のFcポリペプチド（たとえばFcホールポリペプチド）；切断不可能なリンカー；抗CD3抗体の可変軽（VL；図23B）または可変重（VH；図23A）ドメイン；およびCRBRとしての抗原結合ドメイン（たとえばsdAb）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、第1の抗原結合ドメイン（たとえばsdAb #1）、第2のFcポリペプチド（たとえばFcノブポリペプチド）；第1のポリペプチド鎖と同じ切断不可能なリンカー；抗CD3抗体の可変重（VH）または可変軽（VL）ドメインのもう一方；および第2の抗原結合ドメイン（たとえばsdAb #2）を含んだ。抗CD3抗体は、ジスルフィド安定化（dsFv）抗体（変異G44Cを有する抗CD3 VHおよび変異G100Cを有するVL）を含んだ。

【0660】

注目すべきことに、図23A～Bに示すように、CD3 Fvの抗CD3 VHおよび抗CD3 VLの向きは、ヘテロ二量体Fc領域のFcノブまたはFcホールに対して異なる配置とした。図23Aに示すように、構築物は、ヘテロ二量体構築物の第1のポリペプチドが、FcノブのC末端に位置づけられたCD3 FvのVLと、N末端およびC末端の最端に抗原結合ドメインとを有し、ヘテロ二量体構築物の第2のポリペプチドが、FcホールのC末端に位置づけられたCD3 FvのVHと、C末端の最端にCRBR sdAbとを有するように、作製した。これに対し、図23Bは、ヘテロ二量体構築物の第1のポリペプチドが、FcノブのC末端に位置づけられたCD3 FvのVHと、N末端およびC末端の最端に抗原結合ドメインとを有し、ヘテロ二量体構築物の第2のポリペプチドが、FcホールのC末端に位置づけられたCD3 FvのVLと、C末端の最端にCRBR sdAbとを有する、例示的な構築物を表す。作製したいくつかの例示的な構築物は、CRBRとして41BB共刺激受容体を標的とするsdAb（それぞれSEQ ID NO: 347、348、および349に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3を含有する；たとえばSEQ ID NO: 210に示される）を含有した。

【0661】

実施例4に記載されるように実質的に精製した構築物を発現させた。

【0662】

B. T細胞レポーター活性

CD3エンゲージメントを比較するために、例示的な構築物を、抗原依存性CD3レポーターアッセイで、標的抗原を発現する細胞と共培養したCD3 NFATレポーターJurkat細胞株を活性化する能力を評価して、試験した。活性化は、Jurkatレポーター細胞内の緑色蛍光またはルシフェラーゼレポーターシグナルを観察して評価した。

【0663】

抗原を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物を、標的抗原を発現するA375細胞または標的抗原を発現しない対照CCRF-CEM細胞、およびNFAT駆動緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する操作されたJurkat細胞の共培養物に対して、滴定した。CD3のエンゲージの結果、NFATシグナル伝達が生じ、緑色蛍光が産生される。接着性の標的細胞を用いたレポーターアッセイのために、標的細胞を播種し、均一に分布するように室温で静置させ、数時間37℃でインキュベートして接着させてから、レポーター細胞、および抗原を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物を添加した。アッセイプレートをIncucyte ZOOMシステムを用いて連続的に画像化し、合計の緑色オブジェクト積分強度

10

20

30

40

50

を測定することでCD3レポーター細胞活性化を決定した。

【0664】

図24Aに示すように、例示的な抗原を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物は、抗原を発現する標的細胞の存在下、レポーターT細胞の共培養物中でインキュベートすると、標的抗原に特異的なT細胞活性化を媒介する能力を示した。しかし、標的抗原を発現しない細胞との共培養物ではレポーター活性は観測されなかった（図24B）。注目すべきことに、ノブ-VH;ホール-VLフォーマットの構築物は、ノブ-VL;ホール-VHフォーマットの構築物と比べて、増大したT細胞活性化を示した。

【0665】

同様のアッセイで、同じ抗原を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物を、標的抗原を発現するA375細胞、または標的抗原を発現しない対照CCRF-CEM細胞、およびNFAT駆動ルシフェラーゼを発現する操作されたJurkat細胞の共培養物に対して、滴定した。図24Cに示すように、例示的な抗原を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物は、抗原を発現する標的細胞の存在下、レポーターT細胞の共培養物中でインキュベートすると、標的抗原に特異的なT細胞活性化を媒介する能力を示した。標的抗原を発現しない細胞との共培養物では、やはりレポーター活性は観測されなかった（図24D）。GFPレポーターアッセイと同じく、ノブ-VH;ホール-VLフォーマットの構築物は、ノブ-VL;ホール-VHフォーマットの構築物と比べて、増大したT細胞活性化を示した。

【0666】

これらの結果は、CD3 Fvの構成要素が、VHおよびVLがFcノブ領域およびFcホール領域それぞれのC末端に位置づけられる向きにされると、増大したCD3エンゲージメントおよび活性が観測される、という観測に一致する。

【0667】

実施例12: 5T4 sdAbのエピトープの決定

A. エピトープの決定

5T4を標的とするsdAb、12E9（SEQ ID NO: 245）、16G10（SEQ ID NO: 276）および14B5（SEQ ID NO: 255）、ならびにそれらのヒト化バリエーションは、マウス5T4抗原と交差反応しない。これらのsdAbが認識するエピトープの位置を決定するために、マウス5T4の細胞外ドメインのさまざまな部分をヒト5T4のものに換えて、さまざまなマウス:ヒトキメラ5T4構築物を作製した。構築物は、細胞内シトリングと融合させた完全5T4コード領域（細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメイン）をコードする哺乳類発現プラスミド中、ヒト5T4の特定の領域をコードする核酸配列をマウス5T4の同種領域に移植して作製した。試験された構築物は、完全ヒト構築物（“Hu”；SEQ ID NO: 382）、完全マウス構築物（“Mu”；SEQ ID NO: 383）、キメラhmc5T4.1（SEQ ID NO: 384）、キメラhmc5T4.2（SEQ ID NO: 385）、キメラhmc5T4.3（SEQ ID NO: 386）、およびキメラhmc5T4.4（SEQ ID NO: 387）を含んだ（図25）。細胞表面に発現できるようにこれらの構築物をCHO細胞に一過性にトランスフェクトし、結合をフローサイトメトリーにより観察した。図26A~26Cに示すように、12E9v9（SEQ ID NO: 360）は、アミノ酸残基60~112間（SEQ ID NO: 411）にあるエピトープを認識し、16G10v11（SEQ ID NO: 287）および14B5v17（SEQ ID NO: 272）はどちらもアミノ酸残基173~224間（SEQ ID NO: 412）にあるエピトープを認識した。

【0668】

B. 5T4発現細胞に対する結合

例示的な作製された5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物が、5T4発現SKOV3細胞または5T4陰性CCRF-CEM細胞との共培養物中、CD3 NFATレポーターJurkat細胞株を活性化する能力について、評価した。試験された3つの構築物はすべて、2つの5T4標的sdAbを含有した。1つの構築物（cx5185）は、別個のエピトープに結合する2つの5T4標的sdAb（hz12E9v9およびhz16G10v11）を含有し、他の2つの構築物（cx7859およびcx7860）はそれぞれ、同じエピトープに対する2つの5T4標的sd

10

20

30

40

50

Ab（それぞれhz12E9v9またはhz16G10v11）を含有した。

【0669】

レポーターアッセイでは、Jurkat細胞におけるCD3のエンゲージメントの結果、NFATシグナル伝達が生じ、緑色蛍光が産生される。抗原を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物を、5T4発現SKOV3標的細胞、およびNFAT駆動緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現する操作されたJurkat細胞の共培養物に対して、滴定した。標的細胞を播種し、均一に分布するように室温で静置させ、数時間37℃でインキュベートして接着させてから、レポーター細胞、および抗原を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物を添加した。CD3レポーター細胞活性化を、実施例6に記載されるようにして決定した。

【0670】

図示のように、評価した5T4を標的とする制約付きCD3エンゲージング構築物は、5T4陽性細胞を含有する培養物ではレポーター活性を誘導した（図27A）が、T細胞を5T4陰性細胞株（CCRF-CEM）と培養した場合は測定できるレポーター活性は観測されなかった（図27B）。図27Aに示すように、別個のエピトープに結合する2つの5T4標的sdAbを含有する構築物（cx5185）は、5T4に関し同じく二価であるが、2つのエピトープの一方にしか結合しなかった構築物（cx7859およびcx7860）よりも、レポーター細胞のより大きい活性化を誘導した。

【0671】

本発明は、その範囲を、たとえば本発明のさまざまな局面を説明するために提供される特定の開示された態様に限定されるものではない。記載される組成物および方法のさまざまな変更形が、本明細書の記載および教示から明らかになる。そのような変化形は、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することができ、また、本開示の範囲内とされる。

【0672】

配列

10

20

30

40

50

#	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 TLPPSRDEL TNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	ヒトIgG1 Fc
9	PAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	Fc xELL
10	PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKT GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS 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 NYNTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNRTQK SLSLSPGK	ヒトIgG3 Fc
12	PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	ヒトIgG4 Fc
13	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	ヒトIgG4 Fc
14	EPKSSDKTHTCPPC	改変型IgG1 ヒンジ
15	DKTHTCPPC	切断型IgG1 ヒンジ
16	ESKYGPPCPPC	改変型IgG4 ヒンジ
17	GQGTLVTVKPGG	カルボキシ 末端配列

10

20

30

40

#	配列	注釈
18	GQGTSLVTVEPGG	カルボキシ 末端配列
19	VQLVQSGGG VVQPGSLRL SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGYINPSRGYTNY NQKVKDRFTI SRDNSKNTAF LQMDSLRLPED TGVYFCARYYDDHYCLDYWG QGTPVTVSS	OKT3 VH
20	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCASSSVS YMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLSAGVPSR FSGSGSGTDY TFISSSQPE DIATYYCQQW SSNPFTFGQGTKLQIT	OKT3 VL
21	QVQLVQSGGG VVQPGSLRL SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGYINPSRGYTNY NQKVKDRFTI SRDNSKNTAF LQMDSLRLPED TGVYFCARYYDDHYSLDYWG QGTPVTVSS	OKT3 ヒト化 VH
22	DVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGYINPSRGYTNY ADSVKGRFTI TTDKSTSTAY MELSSLRSED TATYYCARYYDDHYCLDYWG QGTTVTVSS	OKT3 ヒト化 VH
23	QVQLVQSGAE LKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKCLEWMGYINPSRGYTNY NQKFKDKATL TADKSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARYYDDHYSLDYWG QGTLVTVSS	OKT3 ヒト化 VH
24	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDTSKLSAGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSGTKLEIN	OKT3 ヒト化 VL
25	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSVS YMNWYQQKPG KAPKRWIYDTSKVASGVPAR FSGSGSGTDY SLTINSLEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGGGTKVEIK	OKT3 ヒト化 VL
26	DIQLTQSPSI LSASVGDRVT ITCRASSVS YMNWYQQKPG KAPKRWIYDTSKVASGVPR FSGSGSGTEY TLTISSMQPE DFATYYCQQW SSNPFTFGCGTKVEIKRT	OKT3 ヒト化 VL
27	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSLYL QMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTV SA	抗CD3 Hv
28	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEP DHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDE AIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	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	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	抗CD3 VH1
36	EVKLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYL	抗CD3 VH2

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
	QMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
37	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH3
38	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH4
39	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH5
40	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH6
41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH7
42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH8
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH9
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSYFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH10
45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH11
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVKP	抗CD3 VH12
47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVKP	抗CD3 VH13
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGCGTLTVTVKP	抗CD3 VH14
49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH15

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYL QMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTV SS	抗CD3 VH16
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH17
52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH18
53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYL QMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTV SS	抗CD3 VH19
54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH20
55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH21
56	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYL QMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTV SS	抗CD3 VH22
57	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVS S	抗CD3 VH23
58	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQ MNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVS S	抗CD3 VH24
59	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQ MNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVS S	抗CD3 VH25
60	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVS S	抗CD3 VH26
61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPG KCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVS S	抗CD3 VH27
62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTV S	抗CD3 VH28
63	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVTV SS	抗CD3 VH29

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFYAWGQGTITVTVS S	抗CD3 VH30
65	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTITVTVS S	抗CD3 VH31
66	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK DHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDE AIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL1
67	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQK GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGCGTKLEIK	抗CD3 VL2
68	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQK GQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAED EADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL3
69	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDE SIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL4
70	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDE SIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL5
71	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDE SDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL6
72	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEK GQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL7
73	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQK GQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTISGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL8
74	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQK GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGGGTKLEIK	抗CD3 VL9
75	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQK GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGCGTKLEIK	抗CD3 VL10
76	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQK GQCFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGEGTKLEIK	抗CD3 VL11
77	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK DHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDE AIYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗CD3 VL12
78	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQK GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGGGTKLEIK	抗CD3 VL13
79	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQK GQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAED EADYYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗CD3 VL14
80	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDE SIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL15

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
81	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTP GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDE SIYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗CD3 VL16
82	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTP GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDE SDYYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗CD3 VL17
83	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKEP GQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗CD3 VL18
84	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKP GQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGCGTKLTVL	抗CD3 VL19
85	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSNYHMGWFRQAP GKERELVA AISGGSTYYTDSVKGRFTISRNNAKNTMSLQM SNLKPEDTG VYYCTTPTEKGSSIDYWGQGTQVTVSSGRYPYD VPDY	抗CD3 VHH
86	GRPFSSYAMG	5T4 CDR-H1
87	GRPFSSAMG	5T4 CDR-H1
88	AVRWIGGATR	5T4 CDR-H2
89	AVSRNGGASQ	5T4 CDR-H2
90	AVSRNAGASQ	5T4 CDR-H2
91	AVSRNTGASQ	5T4 CDR-H2
92	AVSRQGGASQ	5T4 CDR-H2
93	AVSRGGGASQ	5T4 CDR-H2
94	AVSRNAGASY	5T4 CDR-H2
95	AVSRNGGSSY	5T4 CDR-H2
96	AVSRQGGSSY	5T4 CDR-H2
97	AVSRGGGSSY	5T4 CDR-H2
98	AVSRNAGSSY	5T4 CDR-H2
99	AVSRNTGSSY	5T4 CDR-H2
100	GQAWGTKFTDYS	5T4 CDR-H3
101	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	5T4 CDR-H3
102	RSAAYSRSSEYTEKHDTY	5T4 CDR-H3
103	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLST	ノブFc
104	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLST	ホールFc
105	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLST	ノブFc

10

20

30

40

#	配列	注釈
106	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSP	ホール Fc
107	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	ノブ Fc
108	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	ホール Fc
109	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	ノブ Fc
110	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	ホール Fc
111	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
112	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNR YTQKSLSLSP	ホール Fc
113	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNRYTQKSLSLSPG	ホール Fc
114	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT	ホール Fc

10

20

30

40

#	配列	注釈
	TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNR YTQKSLSLSPG	
115	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEA LHNHYTQKSLSLSPT	ノブ Fc
116	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHN HYTQKSLSLSPT	ノブ Fc
117	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEA LHNHYTQKSLSLSPG	ノブ Fc
118	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHN HYTQKSLSLSPG	ノブ Fc
119	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPT	ホール Fc
120	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSPT	ホール Fc
121	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG	ホール Fc
122	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSPG	ホール Fc
123	(GGGGGS) _n , nは1~5である	リンカー
124	(GGGGGS) _n , nは1~4である	リンカー
125	GGGGGS	リンカー

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
126	GGGGGS	リンカー
127	GGGGGSGGGGSGGGGGS	リンカー
128	GGGGSGGGGSGGGGGS	リンカー
129	GGSGGGGSGGGGSGGGGGS	リンカー
130	GlyxXaa-Glyy-Xaa-Glyz Xaaは、独立して、A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、 H、D、またはEから選択される 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、独立して、A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、 H、D、またはEから選択される	リンカー
132	(SSSSG)n n=1-9	リンカー
133	GGGGG-C-GGGGG	リンカー
134	(EAAAK)n n=2-20	リンカー
135	AS-(AP)n-GT n=2-20	リンカー
136	AS-(EAAAK)n-GT n=2-20	リンカー
137	(GGGGA)n n=2-20	リンカー
138	(PGGGS)n n=2-20	リンカー
139	(AGGGS)n n=2-20	リンカー
140	GG-(EGKSSGSGSESKST)n-GGS n=2-20	リンカー
141	SSSASASSA	リンカー
142	GSPGSPG	リンカー
143	ATTTGSSPGPT	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) X5 = I, V, T, S, または G (P1' = I, V, T, S, または G)	リンカーコンセンサス
146	LEAD	グラナザイム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

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
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は任意のアミノ酸である) 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	マトリブターゼ 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である) X4 = L, I または M (P1' = L, I または Mである)	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	TGRQARVGLLEADGSPAGLG	リンカー
168	TGSRQARVGPAGLEADGS	リンカー
169	TGPAGLGSRQARVGLLEADGS	リンカー
170	GPAGLGLEPDGSRQARVG	リンカー
171	GGSGGGGIEPDIGSGGS	リンカー
172	GGSGGGGLEADTGGSGGS	リンカー
173	GSIEPDIGS	リンカー
174	GSLEADTGS	リンカー
175	GGSGGGGIEPDGGSGGS	リンカー
176	GGSGGGGIEPDVGGSGGS	リンカー
177	GGSGGGGIEPDSGGSGGS	リンカー
178	GGSGGGGIEPDTGGSGGS	リンカー
179	GGGSLEPDGSGS	リンカー
180	GPAGLGLEADGSRQARVG	リンカー
181	GGEGGGGSGSGSGGS	リンカー
182	GSSAGSEAGSGQAGVGS	リンカー
183	GGSGGGGLEAEGSGGGGS	リンカー
184	GGSGGGGIEPDPGSGGS	リンカー
185	TGGSGGGGIEPDIGSGGS	リンカー
186	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGM FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG AAALALTVDLPPASSEANSFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	41BBL

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
187	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPG KGLEWMGKIYPGDSYTNYSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGTLLTVSS	41BB VH
188	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSP VLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYY CATYTGFGSLAVFGGGTKLTVL	41BB VL
189	QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPE KGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSVT AADTAVYYCARDYGPGRNDWYFDLWGRGTLTVSS	41BB VH
190	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC QQRSNWPPALTFGGGTKEIK	41BB VL
191	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYYMHWVRQA PGQGLEWMGWNPMSGGTNYAQKFQGRVTITRDTASTAY MELSSLRSEDTAVYYCAREGMAMRLELDKWGQGTLLTVSS	41BB VH
192	SYELTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAP VLVIYYDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC QVWDSSSVVFGGGTQLTVL	41BB VL
193	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNIKL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYNVTGVTFFDDKKCTYAISTFV PGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFV QNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
194	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNIRL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYDVTMVKFDDKKCMYDIWTF VPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFV FQNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
195	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNIRL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTF VPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFV FQNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
196	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNIKL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTF VPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFV FQNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
197	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNI KLREDSKMAIYELKEDKSYDVTGVSFDDKKCTYAIMTF VPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFF KFVFQNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPE NHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
198	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNI KLREDSKMAIYELKEDKSYDVTGVTFDDKKCRYDI STFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAM VFFKFVFQNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLG LPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
199	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNIRL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYDVTGVTFDDKKCTYAISTFV PGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVVSTNYNQHAMVFFKFV QNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
200	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKQWYVVGQAGNIKL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYDVTGVTFFDDKKCTYAISTLV PGSQPGFTLGKIKSFGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVF QNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
201	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKQWYVVGQAGNIRL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYDVTGVTFFDDKKCNYAISTFV PGSQPGFTLGKIKSFGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVF QNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
202	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 71～254
203	DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVA PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 85～254
204	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVA ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL PSRSE	ヒト41BBLの 80～254
205	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVAALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 52～254
206	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 71～248
207	DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVA PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 85～248
208	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVA ALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 80～248
209	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVAALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 52～248
210	EVQLLESQGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMGWYRQAPG KRREFVAAIESGRNTVYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSSL RAEDTAVYYCGLLKGNRVVSPSVAYWGQGTLLTVTKP	41BB sdAb
211	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNNSVI INCDGFYILSLKGYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL	OX40リガンド

10

20

30

40

#	配列	注釈
	MVASLTYKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEF CVL	
212	QVSHRYPRFQ SIKVQFTEYK KEKGFIITSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNLSLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEFCVL	OX40リガンド
213	QVSHRYPRIQSIKQFTEYKKEKGFIITSQKEDEIMKVQNNSVI INCDGFYLISLKGYSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL MVASLTYKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEF CVL	OX40リガンド
214	QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGFIITSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNLSLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	OX40リガンド
215	VSHRYPRIQSIKQFTEYKKEKGFIITSQKEDEIMKVQNNSVII NCDGFYLISLKGYSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL MVASLTYKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEF CVL	OX40リガンド
216	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVITRTDTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGLTVTVSS	OX40 VH
217	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIKRT	OX40 VL
218	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFGSAMHWVRQASG KGLEWVGRIRSKANSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTAVYYCTSGIYDSSGYDYWGQGLTVTVSS	OX40 VH
219	DIVMTQSPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLHSNGYNYLDWYLQ KPGQSPQLLIYLGNSRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCMQALQPLTFGGGTKVEIK	OX40 VL
220	EVQLLESQGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAFMYWVRQAPG KGLEWVSSISNRGLKTAYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LRAEDTAVYYCSRVDGDFRGQGLTVTVKP	OX40 sdAb
221	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQ NGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKI QNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFIS	GITRリガンド
222	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVASISSGGTTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGGYYDSMDYWGQGLTVTVSS	GITR VH
223	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASEVDNYGVFSFMNWWYQQK PGQAPRLLIYAASNQGSIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQTKEVTWTFGQGTKVEIK	GITR VL
224	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPP GKALEWLAHIWDDDKYYQPSLKSRLTISKDTSKNQVVLTM TNMDPVDTATYYCARTRRYFPFAYWGQGLTVTVSS	GITR VH
225	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQNVGTNVAWYQQKPGQ APRLLIYSASYRYSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYNTDPLTFGGGTKVEIK	GITR VL
226	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSGGYFWSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGTTYNPVSLKSRVTISIDTSKNQFSLKLSVT AADTAVYYCARDLFYYDTSGPRGFDPPWGQGLTVTVSS	GITR VH

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
227	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVSSNYLAWYQQKPGQ APRLLIYGSSTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYDSSPWTFGQGTKVEIK	GITR VL
228	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCLASGFTFSSYGMHWVRQAP GKGLEWVAVIWYPGSNKYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGGELGRYYYYGMDVWGQGTITVTVS S	GITR VH
229	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTTCRASQGIRNDLGWYQQKPGK APKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY CLQHNNYPWTFGQGTKVDIK	GITR VL
230	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCLASGSVFSIDAMGWYRQAPG KQRELVAVLSSGSSAKYAASAPGRFTISRDNKNTVYLQMSL RAEDTAVYYCYADVSTGWGRDAHGYYWGQGTITVTV	GITR sdAb
231	<u>MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQ</u> <u>AQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRS</u> <u>FLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIOVTLAICSSTTASRHHPTTL</u> <u>AVGICSPASRSISLLRSLFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTG</u> <u>TLLPSRNTDETFFGVQWVRP</u>	UniProt 番号 P32970, CD70- ECD 残基 39- 193 (下線)
232	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCLASGFTFSSYDMHWVRQAP GKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGSGNWGFFDYWGQGTITVTVSS	CD70 VH
233	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISRWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYNTYPRTFGQGTKVEIK	CD70 VL
234	QVQLQSQGGGLVQPGGSLRLSCLASGSIFSINGMGWYRQAPG KERELVAGLTSGGSVTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCRAEIFTRTGENYYGMDYWGKGTQVTVKP	ICOS sdAb
235	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCLASGRMFSNYAMGWFRQAP GKEREFVAAINYRRDAADYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRRDDYNYWGQGTITVTVK P	CD28 sdAb
236	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ゼータシグナ リングドメイン
237	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL	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	FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRS	CD28 由来 共刺激 ドメイン3
241	KPTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDF ASDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC	CD8由来 ヒンジおよび 膜貫通ドメイン
242	AKPTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVIT	CD8由来 ヒンジおよび 膜貫通ドメイン

10

20

30

40

#	配列	注釈
243	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	CD8 ヒンジおよび 膜貫通ドメイン
244	MPGGCSRGAAGDGRLRLARLALVLLGWVSSSSPTSSASSFSS SAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECEAAARTVKCVNRNLTEVP TDLPAYVRNLF LTGNQLAVLPAGAFARRPPLAELAAALNSGSR LDEVRAFAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFAFSGSNASVSAPS PLVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALLAGRALQGLRRLE LASNHFLYLPRDVLALQPSLRHLDLSSNSLVSLTYVSFRNLTH LES LHLEDNALKVLHNGTLAELQGLPHIRVFLDNNPWVCDCH MADMVTWLKETEVVQKDRLTCAYPEKMRNRVLELNSAD LDCDPILPPSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLYLNRKGIKKWM HNIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNLSSNSDV	5T4
245	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQTPG KEREFVAAVRWIGGATRYTDSVKGRFSISKDNAINTVY LQMN SLKSEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYS DWGQGTQVTVKP	L12E9
246	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KGRFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYS DWGQGTLVTVKP	hz12E9v1
247	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYS DWGQGTLVTVKP	hz12E9v2
248	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYS DWGQGTLVTVKP	hz12E9v3
249	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYS DWGQGTLVTVKP	hz12E9v4
250	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYS DWGQGTLVTVKP	hz12E9v5
251	EVQLVESGGGEVQAGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQTPG KEREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYS DWGQGTLVTVKP	hz12E9v6
252	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYTDSVKGRFSISKDN AKNTVY LQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYS DWGQGTLVTVKP	hz12E9v7
253	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTISRDN AINTVY LQMN SLKSEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYS DWGQGTQVTVKP	hz12E9v8
254	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYS DWGQGTLVTVKPGG	hz12E9v9
255	QVQLVQSGGGLVQAGDSLTLSCAVSERPFGTYAMGWFRQAP GRERDLVAASVRNGGASQYGDSVKGRFSISRDN IKNTMYLQM NSLKPEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGTQ VTVKP	L14B5
256	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSGTYAMGWFRQAPG KGRDLVSAVSRNGGASQYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGTLV TVKP	hz14B5v1

10

20

30

40

#	配列	注釈
257	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNNGGASQYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v2
258	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNNGGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v3
259	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNNGGASQYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v4
260	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNAGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v5
261	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNTGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v6
262	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRQGGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v7
263	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRGGGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v8
264	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNNGGASQYGDSVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v9
265	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNNGGASQYGESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v10
266	EVQLVESGGGEVQAGDSLTLSCAVSERPFQTYAMGWFRQAP GRERDLVAAVSRNAGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQ MSSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v11
267	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNAGASQYGESVKGRFSISRDNKNTMYLQMS SLKPEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v12
268	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNAGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v13
269	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KEREFVAAVSRNAGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v14

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
270	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNAGASYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v15
271	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNAGASQYGEFVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v16
272	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNAGASYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v17
273	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFSSYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNAGASYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v18
274	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFQTYAMGWFRQAP GKERDLVAAVSRNAGASYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQ MSSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v19
275	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNAGASYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v20
276	QVQLLQSGGGLVQAGGSLILSCAVSGRPFSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNGGSSYYADFKGRFTISRDNKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGTQ LTVKP	L16G10
277	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSAMGWFRQAPG KGRVTSVAVSRNGGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGT LTVKP	hz16G10v1
278	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNGGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGT LTVKP	hz16G10v2
279	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNGGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGT LTVKP	hz16G10v3
280	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRQGGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGT LTVKP	hz16G10v4
281	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRGGGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGT LTVKP	hz16G10v5
282	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNAGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGT LTVKP	hz16G10v6

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
283	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNTGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEITYTEKHDTYWGQGLV TVKP	hz16G10v7
284	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNGGSSYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEITYTEKHDTYWGQGLV TVKP	hz16G10v8
285	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNGGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEITYTEKHDTYWGQGLV TVKP	hz16G10v9
286	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNAGSSYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEITYTEKHDTYWGQGLV TVKP	hz16G10v10
287	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSYAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNAGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEITYTEKHDTYWGQGLV TVKP	hz16G10v11
288	RRPFSSKTMA	5T4CDR-H1
289	GRPFSSKTMA	5T4 CDR-H1
290	ERPFGTYAMG	5T4 CDR-H1
291	ERPFSYAMG	5T4 CDR-H1
292	GRPFGTYAMG	5T4 CDR-H1
293	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPK GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWFVGCGLKLTVL	抗CD3 VL (CON)
294	QVQLVQSGGGLVQAGASRLSCVASGRTRSLRTMAWFRQAP GKERIFVAAISWRSDSTYYADSVKGRFTISRDNKNTAYLQM NTLKPEDTAVYYCAAGGGWLATTPDEITYWGQGLVTVKP	7E1
295	QVQLQESGGGLMQAGDSLRLSCVVSQVTWNSYTMWFRQA PGKEREFVAAIRWTVDTTYYADSVKGRFTISRDIYAKKTMYLQ MNNLKPEDAAYVYCAVGRKWPKADYWGQGLVTVKP	14F4
296	GRTRSLRTMA	5T4 CDR-H1
297	GVTWNSYTM	5T4 CDR-H1
298	AISWRSDSTY	5T4 CDR-H2
299	AIRWTVDTTY	5T4 CDR-H2
300	GGGWLATTPDEITY	5T4 CDR-H3
301	GRKWPKADY	5T4 CDR-H3
302	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASRRPFSSKTMAWFRQTPG KEREFVAAVRWIGGATRYTDSVKGRFSISKDNAINTVYLQTN LKSEDTAVYYCAAGQWGTGKFTDYSWQGLVTVKP	4D3
303	GQWGTGKFTDYS	5T4 CDR-H3
304	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKGRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v1
305	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v2

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
306	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v3
307	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v4
308	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v5
309	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v6
310	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v7
311	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v8
312	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v9
313	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v10
314	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v11
315	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v12
316	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRELVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v13
317	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v14
318	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v15
319	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v16
320	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMNSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v17
321	GSMTGANTMG	CDR1
322	GSVTGANTMG	CDR1
323	GSITGANTMG	CDR1
324	LIGNYVTH	CDR2
325	YTDNLGTS	CDR3

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
326	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYHYADSVKGRFTISRENAKNTVILQMNSLN PEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTVKPGG	18H10
327	PGGGG	リンカー
328	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHA LHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc
329	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHA LHNHYTQKSLSLSP	ホール Fc
330	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSP	ノブ Fc
331	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSP	ホール Fc
332	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEAL HNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
333	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNR YTQKSLSLSP	ホール Fc
334	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEA LHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc
335	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHN HYTQKSLSLSP	ノブ Fc

10

20

30

40

#	配列	注釈
336	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
337	DKTHTCPPCPAPGPGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVTVV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSP	ホール Fc
338	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV VKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGPENNY KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWEQGVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	Fc-Het-1
339	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV VKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	Fc-Het-2
340	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPK GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWFVFGGTKLTVL	抗CD3 VL21
341	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTS S	抗CD3 VH32
342	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPK GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWFVGGGTKLTVL	抗CD3 VL20
343	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADTVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTV	抗CD3 VH34
344	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP	IgG1 ノブ
345	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVTVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP	IgG1 ノブ
346	GGGGSGGGSGGGGS	リンカー
347	GFSFSINAMG	41BB CDR1
348	AIESGRNTV	41BB CDR2
349	LKGNRVVSPSVAY	41BB CDR3

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
350	GFTFNTYAMN	抗CD3 VH CDR1
351	RIRSKYNNYATY	抗CD3 VH CDR2
352	HGNFGDSYVSWFAY	抗CD3 VH CDR3
353	ALWYSNHWV	抗CD3 VL CDR3
354	VLWYSNRWV	抗CD3 VL CDR3
355	GFTFSTYAMN	抗CD3 VH CDR1
356	RIRSKYNNYATY	抗CD3 VH CDR2
357	GSSTGAVTTSNYAN	抗CD3 VL CDR1
358	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVS S	抗CD3 VH33
359	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMGWYRQAPG KRREFVAAIESGRNTVYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS RAEDTAVYYCGLLKGNRVVSPSVAYWGQGLTVTVKP	41BB sdAb
360	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSKTMAWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTFKFTDYSWGWQGLTVTVKP	hz12E9v09
361	IEPDP	リンカー
362	SSPTSSASSFSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECSEAARTVK CVNRNLTEVPTDLPAYVRNLF LTGNQLAVLPAGAFARRPPLA ELAALNLSGSRLDEVRAFAFEHLPSLRQLDL SHNPLADLSPFA FSGSNASVSAPSLVELILNHIVPPEDERQNRSEFGMVVAALLA GRALQGLRRLELASNHFLYLP RDVLAQLPSLRHLDLSNNSLV LTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLAELQGLPHIRVFL DNNPWVCDCHMADMVTWLKETEVVQGDRLTCAYPEKMR NRVLLELNSADLDCDPIPPSLQTS	5T4 ECD、ヒト5T4 のアミノ酸 32～355 (UniProt 番号 Q13641)
363	GGG(GGS) _n , nは0～10である	リンカー
364	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYHYADSVKGRFTISRDNKNTVILQMNSLN PEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTVKP	18H10
365	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKGRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTVKP	hz18H10v1
366	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTVKP	hz18H10v2
367	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTVKP	hz18H10v3
368	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTVKP	hz18H10v4

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
369	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v5
370	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSGVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v6
371	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v7
372	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSGVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v8
373	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSGVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v9
374	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v10
375	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSGVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v11
376	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSGVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v12
377	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRELVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v13
378	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSGVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v14
379	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMQSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v15
380	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v16
381	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQNSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v17
382	SSPTSSASSFSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECSEAARTVK CVNRNLTEVPTDLPAVVRNLFLLTGNQLAVLPAGAFARRPPLA ELAALNLGSRDLDEVRAFAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFA FSGSNASVSAPSPLVELLNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALLA GRALQGLRRLELASNHFLYLPDVLALPSLRHLDLSNNLSLV LTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLAELQGLPHIRVFL DNNPWVCDCHMADMVTWLKETEVVQGDRLTCAYPEKMR NRVLELNSADLDCDLPPLPSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLY LNRKGKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNLSS NSDV	ヒト5T4 構築物
383	SAPSSSVSSSTSPAFLASGSAQPPPAERCPAAECSEAARTV KCVNRNLLEVPADLPYVRNLFLLTGNQMTVLPAGAFARQPPL ADLEALNLSGNHLKEVCAGAFEHPLGLRRDLDSHNPLTNLSAF	マウス5T4 構築物

10

20

30

40

#	配列	注釈
	AFAGSNASVSAPSPLLEELILNHIVPPEDQRQNGSFEGMVAFEG MVAAALRSGALRGLTRLELASNHFLFLPRDLAQLPSLRYLD LRNNSLVSLTYASFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNSTLAEW GLAHVKVFLDNNPWVCDYMACMVAWLKETEVVPDKARLT CAFPEKMRNRGLLDLNSDLDCDAVLPQSLQTSYVFLGIVLAL IGAIFLLVLYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINA DPRLTNLSSNSDV	
384	<u>SSPTSSASSFSSAPFLASAVSAQPPLPDOCPALCECSEAARTVK</u> <u>CVNRNLTEVPTDLPA</u> YVRNLF ¹ LTGNQLAVLPAGAFARRPPLA <u>ELAALNLSGSR</u> LDEV ² RAGAF ³ HLPSLRQDL ⁴ SHNPLADLSPFA <u>FSGSNASVSAPSPLVELILNHIVPPEDERQ</u> NRSFEGMVVAALLS GLALRGLTRLELASNHFLFLPRDLAQLPSLRYLDLRNNSLV SLTYASFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNSTLAEWGLAHVKV LDNNPWVCDYMACMVAWLKETEVVPDKARLTCAFPEKMR NRGLLDLNSDLDCDAVLPQSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLV LYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNLS SNSDV	hmc5T4.1 (下線は ヒト残基)
385	SAPSSSVSSSTSPA ¹ AF ² LAGSAQPPPAERCPAAECSEAARTV KCVNRNLLEVPADLPPYVRNLF ³ LTGNQMTVLPAGAFARQPPL ADLEALNLSGNHLKEVCAGAF ⁴ HLPSLRQDL ⁵ SHNPLADLSPF <u>AFSGSNASVSAPSPLVELILNHIVPPEDERQ</u> NRSFEGMVVAALL <u>AGRALQGLRRLELASNHFLYLP</u> RDVLAQLPSLRHLDLSNNSLV <u>SLTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNSTLAEW</u> GLAHVKV FLDNNPWVCDYMACMVAWLKETEVVPDKARLTCAFPEKM RNRGLLDLNSDLDCDAVLPQSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLV LYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNL SNSDV	hmc5T4.2 (下線は ヒト残基)
386	<u>SSPTSSASSFSSAPFLASAVSAQPPLPDOCPALCECSEAARTVK</u> <u>CVNRNLTEVPTDLPA</u> YVRNLF ¹ LTGNQMTVLPAGAFARQPPLA DLEALNLSGNHLKEVCAGAF ² HLPLGLRRDL ³ SHNPLTNLSAFA FAGSNASVSAPSPLLEELILNHIVPPEDQRQNGSFEGMVAFEGM VAAALRSGALRGLTRLELASNHFLFLPRDLAQLPSLRYLDL RNNLSVSLTYASFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNSTLAEW GLAHVKVFLDNNPWVCDYMACMVAWLKETEVVPDKARLT CAFPEKMRNRGLLDLNSDLDCDAVLPQSLQTSYVFLGIVLALI GAIFLLVLYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINA DPRLTNLSSNSDV	hmc5T4.3 (下線は ヒト残基)
387	SAPSSSVSSSTSPA ¹ AF ² LAGSAQPPPAERCPAAECSEAARTV KCVNRNLLEVPADLPPYVRNLF ³ LTGNQMTVLPAGAFARQPPL ADLEALNLSGNHLKEVCAGAF ⁴ HLPLGLRRDL ⁵ SHNPLTNLSAF AFAGSNASVSAPSPLLEELILNHIVPPEDQRQNGSFEGMVAFEG MVAAALRSGALRGLTRLELASNHFLFLPRDLAQLPSLRYLD LRNNSLVSLTYASFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNSTLAEW GLAHVKVFLDNNPWVCDYMACMVTWLKETEVVQGDRLT <u>CAYPEKMRNRVLELNSADLDCD</u> PILPPSLQTSYVFLGIVLALI GAIFLLVLYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINA DPRLTNLSSNSDV	hmc5T4.4 (下線は ヒト残基)
388	EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAP GKGLEWVSGISWNSGSIYADSVKGTISRDN ¹ AKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH 312557
389	EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAP GKCLEWVSGISWNSGSIYADSVKGTISRDN ¹ AKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH 312557 G44C

10

20

30

40

#	配列	注釈
390	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYC QQYNNWPWTFGCGTKVEIK	抗CD3 VL 312557
391	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDAVYYC QQYNNWPWTFGCGTKVEIK	抗CD3 VL 312557 Q100C
392	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYSMHWRQAP GKGLEWVSGISWNSGSKDYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQM NSLRAEDTALYYCAKYGSGYGKIFYHYGLDVWGQGTTVTVSS	CD3-VH-G
393	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYSMHWRQAP GKCLEWVSGISWNSGSKDYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQM NSLRAEDTALYYCAKYGSGYGKIFYHYGLDVWGQGTTVTVSS	CD3-VH-G
394	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYSTPPITFGCGTRLEIK	V _{K1} -39Jk5
395	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYSTPPITFGCGTRLEIK	V _{K1} -39Jk5 Q100C
396	(ADAAP)n n=2-20	リンカー
397	(ADAAP)n-G n=2-20	リンカー
398	(GEPQG)n n=2-20	リンカー
399	(GEPQG)n-G n=2-20	リンカー
400	(AGGEP)n n=2-20	リンカー
401	(AGGEP)n-G n=2-20	リンカー
402	(AGSEP)n n=2-20	リンカー
403	(AGSEP)n-G n=2-20	リンカー
404	(GGGEQ)n n=2-20	リンカー
405	(GGGEQ)n-G n=2-20	リンカー
406	ADAAPADAAPG	リンカー
407	GEPQGGEPQGG	リンカー
408	AGGEPAGGEPG	リンカー
409	AGSEPAGSEPG	リンカー
410	GGGEQGGGEQG	リンカー
411	AYVRNLFITGNQLAVLPAGAFARRPPLAELAAALNLSGSRLE VRAGAFEHLPS	ヒト5T4 ECDの アミノ酸60～112
412	LAGRALQGLRRLELASNHFLYLPDVLALQPSLRHLDLSNNSL VSLTYVSFR	ヒト5T4 ECDの アミノ酸173～224

10

20

30

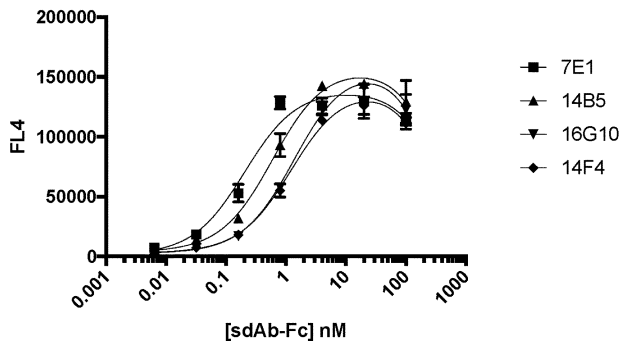
40

50

【 図 面 】

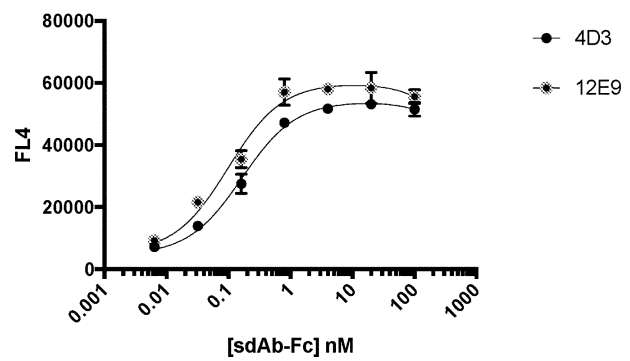
【 図 1 A 】

293FS結合のフローサイトメトリー



【 図 1 B 】

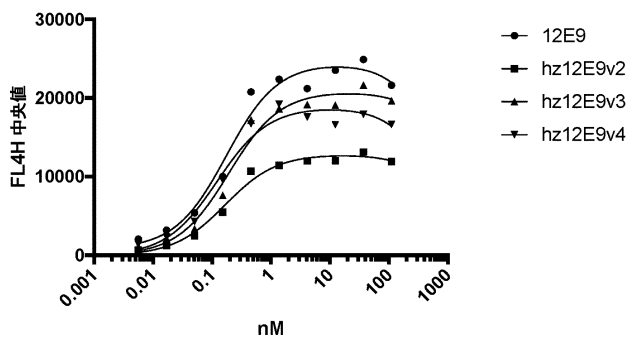
293FS結合のフローサイトメトリー



10

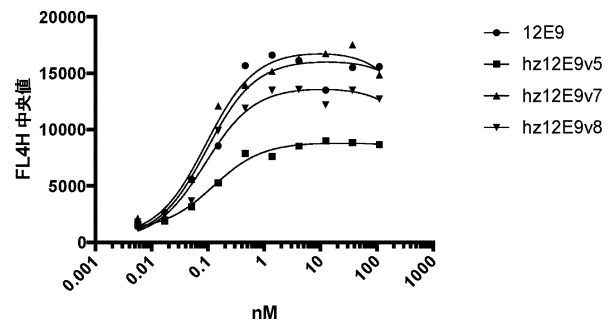
【 図 2 A 】

T47D



【 図 2 B 】

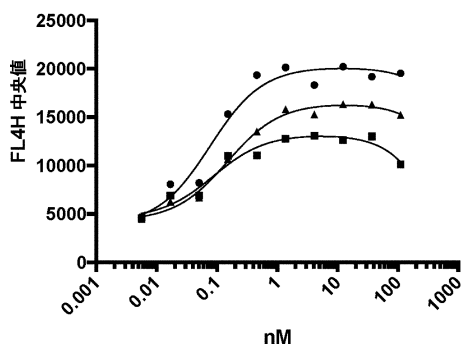
T47D



20

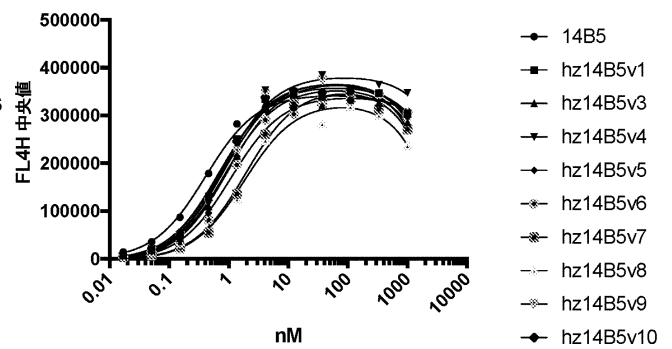
【 図 2 C 】

T47D



【 図 2 D 】

T47D

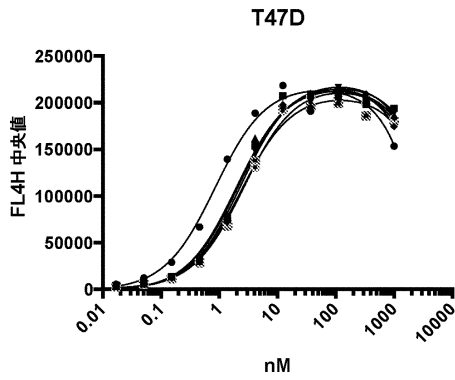


30

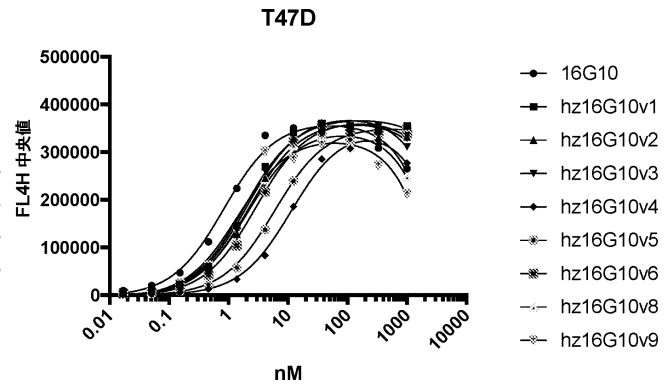
40

50

【図 2 E】

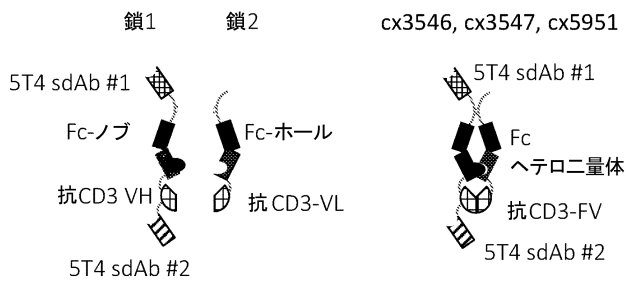


【図 2 F】

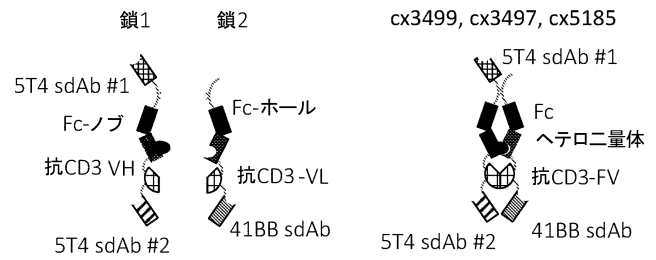


10

【図 3 A】

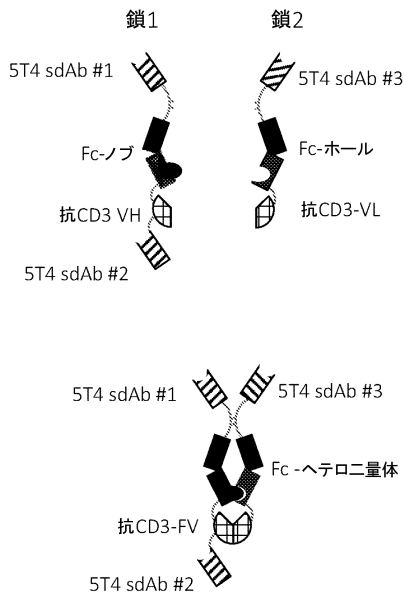


【図 3 B】

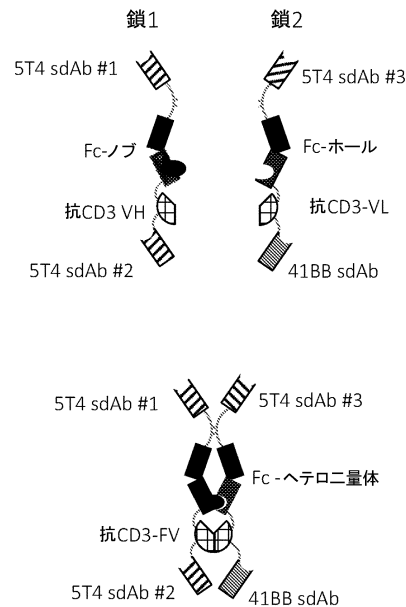


20

【図 3 C】



【図 3 D】

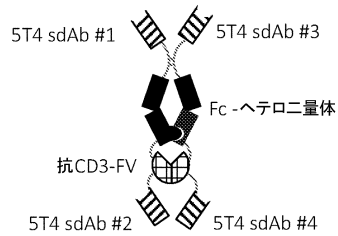
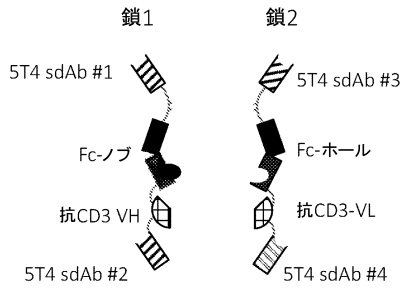


30

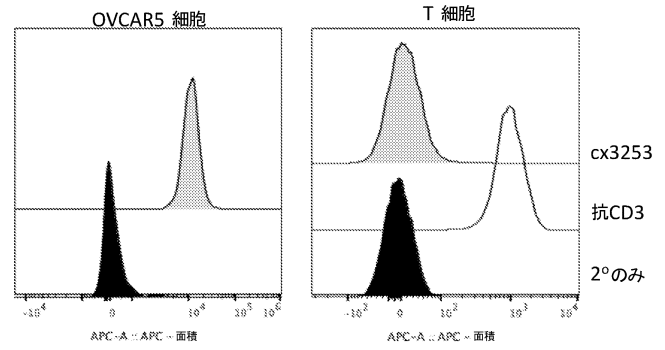
40

50

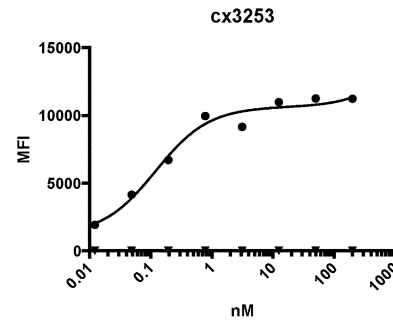
【図 3 E】



【図 4 A】



10

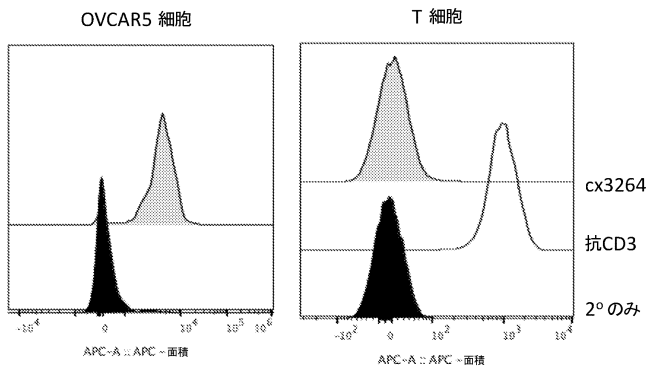


20

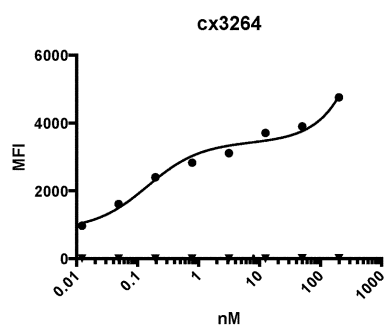
● OVCAR5細胞に対する結合

▼ T細胞に対する結合

【図 4 B】



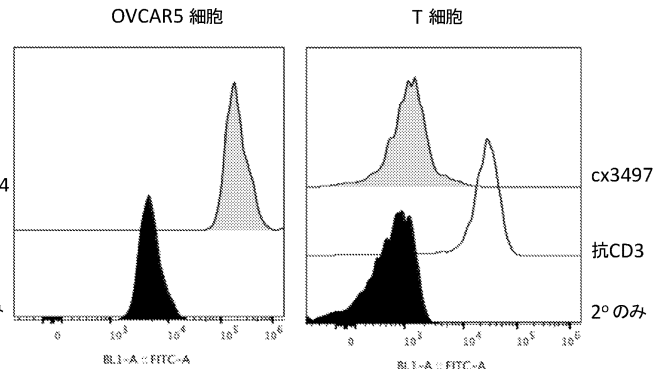
30



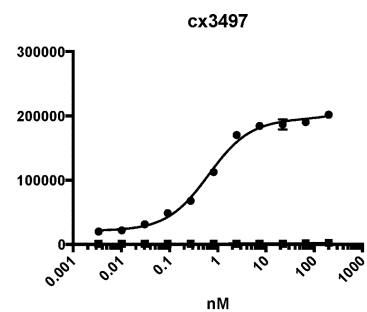
● OVCAR5細胞に対する結合

▼ T細胞に対する結合

【図 4 C】



40

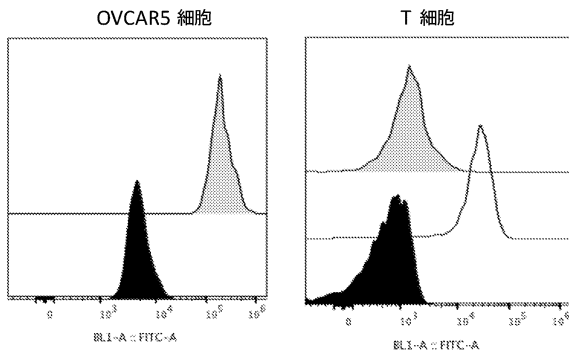


● OVCAR5細胞に対する結合

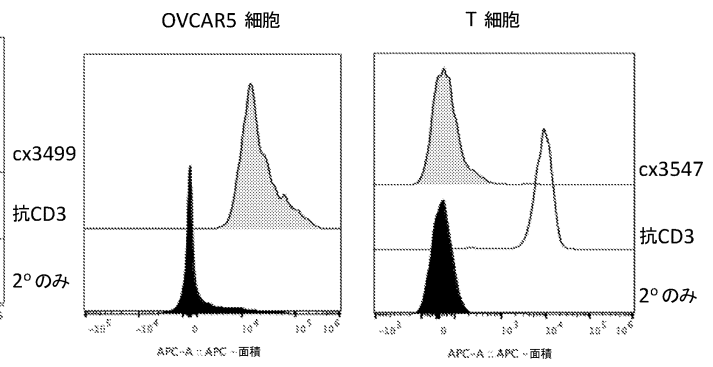
▼ T細胞に対する結合

50

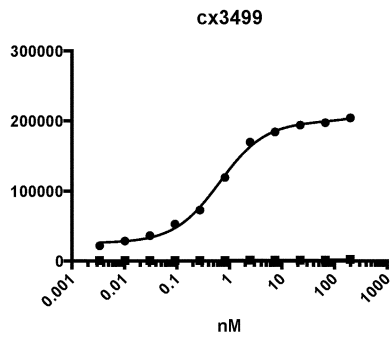
【図 4 D】



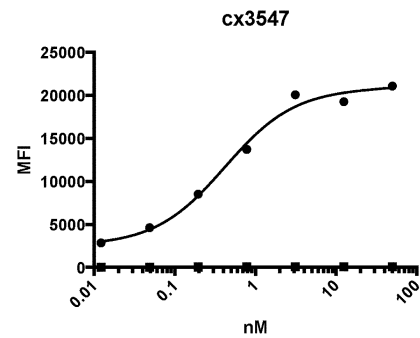
【図 4 E】



10



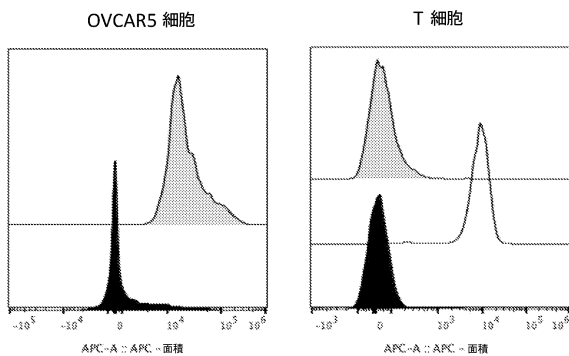
● OVCAR5細胞に対する結合
■ T細胞に対する結合



● OVCAR5細胞に対する結合
■ T細胞に対する結合

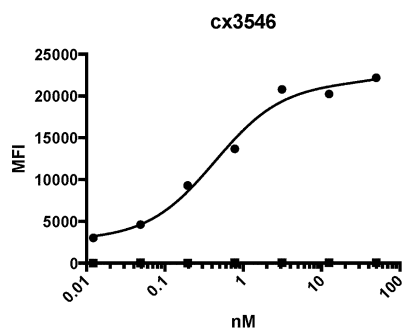
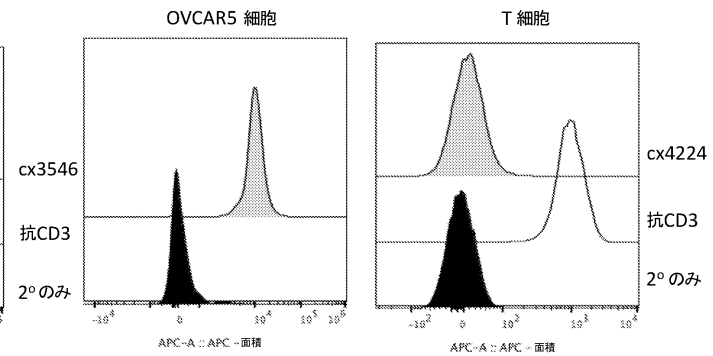
20

【図 4 F】

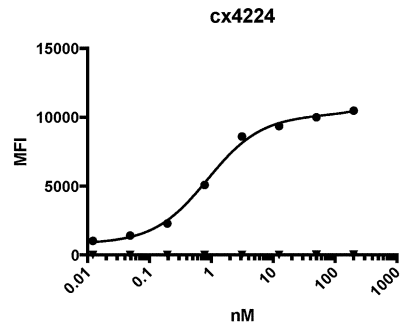


30

【図 4 G】



● OVCAR5細胞に対する結合
■ T細胞に対する結合

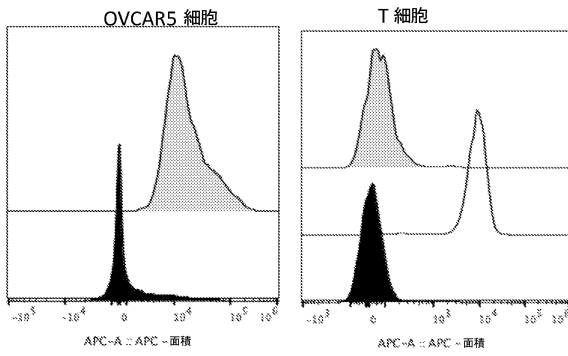


● OVCAR5細胞に対する結合
■ T細胞に対する結合

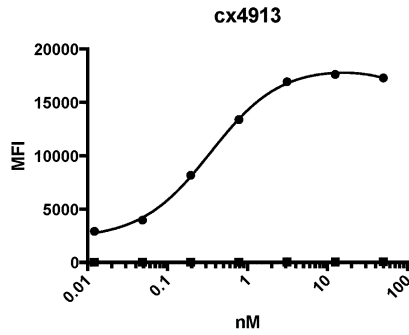
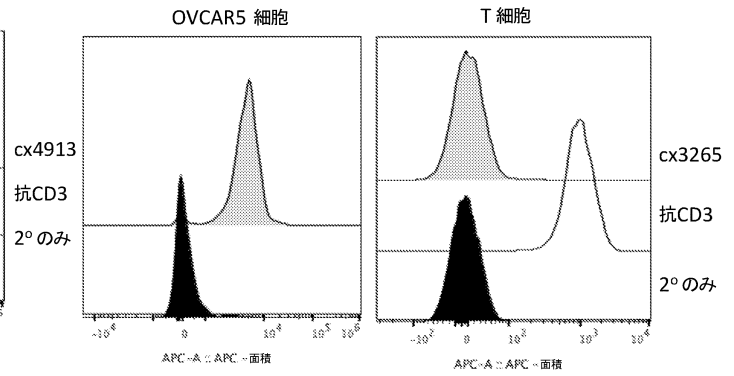
40

50

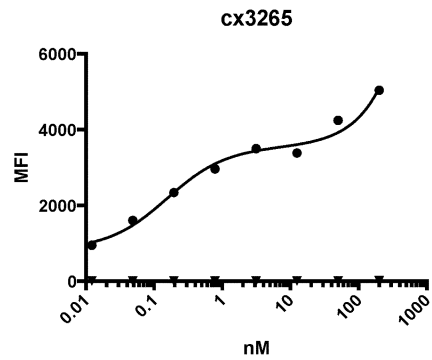
【図 4 H】



【図 4 I】

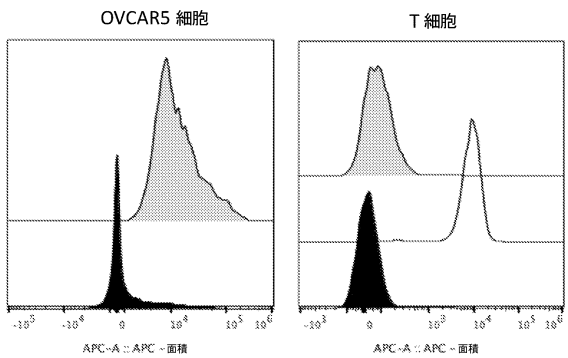


● OVCAR5細胞に対する結合
□ T細胞に対する結合

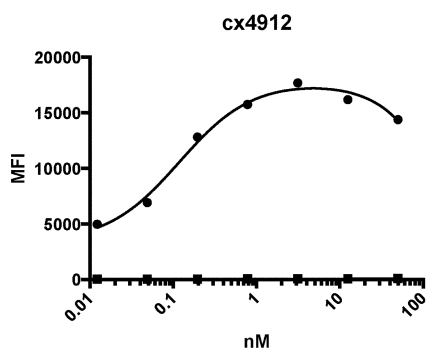
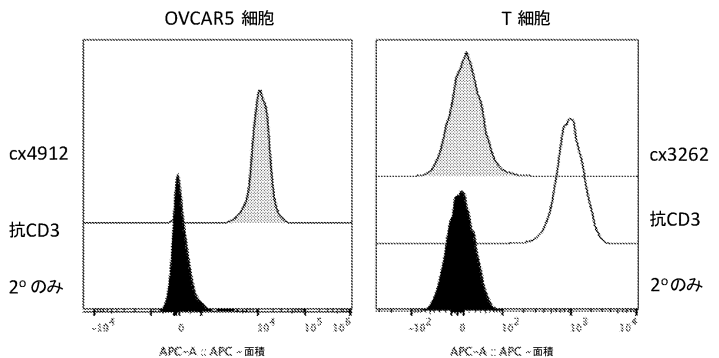


● OVCAR5細胞に対する結合
□ T細胞に対する結合

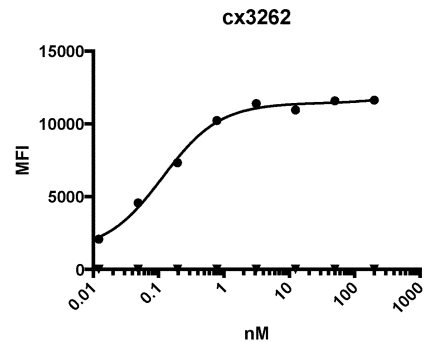
【図 4 J】



【図 4 K】



● OVCAR5細胞に対する結合
□ T細胞に対する結合



● OVCAR5細胞に対する結合
□ T細胞に対する結合

10

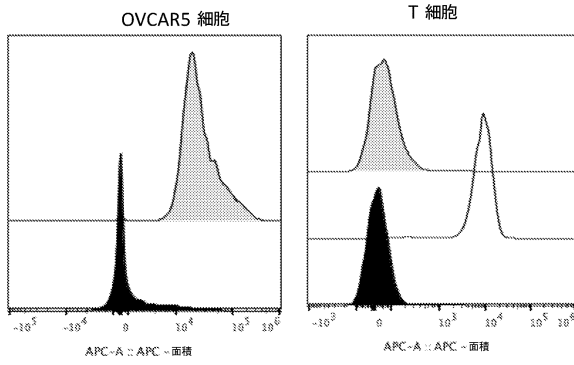
20

30

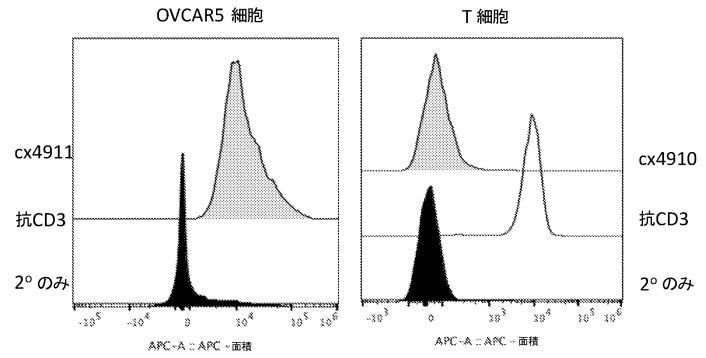
40

50

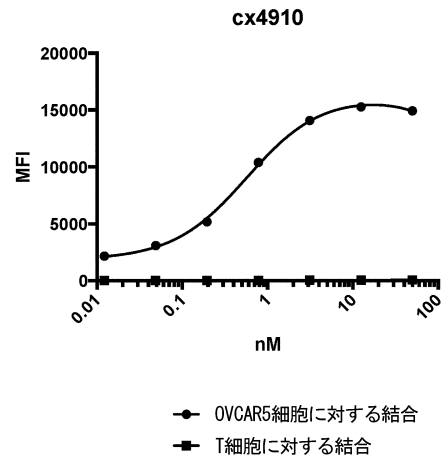
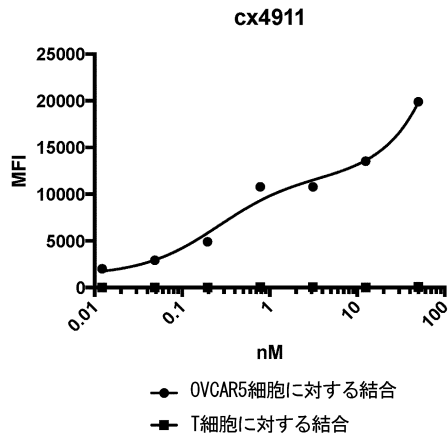
【図 4 L】



【図 4 M】

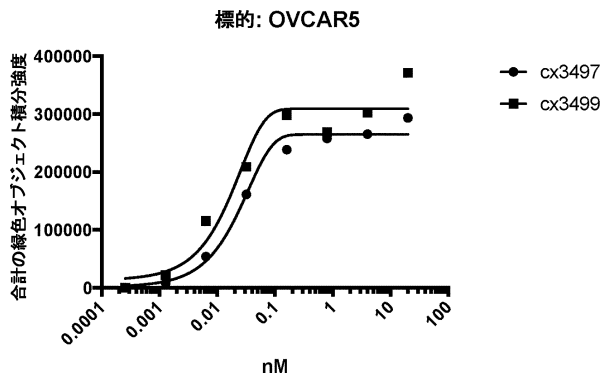


10

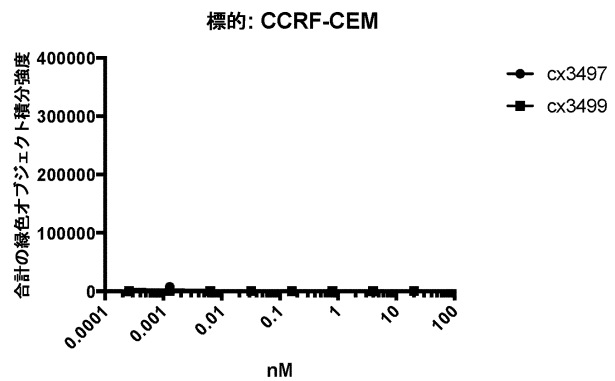


20

【図 5 A】



【図 5 B】



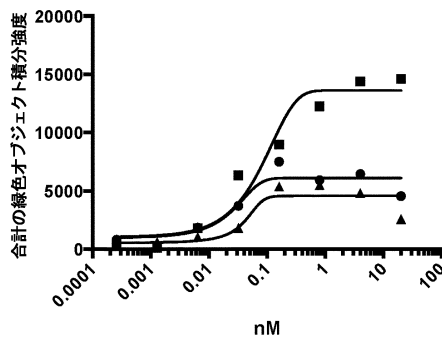
30

40

50

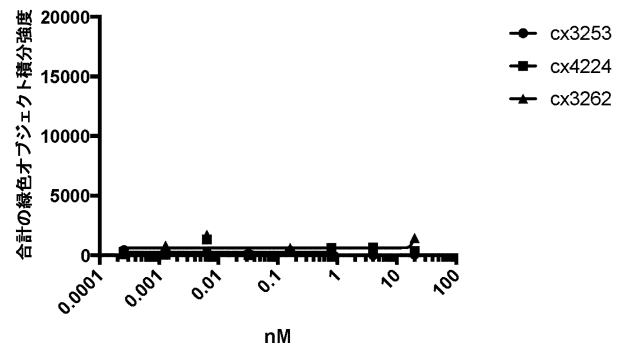
【図 5 C】

標的: OVCAR5



【図 5 D】

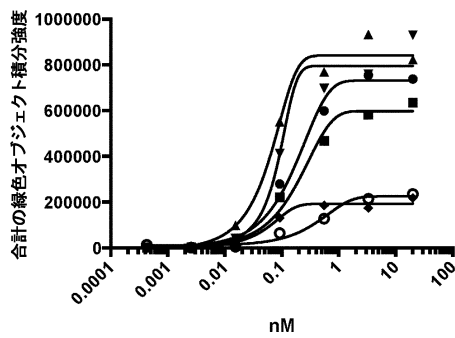
標的: CCRF-CEM



10

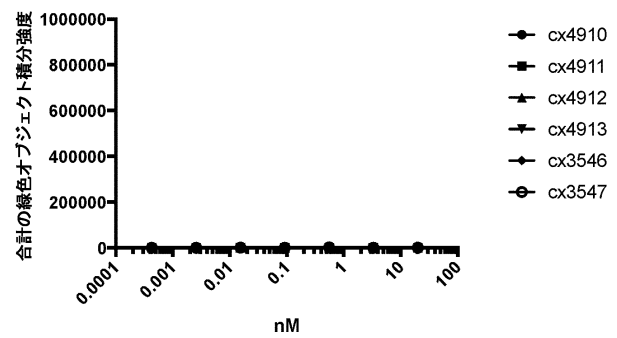
【図 5 E】

標的: OVCAR5



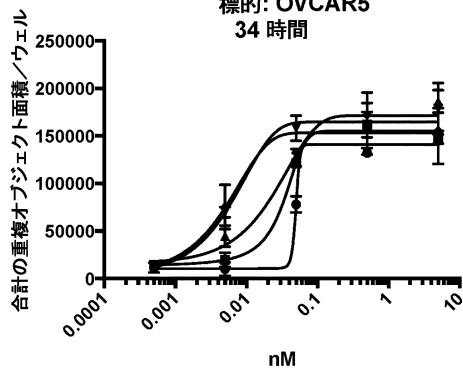
【図 5 F】

標的: CCRF-CEM

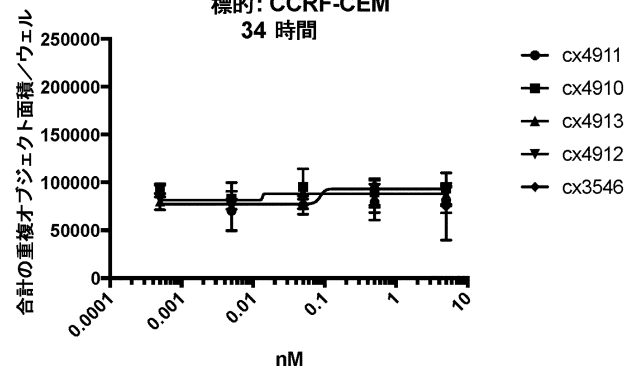


20

【図 6 A】

標的: OVCAR5
34 時間

【図 6 B】

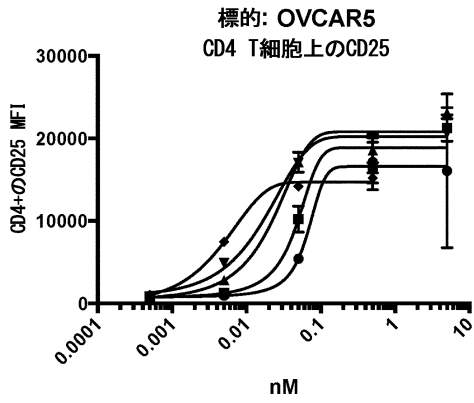
標的: CCRF-CEM
34 時間

30

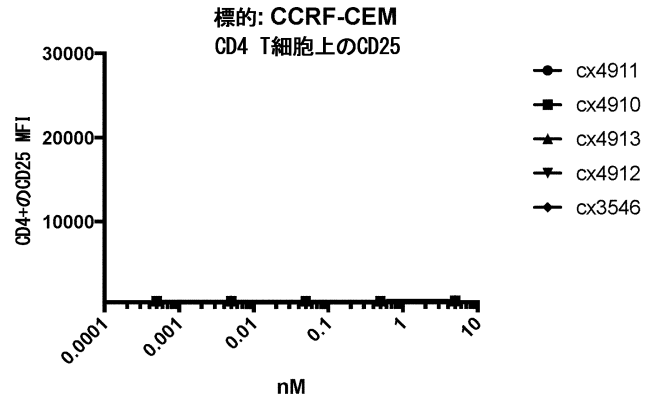
40

50

【図 7 A】

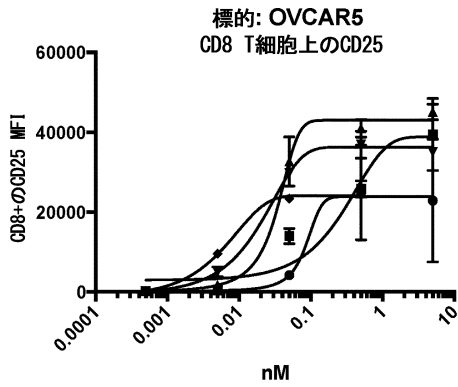


【図 7 B】

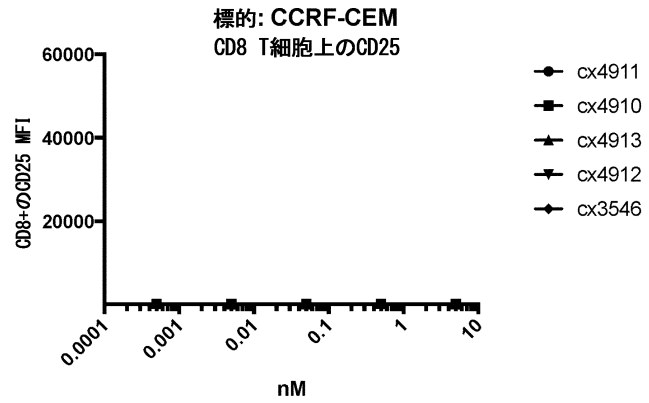


10

【図 7 C】

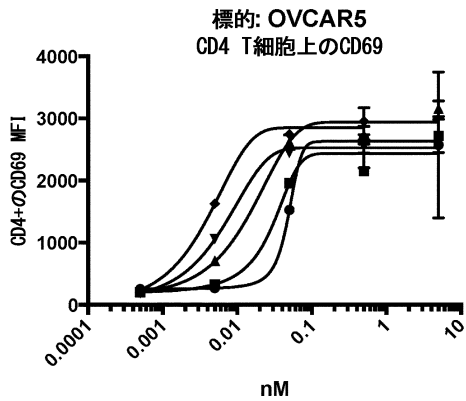


【図 7 D】

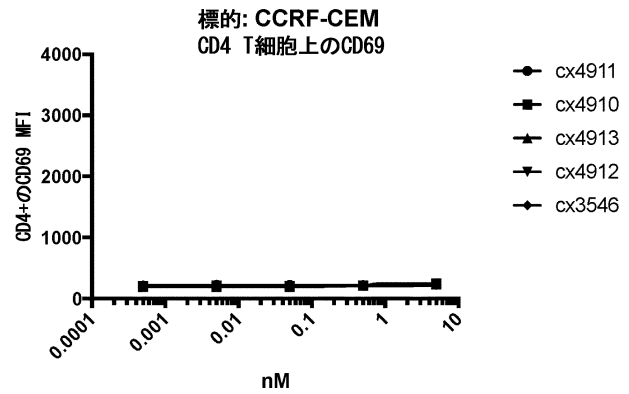


20

【図 8 A】



【図 8 B】

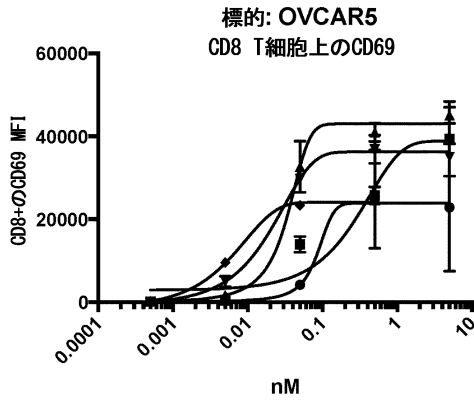


30

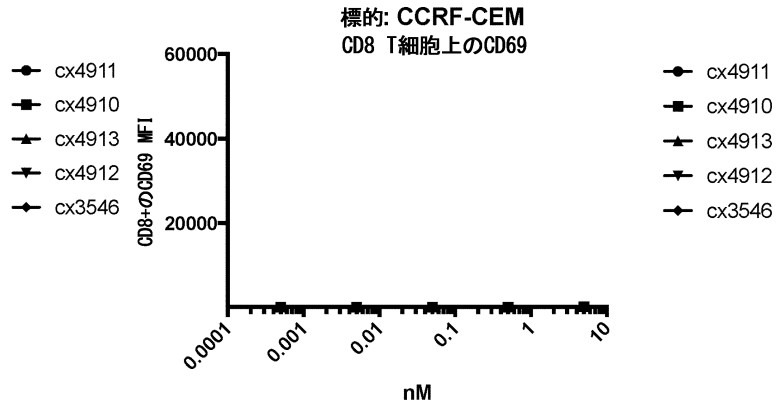
40

50

【図 8 C】

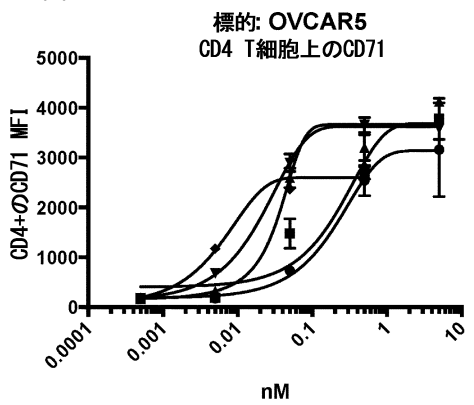


【図 8 D】

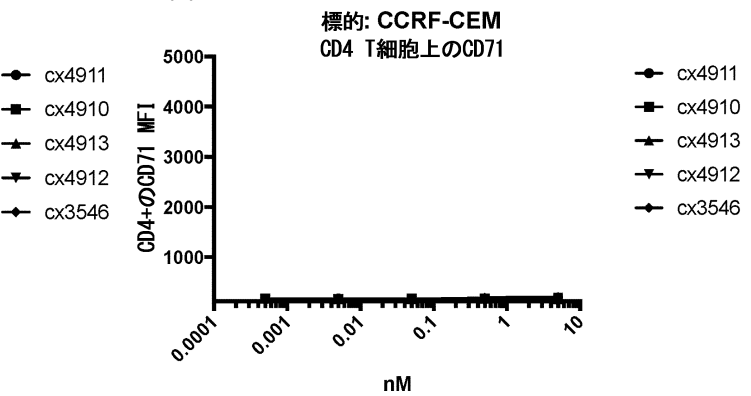


10

【図 9 A】

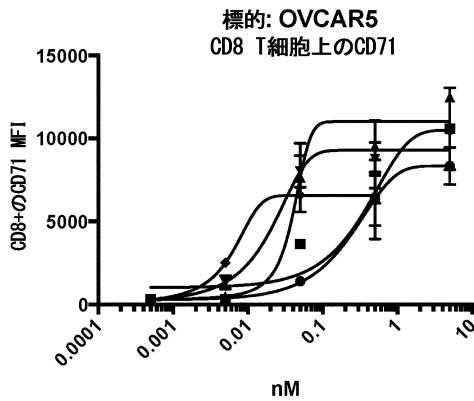


【図 9 B】

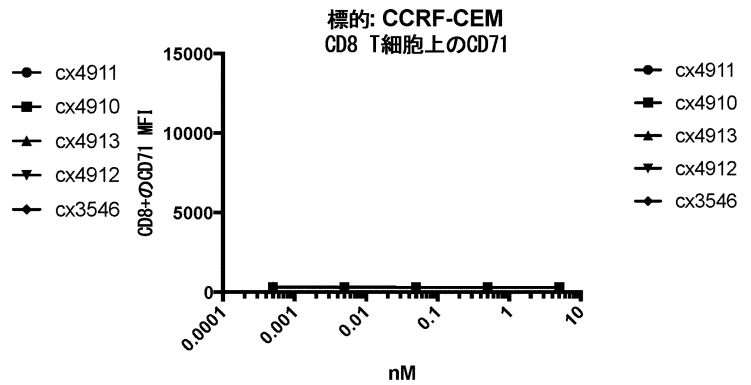


20

【図 9 C】



【図 9 D】

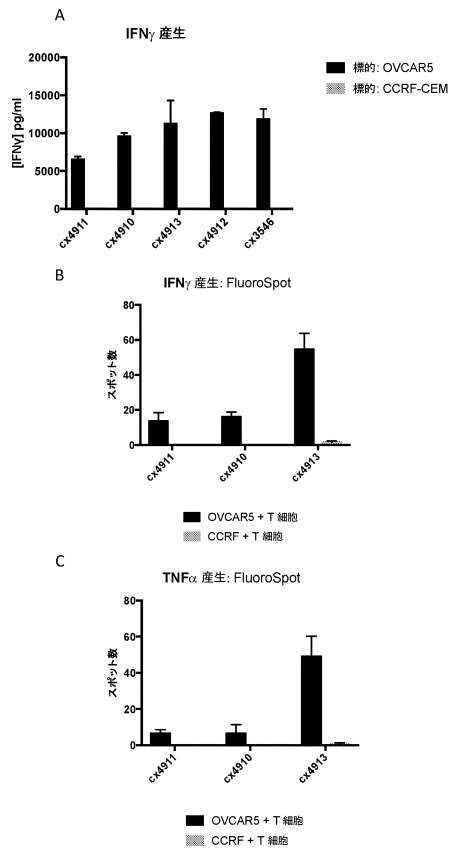


30

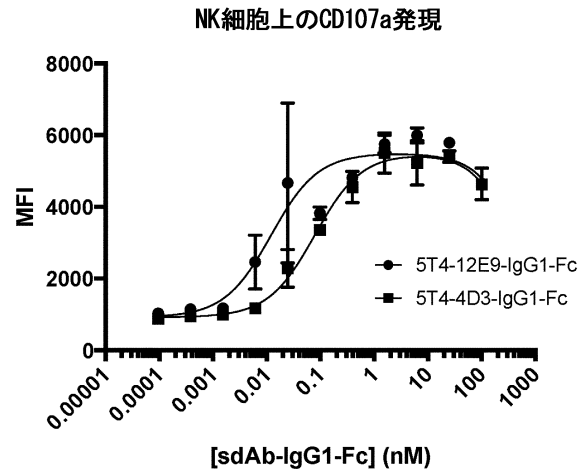
40

50

【図 1 0】



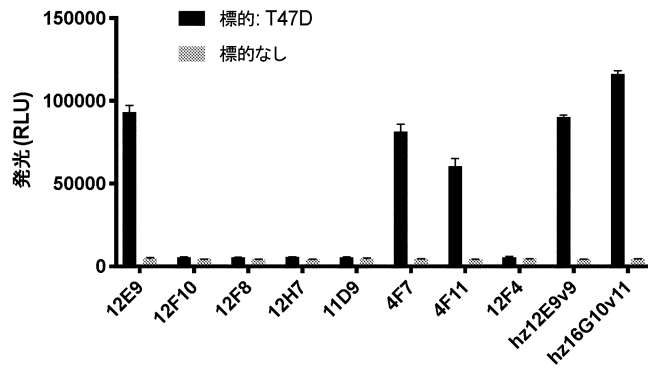
【図 1 1 A】



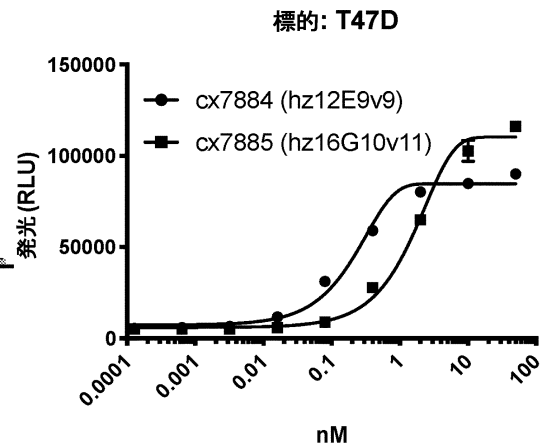
10

20

【図 1 1 B】



【図 1 1 C】

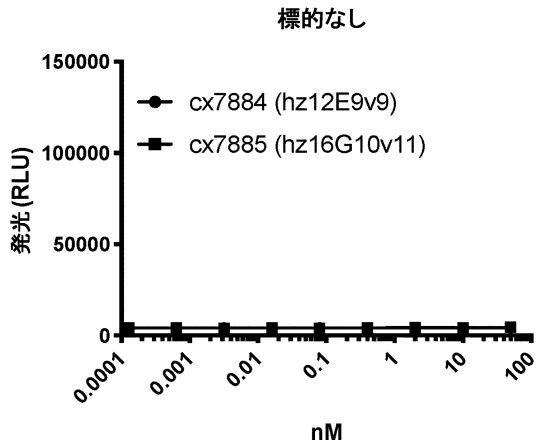


30

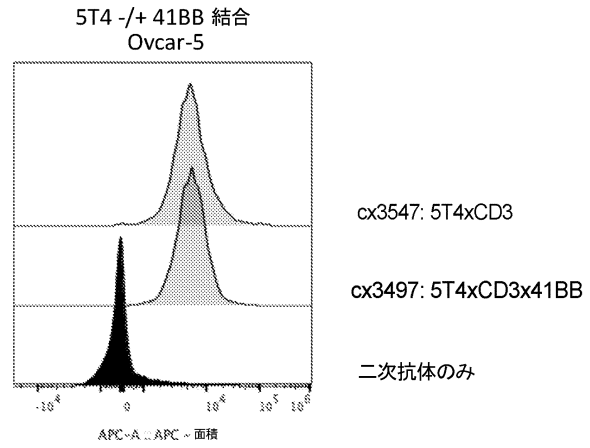
40

50

【図 1 1 D】

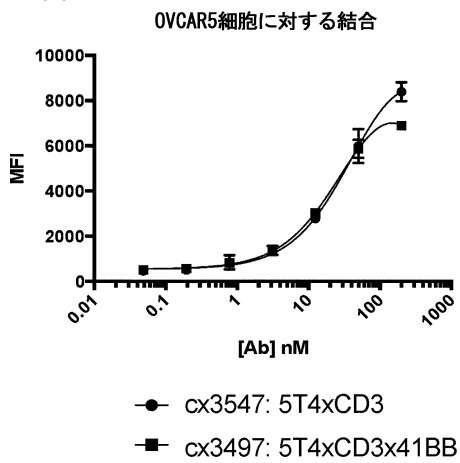


【図 1 2 A】

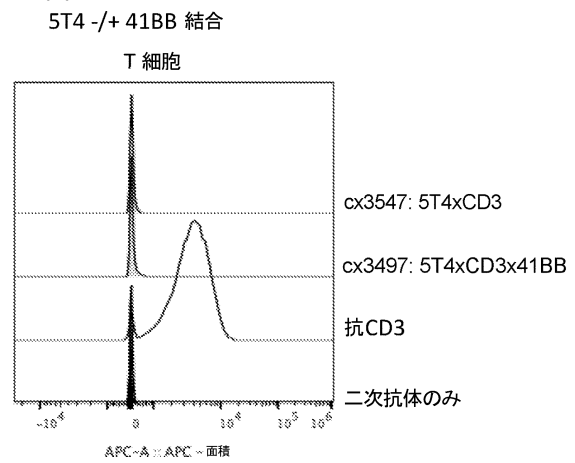


10

【図 1 2 B】



【図 1 2 C】



20

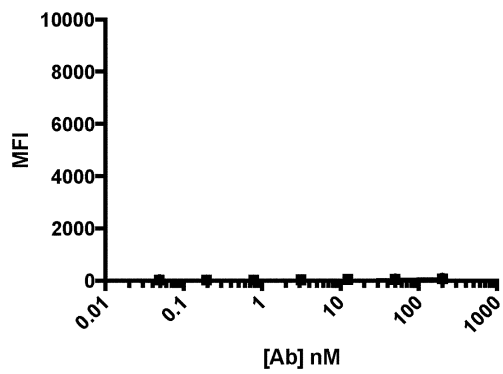
30

40

50

【図 1 2 D】

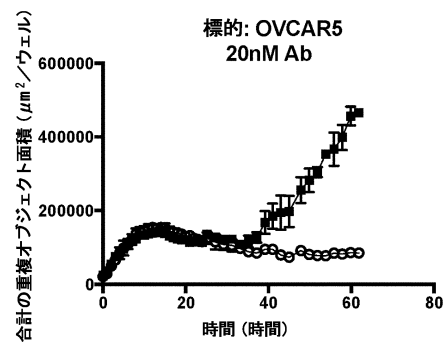
T細胞に対する結合



● cx3547: 5T4xCD3
■ cx3497: 5T4xCD3x41BB

【図 1 3 A】

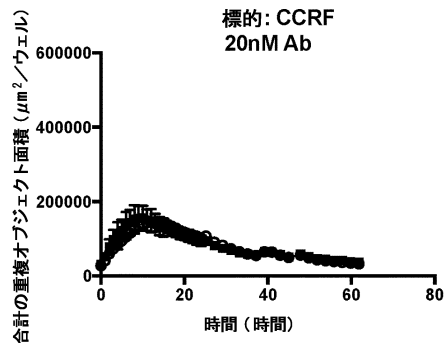
5T4 -/+ 41BB 細胞傷害性



○ cx3547: 5T4xCD3
■ cx3497: 5T4xCD3x41BB

10

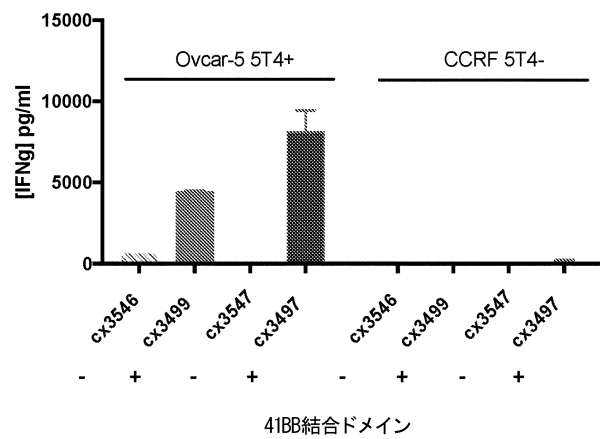
【図 1 3 B】

標的: CCRF
20nM Ab

○ cx3547: 5T4xCD3
■ cx3497: 5T4xCD3x41BB

【図 1 4】

5T4 -/+ 41BB INF ELISA

Ab 20nMでのIFN γ 産生

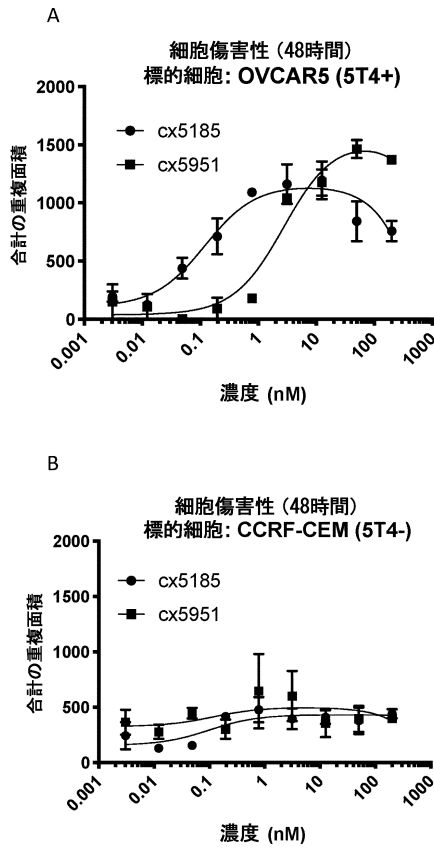
20

30

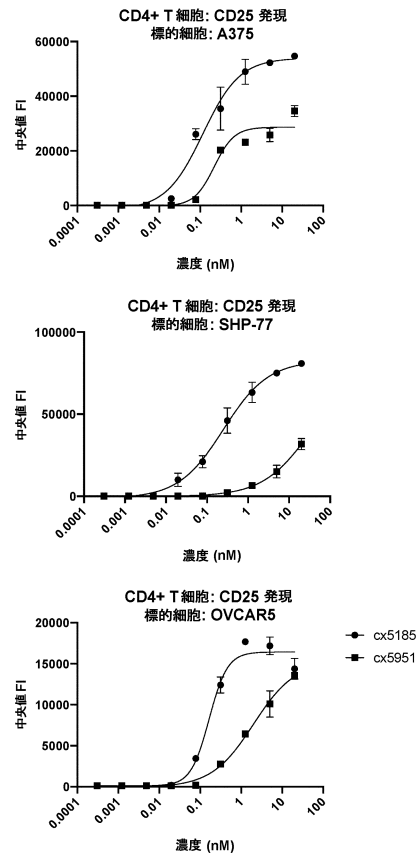
40

50

【図 15】



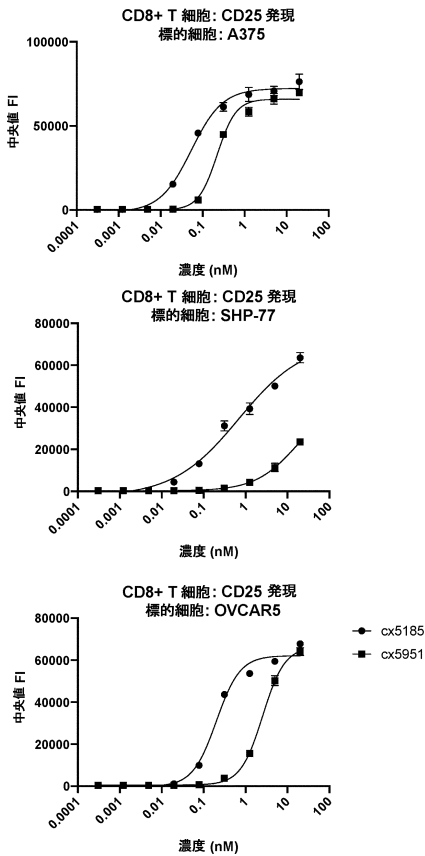
【図 16 A】



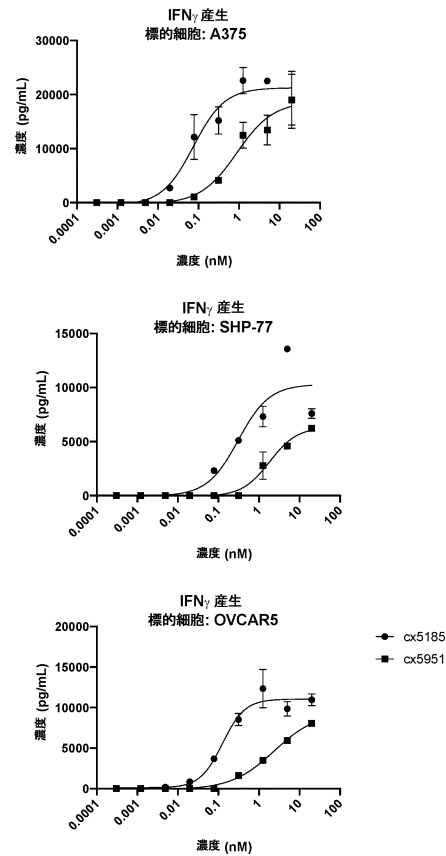
10

20

【図 16 B】



【図 17】

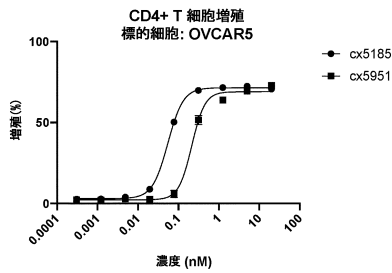
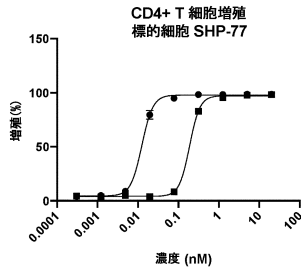
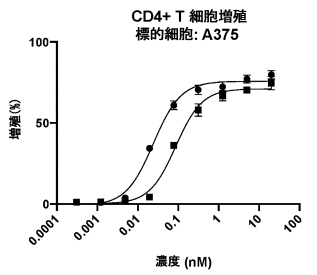


30

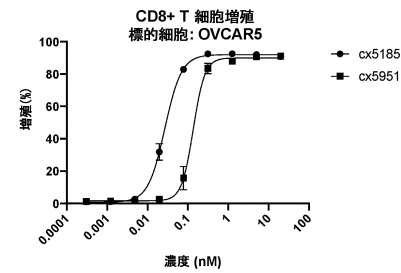
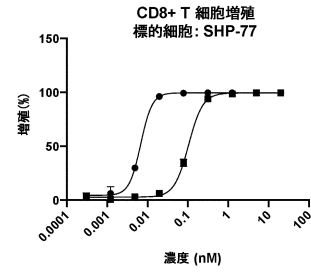
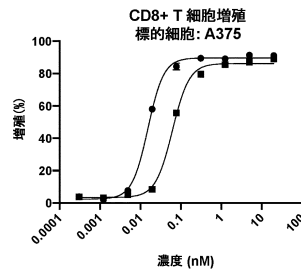
40

50

【図 18】



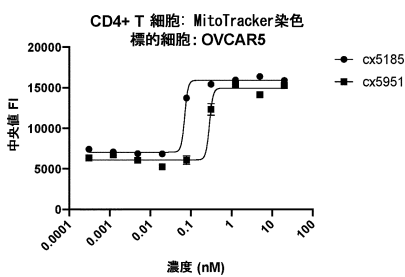
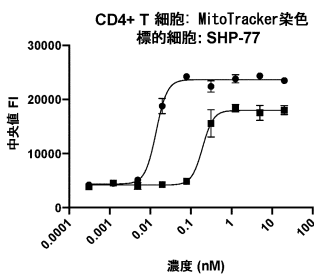
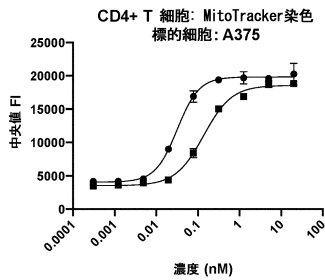
【図 19】



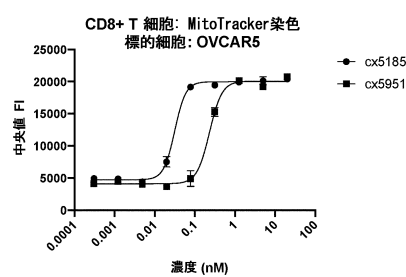
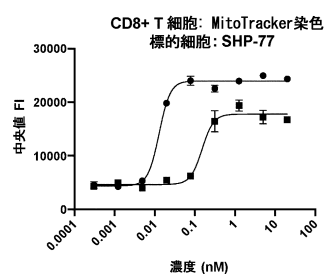
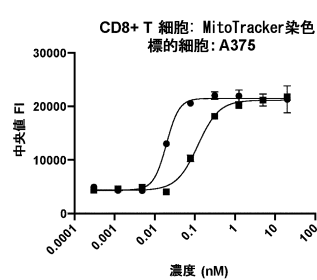
10

20

【図 20】



【図 21】

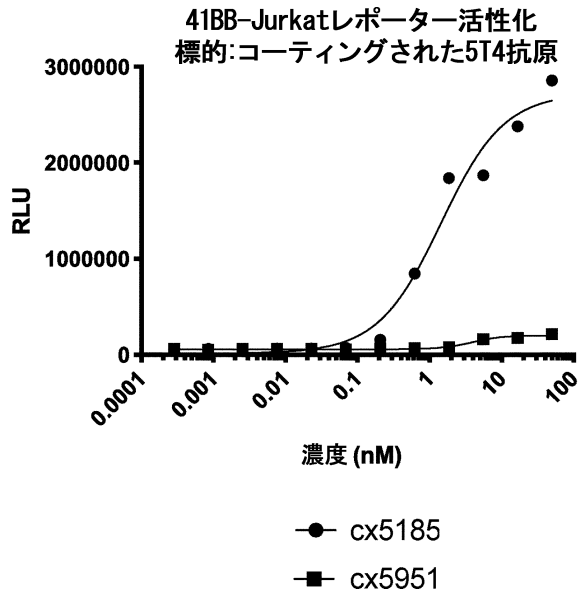


30

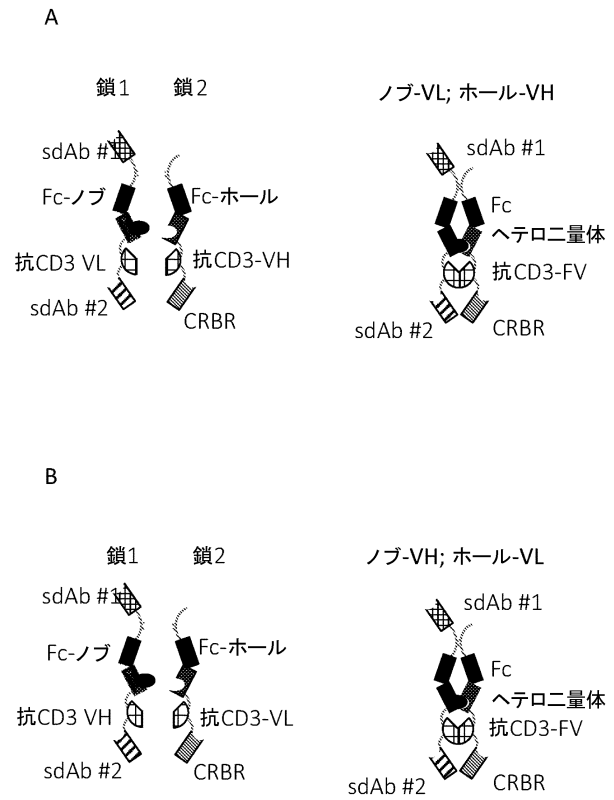
40

50

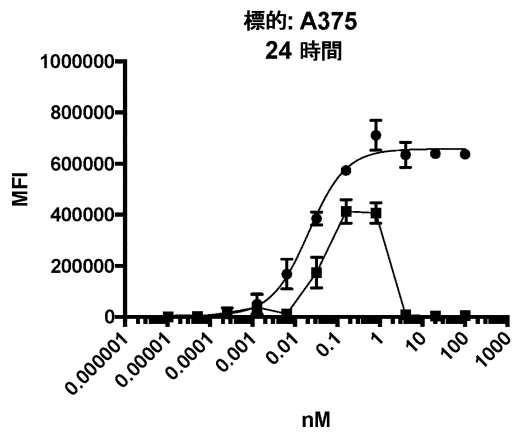
【図 2 2】



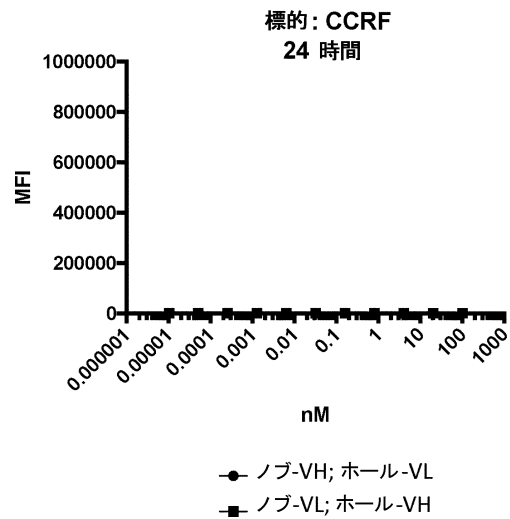
【図 2 3】



【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



10

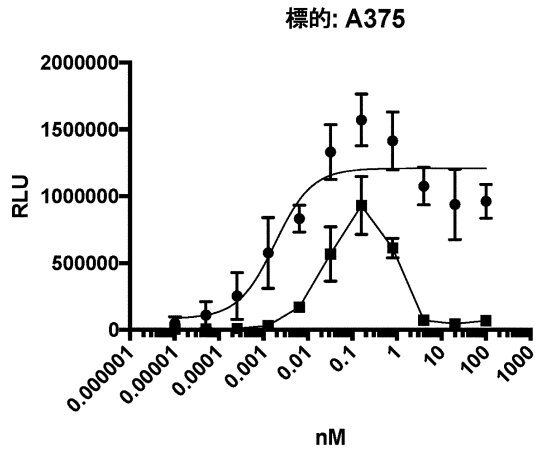
20

30

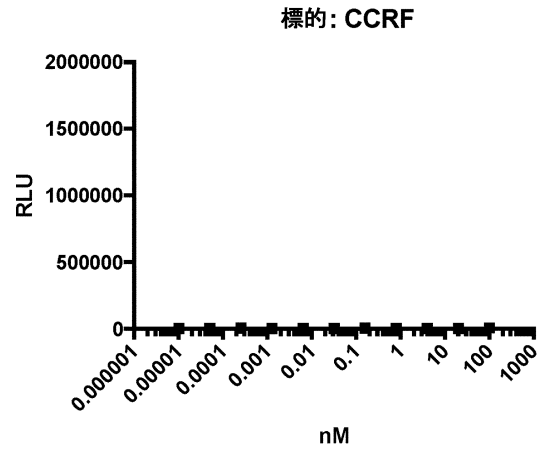
40

50

【図 2 4 C】



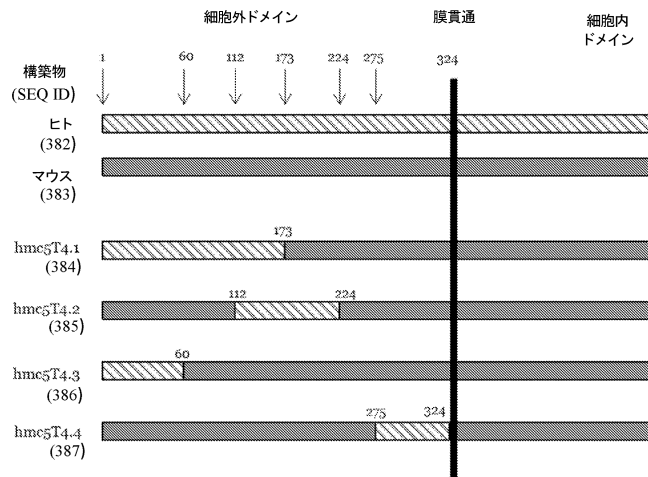
【図 2 4 D】



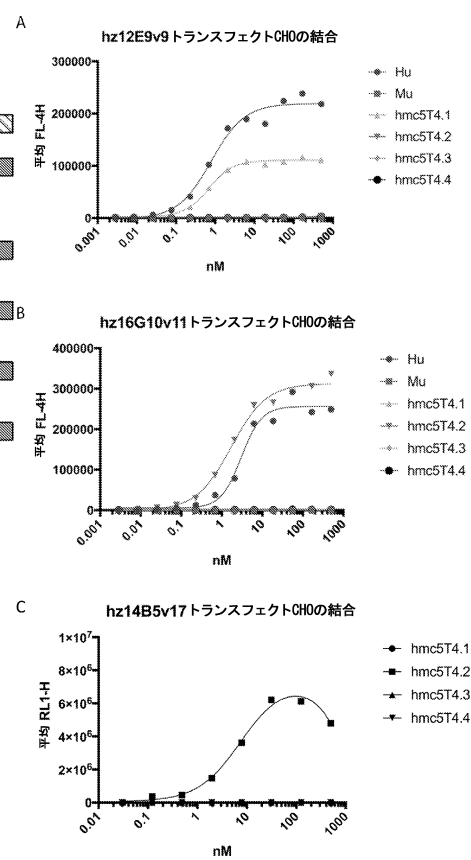
○ ノブ-VH; ホール-VL
 □ ノブ-VL; ホール-VH

10

【図 2 5】



【図 2 6】



20

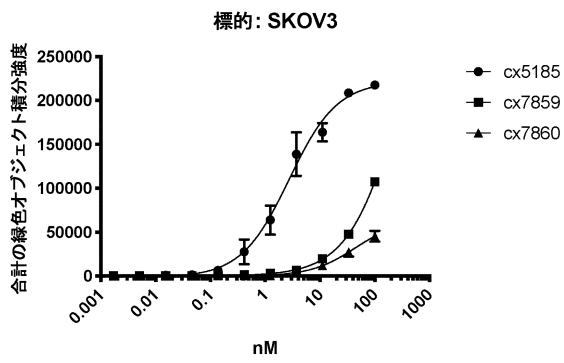
30

40

50

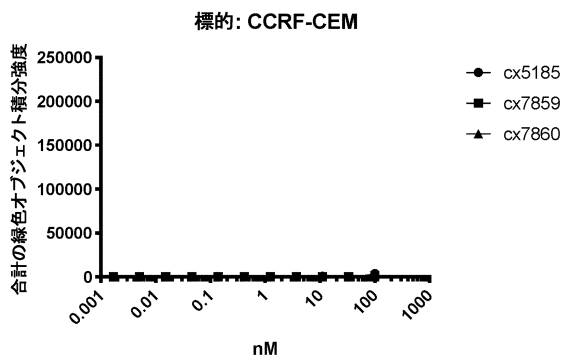
【 図 2 7 】

A



10

B



20

【 配 列 表 】

2022504802000001.app

30

40

50

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 令 和 3 年 6 月 1 6 日 (2 0 2 1 . 6 . 1 6)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 6 7 2

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 6 7 2 】

配 列

#	配列	注釈
1	GGSGGS	(GGG)2リンカー
2	GGSGGSGGS	(GGG)3 リンカー
3	GGSGGSGGSGGS	(GGG)4リンカー
4	GGSGGSGGSGGSGGS	(GGG)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 TLPPSRDEL TNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK	ヒトIgG1 Fc
9	PAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL N GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK	Fc xELL
10	PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKT PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS 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 NYNTTPMLD 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 NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	ヒトIgG4 Fc
13	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK	ヒトIgG4 Fc
14	EPKSSDKTHTCPPC	改変型IgG1 ヒンジ
15	DKTHTCPPC	切断型IgG1 ヒンジ
16	ESKYGPPCPPC	改変型IgG4 ヒンジ
17	GQGTLVTVKPGG	カルボキシ 末端配列

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
18	GQGT LVTVEPGG	カルボキシ 末端配列
19	QVQLVQSGGG VVQPG RSLRL SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGYINPSRGYTNY NQKV KDRFTI SRD NSKNTAF LQMDSL RPED TGVYFCARYYDDHYCLDYWG QGTPVTVSS	OKT3 VH
20	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITC SASSSVS YMNWYQQTPG KAPKRWIYDTSKLASGVPSR FSGSGSGTDY TFTISSLQPE DIATYYCQQW SSNPFTFGQGTKLQIT	OKT3 VL
21	QVQLVQSGGG VVQPG RSLRL SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGKGLEWIGYINPSRGYTNY NQKV KDRFTI SRD NSKNTAF LQMDSL RPED TGVYFCARYYDDHYSLDYWG QGTPVTVSS	OKT3 ヒト化 VH
22	DVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGQGLEWIGYINPSRGYTNY ADSVKGRFTI TTDKSTSTAY MELSSLRSED TATYYCARYYDDHYCLDYWG QGTTVTVSS	OKT3 ヒト化 VH
23	QVQLVQSGAE LKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGQCLEWMGYINPSRGYTNY NQKFKDKATL TADKSTSTAY MELRSLRSD TAVYYCARYYDDHYSLDYWG QGT LVTVSS	OKT3 ヒト化 VH
24	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTC SASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDTSKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSGTKLEIN	OKT3 ヒト化 VL
25	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSVS YMNWYQQKPG KAPKRWIYDTSKVASGVPAR FSGSGSGTDY SLTINSLEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGGGTKVEIK	OKT3 ヒト化 VL
26	DIQLTQSPSI LSASVGDRVT ITCRASSSVS YMNWYQQKPG KAPKRWIYDTSKVASGVPR FSGSGSGTEY TLTISSMQPE DFATYYCQQW SSNPFTFGCGTKVEIKRT	OKT3 ヒト化 VL
27	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSLYL QMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTV SA	抗CD3 Hv
28	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEP DHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDE AIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	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	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSS	抗CD3 VH1
36	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYL	抗CD3 VH2

10

20

30

40

#	配列	注釈
	QMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	
37	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH3
38	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH4
39	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH5
40	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH6
41	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMSWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH7
42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH8
43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH9
44	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH10
45	EVQLVESGGGLVQPKGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH11
46	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVKP	抗CD3 VH12
47	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVKP	抗CD3 VH13
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGCGTLVTVKP	抗CD3 VH14
49	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS	抗CD3 VH15

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
50	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYL QMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTV SS	抗CD3 VH16
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH17
52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH18
53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYL QMSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTV SS	抗CD3 VH19
54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH20
55	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH21
56	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYL QMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTV SS	抗CD3 VH22
57	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVS S	抗CD3 VH23
58	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQ MNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVS S	抗CD3 VH24
59	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQ MNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVS S	抗CD3 VH25
60	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVS S	抗CD3 VH26
61	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPG KCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVS S	抗CD3 VH27
62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTV S	抗CD3 VH28
63	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTVTV SS	抗CD3 VH29

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
64	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSFYFWGQGTTVTVS S	抗CD3 VH30
65	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFTNYAMNWVRQAP GKCLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQ MNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVTVS S	抗CD3 VH31
66	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK DHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDE AIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL1
67	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKP GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGCGTKLEIK	抗CD3 VL2
68	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKP GQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDE EADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL3
69	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDE SIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL4
70	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDE SIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL5
71	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDE SDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL6
72	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQEK GQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL7
73	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKP GQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTISGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL8
74	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKP GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGGGTKLEIK	抗CD3 VL9
75	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKP GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGCGTKLEIK	抗CD3 VL10
76	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKP GQCFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGEGTKLEIK	抗CD3 VL11
77	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK DHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDE AIYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗CD3 VL12
78	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKP GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWVFGGGTKLEIK	抗CD3 VL13
79	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKP GQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDE EADYYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗CD3 VL14
80	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQT GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDE SIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	抗CD3 VL15

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
81	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTP GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDE SIYFCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗CD3 VL16
82	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTP GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDE SDYYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗CD3 VL17
83	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKEP GQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDE AEYYCALWYSNLWVFGCGTKLTVL	抗CD3 VL18
84	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKP GQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGCGTKLTVL	抗CD3 VL19
85	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFSNYHMGWFRQAP GKERELVA AISGGSTYYTDSVKGRFTISRNNAKNTMSLQM SNLKPEDTG VYYCTTPTEKGSSIDYWGQGTQVTVSSGRYPYD VPDY	抗CD3 VHH
86	GRPFSSYAMG	5T4 CDR-H1
87	GRPFSSSAMG	5T4 CDR-H1
88	AVRWIGGATR	5T4 CDR-H2
89	AVSRNGGASQ	5T4 CDR-H2
90	AVSRNAGASQ	5T4 CDR-H2
91	AVSRNTGASQ	5T4 CDR-H2
92	AVSRQGGASQ	5T4 CDR-H2
93	AVSRGGGASQ	5T4 CDR-H2
94	AVSRNAGASY	5T4 CDR-H2
95	AVSRNGGSSY	5T4 CDR-H2
96	AVSRQGGSSY	5T4 CDR-H2
97	AVSRGGGSSY	5T4 CDR-H2
98	AVSRNAGSSY	5T4 CDR-H2
99	AVSRNTGSSY	5T4 CDR-H2
100	GQAWGTKFTDYS	5T4 CDR-H3
101	RSAAYSRSSEVYTGKDEYYY	5T4 CDR-H3
102	RSAAYSRSSEYTEKHDTY	5T4 CDR-H3
103	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLST	ノブFc
104	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLST	ホールFc
105	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLST	ノブFc

10

20

30

40

#	配列	注釈
106	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSP	ホール Fc
107	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	ノブ Fc
108	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	ホール Fc
109	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	ノブ Fc
110	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG	ホール Fc
111	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
112	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNR YTQKSLSLSP	ホール Fc
113	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNRYTQKSLSLSPG	ホール Fc
114	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT	ホール Fc

10

20

30

40

#	配列	注釈
	TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNR YTQKSLSLSPG	
115	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEA LHNHYTQKSLSLSPG	ノブ Fc
116	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHN HYTQKSLSLSPG	ノブ Fc
117	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEA LHNHYTQKSLSLSPG	ノブ Fc
118	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHN HYTQKSLSLSPG	ノブ Fc
119	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG	ホール Fc
120	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSPG	ホール Fc
121	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSPG	ホール Fc
122	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSPG	ホール Fc
123	(GGGGGS) _n , nは1~5である	リンカー
124	(GGGGGS) _n , nは1~4である	リンカー
125	GGGGGS	リンカー

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
126	GGGGGS	リンカー
127	GGGGGSGGGGSGGGGGS	リンカー
128	GGGGSGGGGSGGGGGS	リンカー
129	GGSGGGGSGGGGSGGGGGS	リンカー
130	GlyxXaa-Glyy-Xaa-Glyz Xaaは、独立して、A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、 H、D、またはEから選択される 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、独立して、A、V、L、I、M、F、W、P、G、S、T、C、Y、N、Q、K、R、 H、D、またはEから選択される	リンカー
132	(SSSSG)n n=1-9	リンカー
133	GGGGG-C-GGGGG	リンカー
134	(EAAAK)n n=2-20	リンカー
135	AS-(AP)n-GT n=2-20	リンカー
136	AS-(EAAAK)n-GT n=2-20	リンカー
137	(GGGGA)n n=2-20	リンカー
138	(PGGGS)n n=2-20	リンカー
139	(AGGGS)n n=2-20	リンカー
140	GG-(EGKSSGSGSESKST)n-GGS n=2-20	リンカー
141	SSSASASSA	リンカー
142	GSPGSPG	リンカー
143	ATTTGSSPGPT	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) X5 = I, V, T, S, または G (P1' = I, V, T, S, または G)	リンカーコンセンサス
146	LEAD	グラナザイム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

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
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は任意のアミノ酸である) 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	マトリブターゼ 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である) X4 = L, I または M (P1' = L, I または Mである)	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	TGRQARVGLLEADGSPAGLG	リンカー
168	TGSRQARVGPAGLEADGS	リンカー
169	TGPAGLGSRQARVGLLEADGS	リンカー
170	GPAGLGLEPDGSRQARVG	リンカー
171	GGSGGGGIEPDIGSGGS	リンカー
172	GGSGGGGLEADTGGSGGS	リンカー
173	GSIEPDIGS	リンカー
174	GSLEADTGS	リンカー
175	GGSGGGGIEPDGGSGGS	リンカー
176	GGSGGGGIEPDVGGSGGS	リンカー
177	GGSGGGGIEPDSGGSGGS	リンカー
178	GGSGGGGIEPDTGGSGGS	リンカー
179	GGGSLEPDGSGS	リンカー
180	GPAGLGLEADGSRQARVG	リンカー
181	GGEGGGGSGSGSGGS	リンカー
182	GSSAGSEAGSGQAGVGS	リンカー
183	GGSGGGGLEAEGSGGGGS	リンカー
184	GGSGGGGIEPDPGSGGS	リンカー
185	TGGSGGGGIEPDIGSGGS	リンカー
186	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGM FAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG AAALALTVDLPPASSEANSFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	41BBL

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
187	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPG KGLEWMGKIYPGDSYTNYSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGTLLTVSS	41BB VH
188	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSP VLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYY CATYTGFGSLAVFGGGTKLTVL	41BB VL
189	QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIQSP KGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSVT AADTAVYYCARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLTVSS	41BB VH
190	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA PRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYC QQRSNWPPALTFGGGTKEIK	41BB VL
191	QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFSGYYMHWVRQA PGQGLEWMGWNPMSGGNTYAQKFQGRVTITRDTASTAY MELSSLRSEDTAVYYCAREGMAMRLELDKWGQGTLLTVSS	41BB VH
192	SYELTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAP VLVIYYDSRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC QVWDSSSVVFGGGTQLTVL	41BB VL
193	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNIKL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYNVTGVTFFDDKKCTYAISTFV PGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFV QNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
194	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNIRL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYDVTMVKFDDKKCMYDIWTF VPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFV FQNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
195	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNIRL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTF VPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFV FQNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
196	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNIKL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYDVTAVAFDDKKCTYDIWTF VPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFV FQNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
197	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNI KLREDSKMMATYELKEDKSYDVTGVSFDDKKCTYAIMTF VPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFF KFVFQNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPE NHIVFPVPIDQCIDG	41BB Anticalin
198	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNI KLREDSKMMATYELKEDKSYDVTGVTFDDKKCRYDI STFVPGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVSTNYNQHAM VFFKFVFQNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLG LPENHIVFPVPIDQCIDG	41BB Anticalin
199	QDSTSDLPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKWWYVVGQAGNIRL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYDVTGVTFDDKKCTYAISTFV PGSQPGEFTLGKIKSFPGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFV QNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
200	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKQWYVVGQAGNIKL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYDVTGVTFFDDKKCTYAISTLV PGSQPGFTLFGKIKSFGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVF QNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
201	QDSTSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFHGKQWYVVGQAGNIRL REDKDPNKMMAIYELKEDKSYDVTGVTFFDDKKCNYAISTFV PGSQPGFTLFGKIKSFGHTSSLVRVSTNYNQHAMVFFKFVF QNREEFYITLYGRTKELTSELKENFIRFSKSLGLPENHIVFPVPI DQCIDG	41BB Anticalin
202	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 71～254
203	DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 85～254
204	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 80～254
205	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA AGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	ヒト41BBLの 52～254
206	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 71～248
207	DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 85～248
208	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 80～248
209	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA AGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVAAGVYVFFQLELRRVVA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL	ヒト41BBLの 52～248
210	EVQLLESQGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMGWYRQAPG KRREFVAAIESGRNTVYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSSL RAEDTAVYYCGLLKGNRVVSPSVAYWGQGTLLTVTKP	41BB sdAb
211	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNNSVI INCDGFYLISLKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL	OX40リガンド

10

20

30

40

#	配列	注釈
	MVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEF CVL	
212	QVSHRYPRFQ SIKVQFTEYK KEKGILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNLSLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LVNVTDDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEFCVL	OX40 リガンド
213	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGILTSQKEDEIMKVQNNSVI INCDGFYLISLKGYSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL MVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEF CVL	OX40 リガンド
214	QVSHRYPRIQ SIKVQFTEYK KEKGILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNLSLHYQ KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LVNVTDDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF CVL	OX40 リガンド
215	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGILTSQKEDEIMKVQNNSVII NCDGFYLISLKGYSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSL MVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEF CVL	OX40 リガンド
216	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDSYMSWVRQAP GQGLEWIGDMYPDNGDSSYNQKFRERVITRTDTSTAYLELS SLRSEDTAVYYCVLAPRWYFSVWGQGLTVTVSS	OX40 VH
217	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSRLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQGHTLPPTFGQGTKVEIKRT	OX40 VL
218	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFGSAMHWVRQASG KGLEWVGRIRSKANSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTAVYYCTSGIYDSSGYDYWGQGLTVTVSS	OX40 VH
219	DIVMTQSPSLPVPTEGEPASISCRSSQSLHSNGYNYLDWYLQ KPGQSPQLLIYLGNSRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCMQALQPLTFGGGTKVEIK	OX40 VL
220	EVQLLESQGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSDAFMYWVRQAPG KGLEWVSSISNRGLKTAYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LRAEDTAVYYCSRVDGDFRGQGLTVTVKP	OX40 sdAb
221	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQ NGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKI QNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFIS	GITR リガンド
222	QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVASISSGGTTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGGYYDSMDYWGQGLTVTVSS	GITR VH
223	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASEVDNYGVFSFMNWWYQQK PGQAPRLLIYAASNQGSIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQTKVETWTFGQGTKVEIK	GITR VL
224	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPP GKALEWLAHIWDDDKYYQPSLKSRLTISKDTSKNQVVTM TNMDPVDATATYYCARTRRYFPFAYWGQGLTVTVSS	GITR VH
225	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQNVGTNVAWYQQKPGQ APRLLIYSASYRYSIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYNTDPLTFGGGTKVEIK	GITR VL
226	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSGGYFWSWIRQPPG KGLEWIGYIYYSGTTYNPVSLKSRVTISIDTSKNQFSLKLSVT AADTAVYYCARDLFYYDTSGPRGFDPPWGQGLTVTVSS	GITR VH

10

20

30

40

#	配列	注釈
227	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTVSSNYLAWYQQKPGQ APRLLIYGSSTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYDSSPWTFGQGTKVEIK	GITR VL
228	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCLASGFTFSSYGMHWVRQAP GKGLEWVAWIWYPGSNKYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGGELGRYYYYGMDVWGQGTITVTVS S	GITR VH
229	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTCRASQGIRNDLGWYQQKPGK APKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY CLQHNNYPWTFGQGTKVDIK	GITR VL
230	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCLASGSVFSIDAMGWYRQAPG KQRELVAVLSSGSSAKYAASAPGRFTISRDNKNTVYLQMSL RAEDTAVYYCYADVSTGWGRDAHGYWGQGTITVTV	GITR sdAb
231	<u>MPEEGSGCSVRRRPYGCVLRAALVPLVAGLVICLVVCIQRFAQ</u> <u>AQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRS</u> <u>FLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIOVTLAICSSTASRHHPTTL</u> <u>AVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTG</u> <u>TLLPSRNTDETFFGVQWVRP</u>	UniProt 番号 P32970, CD70- ECD 残基 39- 193 (下線)
232	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCLASGFTFSSYDMHWVRQAP GKGLEWVAWIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGSGNWGFFDYWGQGTITVTVSS	CD70 VH
233	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISRWLAWYQQKPEKA PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYNTYPRTFGQGTKVEIK	CD70 VL
234	QVQLQQSGGGLVQPGGSLRLSCLASGSIFSINGMGWYRQAPG KERELVAGLTSGGSVTNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCRAEIFTTRTGENYYGMDYWGKGTQVTVKP	ICOS sdAb
235	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCLASGRMFSNYAMGWFRQAP GKEREFVAAINYRRDAADYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCGFTYAGWASSRRDDYNYWGQGTITVTVK P	CD28 sdAb
236	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGR DPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ゼータシグナ リングドメイン
237	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL	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	FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAA YRS	CD28 由来 共刺激 ドメイン3
241	KPTTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDF ASDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC	CD8由来 ヒンジおよび 膜貫通ドメイン
242	AKPTTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD FACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVIT	CD8由来 ヒンジおよび 膜貫通ドメイン

10

20

30

40

#	配列	注釈
243	KPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT	CD8 ヒンジおよび 膜貫通ドメイン
244	MPGGCSRGPAAAGDGRRLRLARLALVLLGWVSSSSPTSSASSFSS SAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECEAAARTVKCVNRNLTEVP TDLPAYVRNLFLTGNQLAVLPAGAFARRPPLAELAAALNLGSR LDEVRAFAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFAFSGSNASVSAPS PLVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALLAGRALQGLRRLE LASNHFLYLPRDVLALQPSLRHLDLSSNSLVSLTYVSFRNLTH LES LHLEDNALKVLHNGTLAELQGLPHIRVFLDNNPWVCDCH MADMVTWLKETEVVQKDRLTCAYPEKMRNRVLELNSAD LDCDPILPPSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLYLNRKGIKKWM HNIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNLSSNSDV	5T4
245	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQTPG KEREFVAAVRWIGGATRYTDSVKGRFSISKDNAINTVYLQMN SLKSEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYSWDWGQGTQVTVKP	L12E9
246	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KGRFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYSWDWGQGTLLVTVKP	hz12E9v1
247	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYSWDWGQGTLLVTVKP	hz12E9v2
248	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYSWDWGQGTLLVTVKP	hz12E9v3
249	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTISRDNANTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYSWDWGQGTLLVTVKP	hz12E9v4
250	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTISRDNANTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYSWDWGQGTLLVTVKP	hz12E9v5
251	EVQLVESGGGEVQAGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQTPG KEREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYSWDWGQGTLLVTVKP	hz12E9v6
252	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYTDSVKGRFSISKDNAKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYSWDWGQGTLLVTVKP	hz12E9v7
253	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMN SLKSEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYSWDWGQGTLLVTVKP	hz12E9v8
254	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSSKTMWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTISRDNANTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTKFTDYSWDWGQGTLLVTVKPGG	hz12E9v9
255	QVQLVQSGGGLVQAGDSLTLSCAVSERPFGTYAMGWFRQAP GRERDLVAASVRNGGASQYGDSVKGRFSISRDNKNTMYLQM NSLKPEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGTQ VTVKP	L14B5
256	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASRRPFSGTYAMGWFRQAPG KGRDLVSAVSRNGGASQYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGTLLV TVKP	hz14B5v1

10

20

30

40

#	配列	注釈
257	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNNGGASQYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v2
258	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNNGGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v3
259	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNNGGASQYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v4
260	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNAGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v5
261	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNTGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v6
262	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRQGGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v7
263	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRGGGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v8
264	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNNGGASQYGDVSKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v9
265	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNNGGASQYGESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v10
266	EVQLVESGGGEVQAGDSLTLSCAVSERPFQTYAMGWFRQAP GRERDLVAAVSRNAGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQ MSSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v11
267	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAAVSRNAGASQYGESVKGRFSISRDNKNTMYLQMS SLKPEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v12
268	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNAGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v13
269	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KEREFVAAVSRNAGASQYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v14

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
270	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAASVRNAGASYAESVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v15
271	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAASVRNAGASQYGEFVKGRFTISRDNKNTMYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v16
272	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFQTYAMGWFRQAPG KERDLVAASVRNAGASYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v17
273	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASERPFSSYAMGWFRQAPG KERDLVAASVRNAGASYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v18
274	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFQTYAMGWFRQAP GKERDLVAASVRNAGASYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQ MSSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v19
275	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSYAMGWFRQAPG KERDLVAASVRNAGASYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQM SSLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEVYTGKDEYYYWGQGT LTVKP	hz14B5v20
276	QVQLLQSGGGLVQAGGSLILSCAVSGRPFSSAMGWFRQAPG KERETVAASVRNGGSSYYADFKGRFTISRDNKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGTQ LTVKP	L16G10
277	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSAMGWFRQAPG KGRVTSASVRNGGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGT LTVKP	hz16G10v1
278	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSAMGWFRQAPG KERETVAASVRNGGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGT LTVKP	hz16G10v2
279	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSAMGWFRQAPG KERETVAASVRNGGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGT LTVKP	hz16G10v3
280	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSAMGWFRQAPG KERETVAASVRNGGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGT LTVKP	hz16G10v4
281	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSAMGWFRQAPG KERETVAASVRNGGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGT LTVKP	hz16G10v5
282	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSAMGWFRQAPG KERETVAASVRNAGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEYTEKHDTYWGQGT LTVKP	hz16G10v6

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
283	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNTGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEITYTEKHDTYWGQGLV TVKP	hz16G10v7
284	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNGGSSYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEITYTEKHDTYWGQGLV TVKP	hz16G10v8
285	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNGGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEITYTEKHDTYWGQGLV TVKP	hz16G10v9
286	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSSAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNAGSSYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEITYTEKHDTYWGQGLV TVKP	hz16G10v10
287	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSYAMGWFRQAPG KERETVAAVSRNAGSSYYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARSAAYSRSSEITYTEKHDTYWGQGLV TVKP	hz16G10v11
288	RRPFSSKTMA	5T4CDR-H1
289	GRPFSSKTMA	5T4 CDR-H1
290	ERPFGTYAMG	5T4 CDR-H1
291	ERPFSYAMG	5T4 CDR-H1
292	GRPFGTYAMG	5T4 CDR-H1
293	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPK GQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWFVGCGLKLTVL	抗CD3 VL (CON)
294	QVQLVQSGGGLVQAGASRLSCVASGRTRSLRTMAWFRQAP GKERIFVAAISWRSDSTYYADSVKGRFTISRDNKNTAYLQM NTLKPEDTAVYYCAAGGWLATTPDEITYWGQGLVTVKP	7E1
295	QVQLQESGGGLMQAGDSLRLSCVVSQVTWNSYTMWFRQA PGKEREFVAAIRWTVDTTYYADSVKGRFTISRDIYAKKTMYLQ MNNLKPEDAAYYYCAVGRKWPKADDYWGQGLVTVKP	14F4
296	GRTRSLRTMA	5T4 CDR-H1
297	GVTWNSYTM	5T4 CDR-H1
298	AISWRSDSTY	5T4 CDR-H2
299	AIRWTVDTTY	5T4 CDR-H2
300	GGGWLATTPDEITY	5T4 CDR-H3
301	GRKWPKADDY	5T4 CDR-H3
302	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASRRPFSSKTMAWFRQTPG KEREFVAAVRWIGGATRYTDSVKGRFSISKDNAINTVYLQTN LKSEDTAVYYCAAGQWGTGKFTDYSWQGLVTVKP	4D3
303	GQWGTGKFTDYS	5T4 CDR-H3
304	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKGRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v1
305	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v2

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
306	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v3
307	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v4
308	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v5
309	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v6
310	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v7
311	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v8
312	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v9
313	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v10
314	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v11
315	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v12
316	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRELVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v13
317	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSVTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMQSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v14
318	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLMQSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v15
319	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v16
320	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSITGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLMQNSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLVTVKPGG	hz18H10v17
321	GSMTGANTMG	CDR1
322	GSVTGANTMG	CDR1
323	GSITGANTMG	CDR1
324	LIGNYVTH	CDR2
325	YTDNLGTS	CDR3

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
326	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYHYADSVKGRFTISRENAKNTVILQMNSLN PEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVTKPGG	18H10
327	PGGGG	リンカー
328	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHA LHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc
329	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHA LHNHYTQKSLSLSP	ホール Fc
330	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSP	ノブ Fc
331	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVC TLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLSP	ホール Fc
332	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEAL HNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
333	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNR YTQKSLSLSP	ホール Fc
334	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVTV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEA LHNHYTQKSLSLSP	ノブ Fc
335	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHN HYTQKSLSLSP	ノブ Fc

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
336	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEAL HNRYTQKSLSLSP	ホール Fc
337	DKTHTCPPCPAPGPGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVTVV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVVHEALHNR YTQKSLSLSP	ホール Fc
338	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV VKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEEYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCDVSGFYPSDIAVEWESDGPENNY KTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWEQGVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	Fc-Het-1
339	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV VKHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN YKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	Fc-Het-2
340	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPK GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWFVFGGKTLTVL	抗CD3 VL21
341	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPG KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTS S	抗CD3 VH32
342	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWVQKPK GKSPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDE ADYYCALWYSNHWFVGGGKTLTVL	抗CD3 VL20
343	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPG KCLEWVARIRSKYNNYATYYADTVKGRFTISRDDAKNTLYLQ MSSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTV	抗CD3 VH34
344	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP	IgG1 ノブ
345	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMRSRTPEVTCVTVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP	IgG1 ノブ
346	GGGGSGGGSGGGGS	リンカー
347	GFSFSINAMG	41BB CDR1
348	AIESGRNTV	41BB CDR2
349	LKGNRVVSPSVAY	41BB CDR3

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
350	GFTFNTYAMN	抗CD3 VH CDR1
351	RIRSKYNNYATY	抗CD3 VH CDR2
352	HGNFGDSYVSWFAY	抗CD3 VH CDR3
353	ALWYSNHWV	抗CD3 VL CDR3
354	VLWYSNRWV	抗CD3 VL CDR3
355	GFTFSTYAMN	抗CD3 VH CDR1
356	RIRSKYNNYATY	抗CD3 VH CDR2
357	GSSTGAVTTSNYAN	抗CD3 VL CDR1
358	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG KCLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGLTVTVS S	抗CD3 VH33
359	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFSFSINAMGWYRQAPG KRREFVAAIESGRNTVYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSSL RAEDTAVYYCGLLKGNRVVSPSVAYWGQGLTVTVKP	41BB sdAb
360	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGRPFSSKTMAWFRQAPG KEREFVAAVRWIGGATRYTESVKGRFTISRDNANTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAAGQAWGTFKFTDYSWGWQGLTVTVKP	hz12E9v09
361	IEPDP	リンカー
362	SSPTSSASSFSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECSEAARTVK CVNRNLTEVPTDLPAYVRNLF LTGNQLAVLPAGAFARRPPLA ELAALNLSGSRLEVRAGAFEHLPSLRQLDL SHNPLADLSPFA FSGSNASVSAPSLVELILNHIVPPEDERQNRSEFGMVVAALLA GRALQGLRRLELASNHFLYLP RDVLAQLPSLRHLDLSNNSLV LTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLAELQGLPHIRVFL DNNPWVCDCHMADMVTWLKETEVVQGDRLTCAYPEKMR NRVLELNSADLDCDPIPPSLQTS	5T4 ECD、ヒト5T4 のアミノ酸 32～355 (UniProt 番号 Q13641)
363	GGG(GGS) _n , nは0～10である	リンカー
364	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYHYADSVKGRFTISRDNANTVILQMNSLN PEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTVKP	18H10
365	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKGRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTVKP	hz18H10v1
366	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTVKP	hz18H10v2
367	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTVKP	hz18H10v3
368	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGLTVTVKP	hz18H10v4

10

20

30

40

50

#	配列	注釈
369	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v5
370	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v6
371	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v7
372	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v8
373	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v9
374	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v10
375	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVSLIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v11
376	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v12
377	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRELVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v13
378	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAP GKQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSS LRAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v14
379	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v15
380	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v16
381	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGSMGTGANTMGWYRQAPG KQRDLVALIGNYVTHYAESVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSL RAEDTAVYYCYLYTDNLGTSWGQGTLLTVKP	hz18H10v17
382	SSPTSSASSFSSAPFLASAVSAQPPLPDQCPALCECSEAARTVK CVNRNLTEVPTDLPAVVRNLFLLTGNQLAVLPAGAFARRPPLA ELAALNLGSRDLDEVRAFAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFA FSGSNASVSAPSPLVELLNHIVPPEDERQNRSEFEGMVVAALLA GRALQGLRRLELASNHFLYLPDVLALPSLRHLDSLNNLSLVS LTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNGTLAELQGLPHIRVFL DNNPWVCDCHMADMVTWLKETEVVQGKDRLTCAYPEKMR NRVLELNSADLDCDPLPPSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLY LNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNLSS NSDV	ヒト5T4 構築物
383	SAPSSSVSSSTSPAFLASGSAQPPPAERCPAAECSEAARTV KCVNRNLLEVPADLPPYVRNLFLLTGNQMTVLPAGAFARQPPL ADLEALNLSGNHLKEVCAGAFEHPLGLRRDLDSHNPLTNLSAF	マウス5T4 構築物

10

20

30

40

#	配列	注釈
	AFAGSNASVSAPSPLEELILNHIVPPEDQRQNGSFEGMVAFEG MVAAALRSGALRGLTRLELASNHFLFLPRDLLAQLPSLRYLD LRNNSLVSLTYASFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNSTLAEW GLAHVKVFLDNNPWVCDYMACMVAWLKETEVVPDKARLT CAFPEKMRNRGLLDLNSDLDCDAVLPQSLQTSYVFLGIVLAL IGAIFLLVLYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINA DPRLTNLSSNSDV	
384	<u>SSPTSSASSFSSAPFLASAVSAQPPLPDOCPALCECSEAARTVK</u> <u>CVNRNLTEVPTDLPA</u> YVRNLFLTGNQLAVLPAGAFARRPPLA <u>ELAALNLSGSRLEVRAGAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFA</u> <u>FSGSNASVSAPSPVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALLS</u> GLALRGLTRLELASNHFLFLPRDLLAQLPSLRYLDLRNNSLV LTYASFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNSTLAEWGHLAHVKV LDNNPWVCDYMACMVAWLKETEVVPDKARLTCAFPEKMR NRGLLDLNSDLDCDAVLPQSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLV LYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNLS SNSDV	hmc5T4.1 (下線は ヒト残基)
385	SAPSSSVSSSTSPAFLASGSAQPPPAERCPAAECSEAARTV KCVNRNLLEVPADLPPYVRNLFLTGNQMTVLPAGAFARQPPL ADLEALNLSGNHLKEVCAGAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLSPF <u>AFSGSNASVSAPSPVELILNHIVPPEDERQNRSFEGMVVAALL</u> <u>AGRALQGLRRLELASNHFLYLPDVL AQLPSLRHLDLSNNSLV</u> <u>SLTYVSFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNSTLAEWGHLAHVKV</u> FLDNNPWVCDYMACMVAWLKETEVVPDKARLTCAFPEKM RNRGLLDLNSDLDCDAVLPQSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLV LYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINADPRLTNL SNSDV	hmc5T4.2 (下線は ヒト残基)
386	<u>SSPTSSASSFSSAPFLASAVSAQPPLPDOCPALCECSEAARTVK</u> <u>CVNRNLTEVPTDLPA</u> YVRNLFLTGNQMTVLPAGAFARQPPLA DLEALNLSGNHLKEVCAGAFEHLPLGLRRDLDSHNPLTNLSAFA FAGSNASVSAPSPLEELILNHIVPPEDQRQNGSFEGMVAFEGM VAAALRSGALRGLTRLELASNHFLFLPRDLLAQLPSLRYLDL RNNLSLVSLTYASFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNSTLAEWG LAHVKVFLDNNPWVCDYMACMVAWLKETEVVPDKARLT AFPEKMRNRGLLDLNSDLDCDAVLPQSLQTSYVFLGIVLALI GAIFLLVLYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINA DPRLTNLSSNSDV	hmc5T4.3 (下線は ヒト残基)
387	SAPSSSVSSSTSPAFLASGSAQPPPAERCPAAECSEAARTV KCVNRNLLEVPADLPPYVRNLFLTGNQMTVLPAGAFARQPPL ADLEALNLSGNHLKEVCAGAFEHLPLGLRRDLDSHNPLTNLSAF AFAGSNASVSAPSPLEELILNHIVPPEDQRQNGSFEGMVAFEG MVAAALRSGALRGLTRLELASNHFLFLPRDLLAQLPSLRYLD LRNNSLVSLTYASFRNLTHLESLHLEDNALKVLHNSTLAEW GLAHVKVFLDNNPWVCDYMACMVTWLKETEVVQGDRLT <u>CAYPEKMRNRVLELNSADLDCDILPPSLQTSYVFLGIVLALI</u> <u>GAIFLLVLYLNRKGIKKWMHNIRDACRDHMEGYHYRYEINA</u> DPRLTNLSSNSDV	hmc5T4.4 (下線は ヒト残基)
388	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAP GKGLEWVSGISWNSGSGYADSVKGFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH 312557
389	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAP GKCLEWVSGISWNSGSGYADSVKGFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSS	抗CD3 VH 312557 G44C

10

20

30

40

#	配列	注釈
390	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQYNNWPWTFGCGTKVEIK	抗CD3 VL 312557
391	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQA PRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC QQYNNWPWTFGCGTKVEIK	抗CD3 VL 312557 Q100C
392	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYSMHWRQAP GKGLEWVSGISWNSGSKDYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQM NSLRAEDTALYYCAKYGSGYGKIFYHYGLDVWGQGTTVTVSS	CD3-VH-G
393	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYSMHWRQAP GKCLEWVSGISWNSGSKDYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQM NSLRAEDTALYYCAKYGSGYGKIFYHYGLDVWGQGTTVTVSS	CD3-VH-G
394	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYSTPPITFGCGTRLEIK	V _{K1} -39Jk5
395	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYSTPPITFGCGTRLEIK	V _{K1} -39Jk5 Q100C
396	(ADAAP)n n=2-20	リンカー
397	(ADAAP)n-G n=2-20	リンカー
398	(GEPQG)n n=2-20	リンカー
399	(GEPQG)n-G n=2-20	リンカー
400	(AGGEP)n n=2-20	リンカー
401	(AGGEP)n-G n=2-20	リンカー
402	(AGSEP)n n=2-20	リンカー
403	(AGSEP)n-G n=2-20	リンカー
404	(GGGEQ)n n=2-20	リンカー
405	(GGGEQ)n-G n=2-20	リンカー
406	ADAAPADAAPG	リンカー
407	GEPQGGEPQGG	リンカー
408	AGGEPAGGEPG	リンカー
409	AGSEPAGSEPG	リンカー
410	GGGEQGGGEQG	リンカー
411	AYVRNLFITGNQLAVLPAGAFARRPPLAELAAALNLSGSRLE VRAGAFEHLPS	ヒト5T4 ECDの アミノ酸60～112
412	LAGRALQGLRRLELASNHFLYLPDVLALPLSLRHLDSLNNSL VSLTYVSFR	ヒト5T4 ECDの アミノ酸173～224

10

20

30

40

【 手 続 補 正 2 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 配 列 表

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 配 列 表 】

2022504802000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/055454

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61P35/00 A61K47/68 C07K16/30 C07K14/725 C07K16/28
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61P A61K C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 108 084 265 A (UNIV FUDAN) 29 May 2018 (2018-05-29)	1,4, 34-36, 199, 205-209, 211-213, 221-229
Y	paragraph [0014] - paragraph [0024] paragraph [0033] paragraph [0038] paragraph [0051] paragraph [0032] ----- -/--	2,3, 10-13, 17-33, 37-198, 200-204, 210, 214-220

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 January 2020

Date of mailing of the international search report

03/02/2020

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2019/055454

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/041687 A1 (AMGEN RES MUNICH GMBH [DE]; KUFER PETER [DE]) 28 March 2013 (2013-03-28)	1,4-9, 14-16, 199, 205-209, 211-213, 221-229
Y	paragraph [0008] paragraph [0013] paragraph [0038] paragraph [0122] - paragraph [0123] page 44 - page 45; table 2 paragraph [0150] - paragraph [0151]; examples 9, 10 claims 1, 2, 4, 6	2,3, 10-13, 17-198, 200-204, 210, 214-220
X	WO 2016/097408 A1 (BIOTECNOL LTD [GB]) 23 June 2016 (2016-06-23)	1,4-9, 14-16, 199, 205-209, 211-213, 221-229
Y	page 3, line 12 page 7, lines 15-20 page 8, line 33 - page 9, line 1 page 67; example 8	2,3, 10-13, 17-198, 200-204, 210, 214-220
Y	WO 2016/034666 A1 (CELLECTIS [FR]) 10 March 2016 (2016-03-10)	2,3, 10-13, 17-198, 200-204, 210, 214-220
	page 11, lines 28-30 page 12, lines 18-25 figure 1	
X	WO 2017/182672 A1 (ALLIGATOR BIOSCIENCE AB [SE]) 26 October 2017 (2017-10-26)	1,4,199, 205-209, 211-213, 221-229
Y	page 5, lines 30-32 page 7, lines 10-28 page 11, lines 5-6 claim 5 page 8, line 21 - line 30 page 11, line 17 - page 13, line 17 example 1	2,3, 10-13, 17-198, 200-204, 210, 214-220

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/055454

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/167486 A1 (OXFORD BIOMEDICA LTD [GB]) 20 September 2018 (2018-09-20)	1,4,199, 205-209, 211-213, 221-229
Y	page 19, line 12 - page 24, line 17 page 44, line 5 - page 49, line 18	2,3, 10-13, 17-198, 200-204, 210, 214-220
X,P	----- WO 2018/191438 A1 (INHIBRX INC [US]) 18 October 2018 (2018-10-18) paragraph [0019] paragraph [0119] figure 7 paragraph [0127] figure 15 paragraph [0136] figure 24 paragraph [0144]; figure 32 paragraph [0370] figure 23	1-229
Y	----- WO 2016/086189 A2 (XENCOR INC [US]) 2 June 2016 (2016-06-02) figure 1A claims 1-72	2,3, 10-13, 17-198, 200-204, 210, 214-220
Y	----- WO 2013/101909 A1 (DEV CENTER BIOTECHNOLOGY; DCB USA LLC [US]) 4 July 2013 (2013-07-04) figures 1A, 1B claims 1-12	2,3, 10-13, 17-198, 200-204, 210, 214-220
Y	----- WO 2016/105450 A2 (XENCOR INC [US]) 30 June 2016 (2016-06-30) figure 1A claims 1-102 figure 3A figure 6 ----- -/--	2,3, 10-13, 17-198, 200-204, 210, 214-220

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/055454

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	G. HERNANDEZ-HOYOS ET AL: "MOR209/ES414, a Novel Bispecific Antibody Targeting PSMA for the Treatment of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 15, no. 9, 12 July 2016 (2016-07-12), pages 2155-2165, XP055483056, US ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0242 figure 1A page 2156, right-hand column, paragraph 1 page 2162 - page 2163 -----	2,3, 10-13, 17-198, 200-204, 210, 214-220
Y	WO 2016/055593 A1 (ENGMAB AG [CH]) 14 April 2016 (2016-04-14) the whole document claims 1-39 page 34, lines 14-18 claim 7 -----	2,3, 10-13, 17-198, 200-204, 210, 214-220

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/055454

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN 108084265	A	29-05-2018	NONE
W0 2013041687	A1	28-03-2013	AU 2012311492 A1 06-03-2014 CA 2846432 A1 28-03-2013 EP 2758438 A1 30-07-2014 JP 2014533929 A 18-12-2014 W0 2013041687 A1 28-03-2013
W0 2016097408	A1	23-06-2016	AU 2015366166 A1 29-06-2017 BR 112017012910 A2 06-02-2018 CA 2970986 A1 23-06-2016 CN 107406509 A 28-11-2017 EP 3233917 A1 25-10-2017 GB 2549632 A 25-10-2017 JP 2018500025 A 11-01-2018 KR 20170094319 A 17-08-2017 US 2017342160 A1 30-11-2017 W0 2016097408 A1 23-06-2016
W0 2016034666	A1	10-03-2016	AU 2015310897 A1 16-03-2017 CA 2959694 A1 10-03-2016 EP 3189073 A1 12-07-2017 JP 2017527289 A 21-09-2017 US 2017275374 A1 28-09-2017 W0 2016034666 A1 10-03-2016
W0 2017182672	A1	26-10-2017	AU 2017252233 A1 15-11-2018 BR 112018071612 A2 19-02-2019 CA 3021618 A1 26-10-2017 CN 109195994 A 11-01-2019 EP 3445788 A1 27-02-2019 JP 2019523630 A 29-08-2019 KR 20180135454 A 20-12-2018 US 2019169308 A1 06-06-2019 W0 2017182672 A1 26-10-2017
W0 2018167486	A1	20-09-2018	AU 2018235130 A1 29-08-2019 CA 3056542 A1 20-09-2018 CN 110678197 A 10-01-2020 EP 3595705 A1 22-01-2020 KR 20190129861 A 20-11-2019 US 2020010560 A1 09-01-2020 W0 2018167486 A1 20-09-2018
W0 2018191438	A1	18-10-2018	AU 2018250641 A1 31-10-2019 CA 3058477 A1 18-10-2018 SG 11201909160W A 30-10-2019 TW 201843177 A 16-12-2018 US 2019010242 A1 10-01-2019 W0 2018191438 A1 18-10-2018
W0 2016086189	A2	02-06-2016	AU 2015353409 A1 15-06-2017 AU 2017216517 A1 31-08-2017 AU 2019201923 A1 11-04-2019 BR 112017011092 A2 26-12-2017 CA 2967426 A1 02-06-2016 CL 2017001328 A1 23-03-2018 CN 107207610 A 26-09-2017

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/055454

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		EA 201791139 A1	30-04-2018	
		EP 3223845 A2	04-10-2017	
		GT 201700112 A	27-11-2018	
		JP 2017536829 A	14-12-2017	
		KR 20170084326 A	19-07-2017	
		PE 20171324 A1	11-09-2017	
		PH 12017500968 A1	20-11-2017	
		SG 11201704283P A	29-06-2017	
		TN 2017000223 A1	19-10-2018	
		US 2016229924 A1	11-08-2016	
		US 2017081420 A1	23-03-2017	
		US 2018282432 A1	04-10-2018	
		WO 2016086189 A2	02-06-2016	

WO 2013101909	A1	04-07-2013	AU 2012362378 A1	31-07-2014
			CA 2861816 A1	04-07-2013
			CN 104185642 A	03-12-2014
			EP 2797958 A1	05-11-2014
			HK 1202560 A1	02-10-2015
			JP 6114902 B2	19-04-2017
			JP 2015508400 A	19-03-2015
			JP 2017048196 A	09-03-2017
			KR 20140112515 A	23-09-2014
			KR 20160145847 A	20-12-2016
			TW 201336866 A	16-09-2013
			US 2013165638 A1	27-06-2013
			WO 2013101909 A1	04-07-2013

WO 2016105450	A2	30-06-2016	EP 3237449 A2	01-11-2017
			US 2016355600 A1	08-12-2016
			US 2019352416 A1	21-11-2019
			WO 2016105450 A2	30-06-2016

WO 2016055593	A1	14-04-2016	AU 2015329966 A1	27-04-2017
			CA 2963696 A1	14-04-2016
			EP 3204416 A1	16-08-2017
			JP 2017536341 A	07-12-2017
			US 2017306044 A1	26-10-2017
			WO 2016055593 A1	14-04-2016

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/02 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 47/62 (2017.01)
 A 6 1 K 38/19 (2006.01)
 A 6 1 K 38/21 (2006.01)
 A 6 1 K 35/17 (2015.01)
 A 6 1 P 37/04 (2006.01)

C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/02
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 47/62
 A 6 1 K 38/19
 A 6 1 K 38/21
 A 6 1 K 35/17
 A 6 1 P 37/04

C
 N
 D
 Z

4 C 0 8 7
 4 H 0 4 5

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

(74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
 (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74)代理人 100205707
 弁理士 小寺 秀紀
 (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ティマー ジョーン シー .
 アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ 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 インヒブルクス インコーポレイテッド内
 (72)発明者 カプラン マイケル ディー .
 アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ 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 インヒブルクス インコーポレイテッド内
 (72)発明者 ウィリス ケイトリン エム .
 アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ 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 インヒブルクス インコーポレイテッド内
 (72)発明者 パンディット ラジェイ エー .
 アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ 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 インヒブルクス インコーポレイテッド内
 (72)発明者 サナブリア アンジェリカ エヌ .
 アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ 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 インヒブルクス インコーポレイテッド内
 (72)発明者 バーンズ シドニー エー .
 アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ 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

- (72)発明者 ヘア マーガレット イー .
 アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ 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 インヒブルクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 エッケルマン ブレンダン ピー .
 アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ 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 インヒブルクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ジャクソン ルトガー エイチ .
 アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラホヤ 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 インヒブルクス インコーポレイテッド内
- F ターム (参考) 4B064 AG26 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA25
 CA44
 4C076 AA95 BB11 CC27 CC41 EE41 EE59 FF70
 4C084 AA02 AA07 BA44 ZB091 ZB092 ZB261 ZB262
 4C085 AA13 AA14 BB01 BB41 BB42 EE01
 4C087 AA01 AA02 AA04 BB37 ZB09 ZB26
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 CA40 DA75 EA20 FA74

【要約の続き】

FIG. 3A

