

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-534096

(P2021-534096A)

(43) 公表日 令和3年12月9日 (2021. 12. 9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 5
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 132 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2021-506582 (P2021-506582)	(71) 出願人	519288755
(86) (22) 出願日	令和1年8月8日 (2019. 8. 8)		ドラゴンフライ セラピューティクス、
(85) 翻訳文提出日	令和3年4月2日 (2021. 4. 2)		インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/045723		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(87) 国際公開番号	W02020/033702		4 5 1, ウォルサム, ゲートハウス
(87) 国際公開日	令和2年2月13日 (2020. 2. 13)		ドライブ 3 5
(31) 優先権主張番号	62/716, 109	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成30年8月8日 (2018. 8. 8)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国・地域又は機関		(74) 代理人	100113413
	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	62/716, 113	(74) 代理人	100181674
(32) 優先日	平成30年8月8日 (2018. 8. 8)		弁理士 飯田 貴敏
(33) 優先権主張国・地域又は機関		(74) 代理人	100181641
	米国 (US)		弁理士 石川 大輔

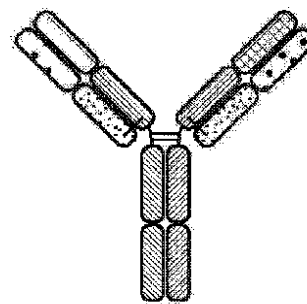
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NK G 2 D、C D 1 6 および腫瘍関連抗原に結合するタンパク質

(57) 【要約】

NK G 2 D 受容体、C D 1 6 および腫瘍関連抗原 (例えば、B 7 - H 3、L 1 C A M、F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R (H H F 5)、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1 または S L C 1 A 5) に結合する多重特異性結合タンパク質、ならびにがんの処置に有用な医薬組成物および治療方法が記載される。ある特定の実施形態では、本発明は、例えば、がん細胞上の B 7 - H 3、ならびにナチュラルキラー細胞上の NK G 2 D 受容体および C D 1 6 受容体に結合して、ナチュラルキラー細胞を活性化するタンパク質 (例えば、多重特異性結合タンパク質) を提供する。

FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) N K G 2 D に結合する F a b 断片を含む第 1 の抗原結合部位と；

(b) B 7 - H 3 に結合する一本鎖可変領域断片 (s c F v) を含む第 2 の抗原結合部位と；

(c) C D 1 6 に結合するのに十分な抗体 F c ドメインもしくはその部分、または C D 1 6 に結合する第 3 の抗原結合部位とを含むタンパク質。

【請求項 2】

前記 s c F v が、A l a - S e r または G l y - A l a - S e r を含むヒンジを介して、C D 1 6 に結合するのに十分な前記抗体 F c ドメインもしくはその部分、または C D 1 6 に結合する前記第 3 の抗原結合部位に連結しており、前記 s c F v が重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】

前記 s c F v が前記抗体 F c ドメインに連結している、請求項 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

前記 s c F v の前記重鎖可変ドメインが、前記 s c F v の前記軽鎖可変ドメインとジスルフィド架橋を形成する、請求項 2 または 3 に記載のタンパク質。

【請求項 5】

前記ジスルフィド架橋が前記重鎖可変ドメインの C 4 4 と前記軽鎖可変ドメインの C 1 0 0 との間に形成される、請求項 4 に記載のタンパク質。

【請求項 6】

前記 s c F v が前記抗体 F c ドメインに連結しており、前記 s c F v の前記軽鎖可変ドメインが、前記 s c F v の前記重鎖可変ドメインの N 末端に位置し、フレキシブルリンカー (G l y G l y G l y G l y S e r) ₄ ((G 4 S) ₄) (配列番号 1 2 6) を介して、前記 s c F v の前記重鎖可変ドメインに連結しており、前記 F a b が前記抗体 F c ドメインに連結している、請求項 5 に記載のタンパク質。

【請求項 7】

前記 s c F v の前記重鎖可変ドメインが、フレキシブルリンカーを介して、前記 s c F v の前記軽鎖可変ドメインに連結している、請求項 2 から 6 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 8】

前記フレキシブルリンカーが (G l y G l y G l y G l y S e r) ₄ ((G 4 S) ₄) (配列番号 1 2 6) を含む、請求項 7 に記載のタンパク質。

【請求項 9】

前記 s c F v の前記重鎖可変ドメインが前記 s c F v の前記軽鎖可変ドメインの N 末端または C 末端に位置する、請求項 2 から 8 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 10】

前記 s c F v の前記軽鎖可変ドメインが前記 s c F v の前記重鎖可変ドメインの N 末端に位置する、請求項 9 に記載のタンパク質。

【請求項 11】

前記 F a b 断片が、C D 1 6 に結合するのに十分な前記抗体 F c ドメインもしくはその部分、または C D 1 6 に結合する前記第 3 の抗原結合部位に連結している、請求項 1 から 1 0 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 12】

前記 F a b 断片の重鎖部分が重鎖可変ドメインおよび C H 1 ドメインを含み、前記重鎖可変ドメインが前記 C H 1 ドメインに連結している、請求項 1 1 に記載のタンパク質。

【請求項 13】

前記 F a b が前記抗体 F c ドメインに連結している、請求項 1 1 または 1 2 に記載のタンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

(a) NKG2D に結合する第 1 の抗原結合部位と；
(b) 腫瘍関連抗原 B7-H3 に結合する第 2 の抗原結合部位と；
(c) CD16 に結合するのに十分な抗体 Fc ドメインもしくはその部分、または CD16 に結合する第 3 の抗原結合部位とを含むタンパク質。

【請求項 15】

NKG2D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、

- (1) それぞれ、配列番号 347、88 および 352 のアミノ酸配列によって表される相補性決定領域 1 (CDR1)、相補性決定領域 2 (CDR2) および相補性決定領域 3 (CDR3) 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む軽鎖可変ドメイン； 10
- (2) それぞれ、配列番号 347、88 および 348 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む軽鎖可変ドメイン；
- (3) それぞれ、配列番号 341、64 および 342 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 66、67 および 68 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む軽鎖可変ドメイン； 20
- (4) それぞれ、配列番号 343、72 および 344 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 74、75 および 76 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む軽鎖可変ドメイン；
- (5) それぞれ、配列番号 345、80 および 346 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 82、83 および 84 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む軽鎖可変ドメイン；
- (6) それぞれ、配列番号 87、88 および 89 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む軽鎖可変ドメイン； 30
- (7) それぞれ、配列番号 349、96 および 350 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 98、99 および 100 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む軽鎖可変ドメイン；
- (8) それぞれ、配列番号 347、88 および 355 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む軽鎖可変ドメイン； 40
- (9) それぞれ、配列番号 347、88 および 358 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む軽鎖可変ドメイン；
- (10) それぞれ、配列番号 347、88 および 361 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される CDR1、CDR2 および CDR3 配列を含む軽鎖可変ドメイン；
- (11) それぞれ、配列番号 347、88 および 364 のアミノ酸配列によって表され 50

る C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(12) それぞれ、配列番号 347、88 および 367 のアミノ酸配列によって表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖可変ドメイン；または

(13) それぞれ、配列番号 87、88 および 354 のアミノ酸配列によって表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖可変ドメイン

を含む、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 16】

N K G 2 D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、

(1) 配列番号 351 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン および配列番号 86 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(2) 配列番号 85 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン および配列番号 86 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(3) 配列番号 77 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン および配列番号 78 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(4) 配列番号 69 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン および配列番号 70 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(5) 配列番号 61 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン および配列番号 62 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(6) 配列番号 93 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン および配列番号 94 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(7) 配列番号 353 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン および配列番号 86 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(8) 配列番号 356 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン および配列番号 86 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(9) 配列番号 359 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン および配列番号 86 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(10) 配列番号 362 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン および配列番号 86 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；
または

(11) 配列番号 365 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン および配列番号 86 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン
を含む、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 17】

B 7-H 3 に結合する前記第 2 の抗原結合部位が、重鎖 C D R 1 (C D R H 1)、重鎖 C D R 2 (C D R H 2) および重鎖 C D R 3 (C D R H 3) を含む重鎖可変ドメイン、ならびに軽鎖 C D R 1 (C D R L 1)、軽鎖 C D R 2 (C D R L 2) および軽鎖 C D R 3 (C D R L 3) を含む軽鎖可変ドメインを含み、C D R H 1、C D R H 2、C D R H 3、C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 のアミノ酸配列が、それぞれ、配列番号 110、111、112、114、115 および 116；118、119、120、122、123 および 124；371、372、373、374、375 および 376；または 379、380、381、382、383 および 384 に示される、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 18】

B 7-H 3 に結合する前記第 2 の抗原結合部位が、

(a) 配列番号 109 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
および配列番号 113 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(b) 配列番号 117 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
および配列番号 121 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(c) 配列番号 369 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
および配列番号 370 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(d) 配列番号 377 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
および配列番号 378 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(e) 配列番号 386 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
および配列番号 387 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(f) 配列番号 388 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
および配列番号 389 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン；
または

(g) 配列番号 390 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン
および配列番号 391 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン
を含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 19】

配列番号 329、330、333、334、335 および 336 から選択される配列を
含む、請求項 1 から 13 または 15 から 18 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 20】

配列番号 330、配列番号 334 および配列番号 336 から選択される配列によって表
される、抗体 Fc ドメインに連結した scFv を含む、請求項 1 から 13 のいずれか一項
に記載のタンパク質。

【請求項 21】

配列番号 329、配列番号 333 または配列番号 335 の配列を含む、請求項 1 から 1
3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 22】

配列番号 329、配列番号 333 または配列番号 335 のアミノ酸配列と少なくとも 9
0% 同一の配列を含むタンパク質。

【請求項 23】

配列番号 329、配列番号 333 または配列番号 335 のアミノ酸配列と少なくとも 9
5% 同一の配列を含むタンパク質。

【請求項 24】

配列番号 329、配列番号 333 または配列番号 335 のアミノ酸配列と少なくとも 9
9% 同一の配列を含むタンパク質。

【請求項 25】

配列番号 330、配列番号 334 または配列番号 336 から選択されるアミノ酸配列と
少なくとも 90% 同一の配列を含むタンパク質。

【請求項 26】

配列番号 330、配列番号 334 または配列番号 336 から選択されるアミノ酸配列と
少なくとも 95% 同一の配列を含むタンパク質。

【請求項 27】

配列番号 330、配列番号 334 または配列番号 336 から選択されるアミノ酸配列と
少なくとも 99% 同一の配列を含むタンパク質。

【請求項 28】

(a) NKG2D に結合する第 1 の抗原結合部位と；

(b) 腫瘍関連抗原 L1CAM に結合する第 2 の抗原結合部位と；

(c) CD16 に結合するのに十分な抗体 Fc ドメインもしくはその部分、または CD
16 に結合する第 3 の抗原結合部位と
を含むタンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

(a) NKG2D に結合する第 1 の抗原結合部位と；

(b) FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR (HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1 および SLC1A5 からなる群から選択される腫瘍関連抗原に結合する第 2 の抗原結合部位と；

(c) CD16 に結合するのに十分な抗体 Fc ドメインもしくはその部分、または CD16 に結合する第 3 の抗原結合部位とを含むタンパク質。

【請求項 30】

前記第 2 の抗原結合部位と同じ腫瘍関連抗原に結合する追加の抗原結合部位をさらに含む、請求項 14、28 または 29 に記載のタンパク質。

10

【請求項 31】

NKG2D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が一本鎖可変領域断片 (scFv) であり、腫瘍関連抗原に結合する前記第 2 のおよび／または前記追加の抗原結合部位が Fab 断片である、請求項 14、28、29 または 30 に記載のタンパク質。

【請求項 32】

NKG2D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が scFv であり、腫瘍関連抗原に結合する前記第 2 のおよび／または前記追加の抗原結合部位が scFv である、請求項 14、28、29 または 30 に記載のタンパク質。

【請求項 33】

NKG2D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が Fab 断片であり、腫瘍関連抗原に結合する前記第 2 の抗原結合部位が scFv である、請求項 14、28 または 29 に記載のタンパク質。

20

【請求項 34】

NKG2D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が scFv であり、腫瘍関連抗原に結合する前記第 2 の抗原結合部位が Fab 断片である、請求項 14、28 または 29 に記載のタンパク質。

【請求項 35】

前記第 1 の抗原結合部位がヒトの NKG2D に結合する、請求項 14 および 28 から 34 のいずれか一項に記載のタンパク質。

30

【請求項 36】

前記第 1 の、前記第 2 のおよび／または前記追加の抗原結合部位が重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、請求項 14 および 28 から 35 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 37】

前記腫瘍関連抗原に結合する前記 scFv 前記 scFv および／または NKG2D に結合する前記 scFv が、Ala-Ser または Gly-Ala-Ser を含むヒンジを介して、CD16 に結合するのに十分な抗体定常ドメインまたはその部分に連結しており、前記 scFv が重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、請求項 31 から 34 のいずれか一項に記載のタンパク質。

40

【請求項 38】

前記重鎖可変ドメインが、前記軽鎖可変ドメインとジスルフィド架橋を形成する、請求項 36 または 37 に記載のタンパク質。

【請求項 39】

前記ジスルフィド架橋が前記重鎖可変ドメインの C44 と前記軽鎖可変ドメインの C100 との間に形成される、請求項 38 に記載のタンパク質。

【請求項 40】

前記 scFv 内で、前記重鎖可変ドメインが、フレキシブルリンカーを介して、前記軽鎖可変ドメインに連結している、請求項 37 から 39 のいずれか一項に記載のタンパク質。

50

【請求項 4 1】

前記 s c F v 内で、前記フレキシブルリンカーが (G l y G l y G l y G l y S e r)₄ ((G 4 S)₄) (配列番号 1 2 6) を含む、請求項 4 0 に記載のタンパク質。

【請求項 4 2】

前記 s c F v 内で、前記重鎖可変ドメインが前記軽鎖可変ドメインの N 末端または C 末端に位置する、請求項 3 7 から 4 1 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 4 3】

前記 s c F v 内で、前記ヒンジがアミノ酸配列 T h r - L y s - G l y をさらに含む、請求項 3 7 から 4 2 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 4 4】

N K G 2 D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 1、配列番号 4 1、配列番号 4 9、配列番号 5 7、配列番号 5 9、配列番号 6 1、配列番号 6 9、配列番号 7 7、配列番号 8 5、配列番号 3 5 1、配列番号 3 5 3、配列番号 3 5 6、配列番号 3 5 9、配列番号 3 6 2、配列番号 3 6 5 および配列番号 9 3 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインを含む、請求項 1 4 および 2 8 から 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 4 5】

N K G 2 D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 3 5 1 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 8 6 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 4 および 2 8 から 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 4 6】

N K G 2 D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 3 6 5 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 8 6 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 4 および 2 8 から 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 4 7】

N K G 2 D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 4 1 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 4 2 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 4 および 2 8 から 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 4 8】

N K G 2 D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 4 9 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 0 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 4 および 2 8 から 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 4 9】

N K G 2 D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 5 7 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 5 8 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 4 および 2 8 から 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 5 0】

N K G 2 D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 5 9 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 6 0 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 4 および 2 8 から 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 5 1】

N K G 2 D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 6 1 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 6 2 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 4 および 2 8 から 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 5 2】

N K G 2 D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 6 9 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 7 0 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 4 および 2 8 から 4 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 5 3】

N K G 2 D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 7 7 と少なくとも 9 0 % 同

10

20

30

40

50

一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 78 と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 14 および 28 から 43 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 54】

NKG2D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 85 と少なくとも 90 % 同一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 86 と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 14 および 28 から 43 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 55】

NKG2D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 93 と少なくとも 90 % 同一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 94 と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 14 および 28 から 43 のいずれか一項に記載のタンパク質。

10

【請求項 56】

NKG2D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 101 と少なくとも 90 % 同一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 102 と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 14 および 28 から 43 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 57】

NKG2D に結合する前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 103 と少なくとも 90 % 同一の重鎖可変ドメインおよび配列番号 104 と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変ドメインを含む、請求項 14 および 28 から 43 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 58】

前記第 2 の抗原結合部位が B7-H3 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 109 または 386 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 113 または 387 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 14 および 30 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

20

【請求項 59】

前記第 2 の抗原結合部位が B7-H3 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 117 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 121 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 14 および 30 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 60】

前記第 2 の抗原結合部位が B7-H3 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 369 または 388 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 370 または 389 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 14 および 30 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

30

【請求項 61】

前記第 2 の抗原結合部位が B7-H3 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 377 または 390 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 378 または 391 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 14 および 30 から 57 のいずれか

40

【請求項 62】

前記第 2 の抗原結合部位が L1CAM に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 133 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 137 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 28 および 30 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 63】

前記第 2 の抗原結合部位が L1CAM に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 141 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 145 と少なくとも 90 % 同一のア

50

ミノ酸配列を含む、請求項 28 および 30 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 64】

前記第 2 の抗原結合部位が F L T 1 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 150 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 154 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 65】

前記第 2 の抗原結合部位が F L T 1 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 158 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 162 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

10

【請求項 66】

前記第 2 の抗原結合部位が K D R に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 166 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 170 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 67】

前記第 2 の抗原結合部位が K D R に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 174 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 178 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

20

【請求項 68】

前記第 2 の抗原結合部位が T N C に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 182 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 186 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 69】

前記第 2 の抗原結合部位が T N C に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 190 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 194 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

30

【請求項 70】

前記第 2 の抗原結合部位が C S P G 4 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 198 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 202 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 71】

前記第 2 の抗原結合部位が C S P G 4 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 206 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 210 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

40

【請求項 72】

前記第 2 の抗原結合部位が B S T 1 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 214 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 218 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 73】

前記第 2 の抗原結合部位が B S T 1 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 222 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 226 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

50

ノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 74】

前記第 2 の抗原結合部位が S E L P に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 230 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 234 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 75】

前記第 2 の抗原結合部位が S E L P に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 238 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 242 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 76】

前記第 2 の抗原結合部位が C D 2 0 0 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 246 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 250 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 77】

前記第 2 の抗原結合部位が I N S R に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 254 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 258 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 78】

前記第 2 の抗原結合部位が I N S R に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 262 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 266 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 79】

前記第 2 の抗原結合部位が I T G A 6 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 270 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 274 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 80】

前記第 2 の抗原結合部位が M E L T F に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 284 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 288 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 81】

前記第 2 の抗原結合部位が M E L T F に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 292 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 296 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 82】

前記第 2 の抗原結合部位が S L C 1 A 5 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 300 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 304 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 83】

前記第 2 の抗原結合部位が S L C 1 A 5 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 308 と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 312 と少なくとも 90 % 同一の

10

20

30

40

50

アミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 84】

前記第 2 の抗原結合部位が L1CAM に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 134 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR1 配列；
- (b) 配列番号 135 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR2 配列；および
- (c) 配列番号 136 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 138 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR1 配列；
- (e) 配列番号 139 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR2 配列；および
- (f) 配列番号 140 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 62 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 85】

前記第 2 の抗原結合部位が L1CAM に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 142 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR1 配列；
- (b) 配列番号 143 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR2 配列；および
- (c) 配列番号 144 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 146 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR1 配列；
- (e) 配列番号 147 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR2 配列；および
- (f) 配列番号 148 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 63 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 86】

前記第 2 の抗原結合部位が FLT1 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 151 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR1 配列；
- (b) 配列番号 152 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR2 配列；および
- (c) 配列番号 153 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 155 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR1 配列；
- (e) 配列番号 156 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR2 配列；および
- (f) 配列番号 157 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 64 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 87】

前記第 2 の抗原結合部位が FLT1 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 159 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR1 配列；
- (b) 配列番号 160 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR2 配列；および
- (c) 配列番号 161 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 163 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR1 配列；
- (e) 配列番号 164 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR2 配列；および

10

20

30

40

50

(f) 配列番号 165 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR3 配列を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 65 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 88】

前記第 2 の抗原結合部位が KDR に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 167 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR1 配列；
- (b) 配列番号 168 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR2 配列；および
- (c) 配列番号 169 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

10

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 171 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR1 配列；
- (e) 配列番号 172 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR2 配列；および
- (f) 配列番号 173 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 66 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 89】

前記第 2 の抗原結合部位が KDR に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 175 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR1 配列；
- (b) 配列番号 176 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR2 配列；および
- (c) 配列番号 177 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

20

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 179 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR1 配列；
- (e) 配列番号 180 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR2 配列；および
- (f) 配列番号 181 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 67 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 90】

30

前記第 2 の抗原結合部位が TNC に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 183 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR1 配列；
- (b) 配列番号 184 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR2 配列；および
- (c) 配列番号 185 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 187 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR1 配列；
- (e) 配列番号 188 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR2 配列；および
- (f) 配列番号 189 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 CDR3 配列

40

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 68 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 91】

前記第 2 の抗原結合部位が TNC に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 191 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR1 配列；
- (b) 配列番号 192 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR2 配列；および
- (c) 配列番号 193 のアミノ酸配列と同一の重鎖 CDR3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

50

- (d) 配列番号 195 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；
- (e) 配列番号 196 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および
- (f) 配列番号 197 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 69 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 9 2】

前記第 2 の抗原結合部位が C S P G 4 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 199 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；
- (b) 配列番号 200 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および
- (c) 配列番号 201 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 203 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；
- (e) 配列番号 204 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および
- (f) 配列番号 205 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 70 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 9 3】

前記第 2 の抗原結合部位が C S P G 4 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 207 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；
- (b) 配列番号 208 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および
- (c) 配列番号 209 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 211 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；
- (e) 配列番号 212 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および
- (f) 配列番号 213 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 71 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 9 4】

前記第 2 の抗原結合部位が B S T 1 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 215 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；
- (b) 配列番号 216 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および
- (c) 配列番号 217 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 219 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；
- (e) 配列番号 220 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および
- (f) 配列番号 221 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 72 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 9 5】

前記第 2 の抗原結合部位が B S T 1 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 223 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；
- (b) 配列番号 224 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および
- (c) 配列番号 225 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

(d) 配列番号 2 2 7 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；

(e) 配列番号 2 2 8 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および

(f) 配列番号 2 2 9 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 2 9 から 5 7 および 7 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 9 6】

前記第 2 の抗原結合部位が S E L P に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

(a) 配列番号 2 3 1 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；

(b) 配列番号 2 3 2 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および

(c) 配列番号 2 3 3 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

(d) 配列番号 2 3 5 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；

(e) 配列番号 2 3 6 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および

(f) 配列番号 2 3 7 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 2 9 から 5 7 および 7 4 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 9 7】

前記第 2 の抗原結合部位が S E L P に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

(a) 配列番号 2 3 9 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；

(b) 配列番号 2 4 0 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および

(c) 配列番号 2 4 1 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

(d) 配列番号 2 4 3 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；

(e) 配列番号 2 4 4 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および

(f) 配列番号 2 4 5 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 2 9 から 5 7 および 7 5 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 9 8】

前記第 2 の抗原結合部位が C D 2 0 0 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

(a) 配列番号 2 4 7 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；

(b) 配列番号 2 4 8 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および

(c) 配列番号 2 4 9 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

(d) 配列番号 2 5 1 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；

(e) 配列番号 2 5 2 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および

(f) 配列番号 2 5 3 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 2 9 から 5 7 および 7 6 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 9 9】

前記第 2 の抗原結合部位が I N S R に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

(a) 配列番号 2 5 5 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；

(b) 配列番号 256 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および

(c) 配列番号 257 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

(d) 配列番号 259 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；

(e) 配列番号 260 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および

(f) 配列番号 261 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 77 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 100】

10

前記第 2 の抗原結合部位が I N S R に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

(a) 配列番号 263 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；

(b) 配列番号 264 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および

(c) 配列番号 265 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

(d) 配列番号 267 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；

(e) 配列番号 268 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および

(f) 配列番号 269 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

20

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 78 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 101】

前記第 2 の抗原結合部位が I T G A 6 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

(a) 配列番号 271 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；

(b) 配列番号 272 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および

(c) 配列番号 273 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

30

(d) 配列番号 275 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；

(e) 配列番号 276 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および

(f) 配列番号 277 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 79 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 102】

前記第 2 の抗原結合部位が I T G A 6 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

(a) 配列番号 278 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；

(b) 配列番号 279 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および

(c) 配列番号 280 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

40

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

(d) 配列番号 281 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；

(e) 配列番号 282 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および

(f) 配列番号 283 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 103】

前記第 2 の抗原結合部位が M E L T F に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

50

- (a) 配列番号 285 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；
- (b) 配列番号 286 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および
- (c) 配列番号 287 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 289 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；
- (e) 配列番号 290 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および
- (f) 配列番号 291 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 80 のいずれか一項に記載のタンパク質。

10

【請求項 104】

前記第 2 の抗原結合部位が M E L T F に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 293 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；
- (b) 配列番号 294 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および
- (c) 配列番号 295 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 297 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；
- (e) 配列番号 298 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および
- (f) 配列番号 299 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 81 のいずれか一項に記載のタンパク質。

20

【請求項 105】

前記第 2 の抗原結合部位が S L C 1 A 5 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 301 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；
- (b) 配列番号 302 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および
- (c) 配列番号 303 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 305 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；
- (e) 配列番号 306 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および
- (f) 配列番号 307 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 82 のいずれか一項に記載のタンパク質。

30

【請求項 106】

前記第 2 の抗原結合部位が S L C 1 A 5 に結合し、前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、

- (a) 配列番号 309 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列；
- (b) 配列番号 310 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列；および
- (c) 配列番号 311 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含み、

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、

- (d) 配列番号 313 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列；
- (e) 配列番号 314 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列；および
- (f) 配列番号 315 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列

を含むアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 57 および 83 のいずれか一項に記載のタンパク質。

40

【請求項 107】

50

C D 1 6 に結合するのに十分な抗体 F c ドメインまたはその部分を含み、前記抗体 F c ドメインがヒンジおよび C H 2 ドメインを含む、請求項 1 4 および 2 8 から 1 0 6 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 1 0 8】

前記抗体 F c ドメインがヒト I g G 1 抗体のヒンジおよび C H 2 ドメインを含む、請求項 1 0 7 に記載のタンパク質。

【請求項 1 0 9】

前記抗体 F c ドメインが、ヒト I g G 1 抗体のアミノ酸 2 3 4 ~ 3 3 2 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 0 7 または 1 0 8 に記載のタンパク質。

【請求項 1 1 0】

前記抗体 F c ドメインが、ヒト I g G 1 の前記 F c ドメインと少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含み、Q 3 4 7、Y 3 4 9、L 3 5 1、Q 3 5 2、S 3 5 4、E 3 5 6、E 3 5 7、K 3 6 0、Q 3 6 2、S 3 6 4、T 3 6 6、L 3 6 8、K 3 7 0、N 3 9 0、K 3 9 2、T 3 9 4、D 3 9 9、S 4 0 0、D 4 0 1、F 4 0 5、Y 4 0 7、K 4 0 9、T 4 1 1 および K 4 3 9 からなる群から選択される 1 つまたは複数の位置で異なる、請求項 1 0 9 に記載のタンパク質。

【請求項 1 1 1】

前記請求項のいずれか一項に記載のタンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む製剤。

【請求項 1 1 2】

請求項 1 から 1 1 0 のいずれか一項に記載のタンパク質を発現する 1 つまたは複数の核酸を含む細胞。

【請求項 1 1 3】

腫瘍細胞死を増強する方法であって、腫瘍細胞およびナチュラルキラー細胞を、有効量の請求項 1 から 6 1 および 1 0 7 から 1 1 0 のいずれか一項に記載のタンパク質に曝露するステップを含み、前記腫瘍細胞が B 7 - H 3 を発現する、方法。

【請求項 1 1 4】

腫瘍細胞死を増強する方法であって、腫瘍細胞およびナチュラルキラー細胞を、有効量の請求項 1 から 1 1 0 のいずれか一項に記載のタンパク質に曝露するステップを含み、前記腫瘍細胞が、B 7 - H 3、L 1 C A M、F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R (H H F 5)、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1 および S L C 1 A 5 から選択される腫瘍関連抗原を発現する、方法。

【請求項 1 1 5】

がんを処置する方法であって、有効量の請求項 1 から 1 1 0 のいずれか一項に記載のタンパク質または請求項 1 1 1 に記載の製剤を患者に投与するステップを含む方法。

【請求項 1 1 6】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が B 7 - H 3 に結合し、前記がんが、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、神経膠芽腫、頭頸部がん、肺がん、肝臓がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、肉腫、腎がん、結腸直腸がん、胃がん、神経芽細胞腫、扁平上皮癌および急性骨髄性白血病 (A M L) からなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が L 1 C A M に結合し、前記がんが、膀胱がん、腎がん、乳がん、子宮頸がん、肉腫、肺がん、頭頸部がん、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、黒色腫、卵巣がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、消化管間質腫瘍 (G I S T)、胆管癌、結腸直腸がん、膵臓がんおよび前立腺がんからなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が F L T 1 に結合し、処置される前記がんが、腎がん、胃がん、神経膠腫、結腸直腸がん、胆道がん、前立腺がん、肉腫および乳がん

10

20

30

40

50

からなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が K D R に結合し、処置される前記がんが、腎がん、胃がん、神経膠腫、結腸直腸がん、胆道がん、肺がん、黒色腫、肝臓がん、肉腫、乳がん、中皮腫および甲状腺がんからなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が T N C に結合し、処置される前記がんが、子宮頸がん、乳がん、膵臓がん、肺がん、非ホジキンリンパ腫、頭頸部がん、結腸直腸がん、食道がん、神経膠腫および前立腺がんからなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

10

【請求項 1 2 1】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が T N N に結合し、処置される前記がんが、子宮頸がん、乳がん、膵臓がん、肺がん、非ホジキンリンパ腫、頭頸部がん、結腸直腸がん、食道がん、神経膠腫および前立腺がんからなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が C S P G 4 に結合し、処置される前記がんが、黒色腫、腎がん、肉腫、神経膠腫、頭頸部がん、乳がん、膀胱がん、肺がんおよび子宮頸がんからなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

20

【請求項 1 2 3】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が B S T 1 に結合し、処置される前記がんが、急性骨髄性白血病、中皮腫、膀胱がんおよび肉腫からなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が S E L P に結合し、処置される前記がんが、骨髄増殖性腫瘍、急性骨髄性白血病、乳がん、膀胱がん、甲状腺がん、腎がんおよび膵臓がんからなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が C D 2 0 0 に結合し、処置される前記がんが、乳がん、結腸直腸がん、B 細胞悪性腫瘍、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、リンパ腫および中皮腫からなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

30

【請求項 1 2 6】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が I N S R に結合し、処置される前記がんが、前立腺がん、胃がん、結腸直腸がん、神経膠芽腫、乳がん、子宮内膜がん、肝臓がんおよび腎がんからなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が I T G A 6 に結合し、処置される前記がんが、乳がん、白血病、前立腺がん、結腸直腸がん、腎がん、頭頸部がん、卵巣がん、胃がんおよび肺がんからなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

40

【請求項 1 2 8】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が M E L T F に結合し、処置される前記がんが、乳がん、肺がん、黒色腫、膀胱がん、腎がん、肉腫、頭頸部がん、中皮腫、膵臓がんからなる群から選択される、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記タンパク質の前記第 2 の抗原結合部位が P E C A M 1 に結合し、処置される前記がんが、固形腫瘍である、請求項 1 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記固形腫瘍が有意な新生血管を有する、請求項 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

50

前記タンパク質の前記第2の抗原結合部位がSLC1A5に結合し、処置される前記がんが、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、前立腺がん、腎がん、頭頸部がん、神経芽細胞腫、胃がんおよび卵巣がんからなる群から選択される、請求項115に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その各々の開示全体があらゆる目的のためにこれにより参照により本明細書に組み込まれる、2018年8月8日に提出された米国仮特許出願第62/716,106号；2018年8月8日に提出された米国仮特許出願第62/716,109号；2018年8月8日に提出された米国仮特許出願第62/716,113号の利益および優先権を主張する。

配列表

【0002】

本出願は、ASCII形式で電子的に提出され、全体がこれにより参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。2019年8月7日に作成された前記ASCIIコピーは、DFY-059WO-ST25.txtと命名され、サイズが367,901バイトである。

【0003】

本発明は、NKG2D、CD16および腫瘍関連抗原（例えば、B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5）に結合する多重特異性結合タンパク質に関する。

【背景技術】

【0004】

がんは、この疾患を処置するための文献で報告されている相当な研究努力および科学の進歩にもかかわらず、重大な健康問題であり続けている。最も頻繁に診断されるがんの一部には、前立腺がん、乳がん、肺がんおよび結腸直腸がんが含まれる。前立腺がんは、男性で最も一般的ながん形態である。乳がんは女性の死亡の主な原因のままである。多発性骨髄腫、白血病およびリンパ腫を含む血液および骨髄のがんも頻繁に診断されるがん型である。これらのがんのための現在の処置選択肢は、全ての患者に有効ではない、および/または相当な有害副作用を有する場合がある。他の種類のがんも、既存の治療選択肢を使用して処置するのが困難なままである。

【0005】

がん免疫療法は、高度に特異的であり、患者自身の免疫系を使用してがん細胞の破壊を促進することができるので、望ましい。二重特異性T細胞エンゲージャーなどの融合タンパク質は、腫瘍細胞およびT細胞に結合して、腫瘍細胞の破壊を促進する、文献に記載されているがん免疫療法である。ある特定の腫瘍関連抗原およびある特定の免疫細胞に結合する抗体が文献に記載されている。例えば、WO2016/134371およびWO2015/095412を参照されたい。

【0006】

ナチュラルキラー（NK）細胞は、自然免疫系の成分であり、循環リンパ球のおよそ15%を構成する。NK細胞は、事実上全ての組織に浸潤し、元々、事前の感作の必要性なしに腫瘍細胞を有効に死滅させる能力によって特徴付けられた。活性化NK細胞は、細胞傷害性T細胞と類似の手段によって一すなわち、パーフォリンおよびグランザイムを含有する細胞溶解性顆粒（cytolytic granule）を介して、ならびにデスレセプター経路を介して、標的細胞を死滅させる。活性化NK細胞はまた、IFN-γなどの炎症性サイトカインおよび他の白血球の標的組織への動員を促進するケモカインを分泌する。

【0007】

10

20

30

40

50

NK細胞は、その表面上のさまざまな活性化受容体および抑制性受容体を介してシグナルに応答する。例えば、NK細胞が健康な自己細胞に遭遇した場合、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）の活性化を介してその活性が阻害される。あるいは、NK細胞が外来細胞またはがん細胞に遭遇した場合、その活性化受容体（例えば、NKG2D、NCR、DNAM1）を介して活性化される。NK細胞はまた、その表面上のCD16受容体を介して一部の免疫グロブリンの定常領域によっても活性化される。活性化に対するNK細胞の全体的な感度は、刺激シグナルと抑制シグナルの合計に依存する。

【0008】

CD276としても知られているB7-H3は、抗原提示細胞（APC）上で発現される主要な糖タンパク質である。これは、PD-1およびCTLA4などの免疫チェックポイントと一緒に、T細胞活性の共抑制分子として作用する。B7-H3は、大部分は腫瘍および腫瘍関連細胞、例えば、肺がん、乳がん、脳がん、腎臓がんおよび前立腺がん上で発現される。B7-H3は、がん遊走、浸潤および血管新生に寄与する異なるタンパク質に広く関連しているように見える（Castellanos et al., Am J Clin Exp Immunol. 2017; 6(4): 66-75参照）。

10

【0009】

L1細胞接着分子（L1CAM）は、免疫グロブリン（Ig）スーパーファミリーの200~220kDa膜貫通糖タンパク質であり、6つのIg様ドメインおよび5つのフィブロネクチンIII型リピート、ならびにこれに続く膜貫通領域および高度に保存された細胞質尾部で構成される。L1CAMは、密接に関連する神経細胞接着分子（CAM）のL1ファミリーのプロトタイプメンバーであり、神経細胞接着および遊走で必須の役割を果たす。さらに、L1CAMは、予後不良、腫瘍進行およびリンパ節への転移を含む、ヒトがんの進行に関連することが分かっている。L1CAMは、多くのがん、例えば、膀胱がん、腎がん、乳がん、子宮頸がん、肉腫、肺がん、頭頸部がん、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、黒色腫、卵巣がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、消化管間質腫瘍（GIST）、胆管癌、結腸直腸がん、膵臓がんおよび前立腺がんで発現される（例えば、Altevogt et al., Int. J. Cancer. 2016; 138: 1565-1576参照）。

20

【0010】

FLT1とも呼ばれる血管内皮成長因子受容体1（VEGFR1）は、VEGF-A、VEGF-Bおよび胎盤成長因子（PGF）に結合する受容体チロシンキナーゼである。VEGFR1は、血管内皮細胞、胎盤栄養膜細胞および末梢血単球で発現され、血管新生および脈管形成で重要な役割を果たす。FLT1の完全長膜貫通型受容体アイソフォームおよび短縮型可溶性アイソフォームが見ついている。可溶性アイソフォームは、子癇前症の開始に関連している。

30

【0011】

キナーゼ挿入ドメイン受容体（KDR）は、VEGF-A、VEGF-CおよびVEGF-Dに結合する受容体チロシンキナーゼである。KDRは、血管内皮細胞で発現され、VEGFによって誘導される内皮増殖、生存、遊走、管腔形態形成および発芽で重要な役割を果たす。KDRの変異は、乳児毛細血管腫に関係している。

40

【0012】

テネイシンC（TNC）は、ジスルフィド連結サブユニットを有するホモ六量体構造を有する細胞外基質タンパク質である。TNCは、基質成分、可溶性因子および病原体を含む多くの細胞外結合パートナー、ならびに細胞表面受容体を有する。TNCタンパク質合成は厳密に調節されており、胚組織には広範なタンパク質分布があるが、成体組織では分布が制限される。TNCは、慢性炎症およびがんの間にも発現される。

【0013】

テネイシンN（TNN）は、ホモ六量体細胞外基質タンパク質である。TNNは、正常な成体哺乳動物組織でも脳でも検出されないが、乳房腫瘍および脳腫瘍、例えば神経膠芽腫、星細胞腫および乏突起神経膠腫で発現される。脳腫瘍では、これは血管の内皮細胞層

50

の周りで検出される。

【0014】

コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4 (CSPG4) は、ヒト悪性黒色腫細胞によって発現される膜内在性コンドロイチン硫酸プロテオグリカンである。CSPG4は、その細胞外N末端を介して成長因子および細胞外基質プロテアーゼに結合する。CSPG4は、内皮基底膜への黒色腫細胞拡散の早期イベント中に細胞-基層相互作用の安定化で役割を果たす。

【0015】

骨髄間質細胞抗原1 (BST1) は、セカンドメッセンジャー環状ADPリボースおよびニコチン酸アデニンジヌクオチドリ酸を合成するためのグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー酵素である。BST1発現は、関節リウマチの患者に由来する骨髄間質細胞系で増強される。関節リウマチにおけるポリクローナルB細胞異常は、少なくとも部分的には、間質細胞集団におけるBST1過剰発現に起因し得る。BST1はまた、プレB細胞成長を促進する。

【0016】

セレクチンP (SELP) は、好中球および単球上のルイス式血液型糖鎖抗原のシアル酸付加形態に結合するカルシウム依存性受容体である。SELPは、血小板のアルファ顆粒および内皮細胞のバイベル・パラデ小体に貯蔵されるが、活性化内皮細胞または血小板と白血球の相互作用を媒介するために血小板活性化および脱顆粒中に形質膜に再分布する。

【0017】

CD200は、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインの2つの細胞外免疫グロブリンドメインを含有するI型膜糖タンパク質である。CD200は、B細胞、T細胞のサブセット、胸腺細胞、内皮細胞およびニューロンを含むさまざまな細胞型で発現される。CD200は、免疫抑制および抗腫瘍活性の調節で重要な役割を果たす。

【0018】

インスリン受容体 (INSR) は受容体チロシンキナーゼである。INSRは、プレプロタンパク質として翻訳され、タンパク質分解処理されて、ヘテロ四量体受容体を形成するアルファおよびベータサブユニットを生成する。INSRは、肝臓、脂肪組織および骨格筋で主に発現される。INSRへのインスリンまたは他のリガンドの結合によって、グルコース取り込みおよび放出、ならびに炭水化物、脂質およびタンパク質の合成および貯蔵を調節するインスリンシグナル伝達経路が活性化される。

【0019】

インテグリンサブユニットアルファ6 (ITGA6) は、インテグリンアルファ鎖ファミリーのメンバーである。インテグリンは、細胞表面接着およびシグナル伝達で機能する、アルファ鎖およびベータ鎖で構成されるヘテロ二量体膜内在性タンパク質である。ITGA6は、プレプロタンパク質として翻訳され、タンパク質分解処理されて、アルファ6サブユニットを構成する軽鎖および重鎖を生成する。このサブユニットは、ベータ1またはベータ4サブユニットと会合して、ラミニンファミリーのメンバーを含む細胞外基質タンパク質と相互作用するインテグリンを形成し得る。アルファ6ベータ4インテグリンは腫瘍形成を促進し得るが、アルファ6ベータ1インテグリンはerbB2/HER2シグナル伝達を負に調節し得る。

【0020】

メラノトランスフェリン (MELTF) は、トランスフェリンスーパーファミリーの細胞表面糖タンパク質である。MELTFは、黒色腫細胞およびある特定の胎児組織で発現される。MELTFは鉄に結合するが、その鉄結合活性の重要性は不明なままである。

血小板内皮細胞接着分子1 (PECAM1) は、免疫グロブリンスーパーファミリーの細胞表面タンパク質である。PECAM1は、血小板、単球、好中球およびT細胞の一部の型の表面上に見られ、内皮細胞の細胞間結合の大部分を構成する。PECAM1は、白血球遊走、血管新生およびインテグリン活性化におそらく関与している。

10

20

30

40

50

溶質輸送体ファミリー1メンバー5 (SLC1A5) は、双性イオン性アミノ酸を好む、広範な基質特異性を有するナトリウム依存性アミノ酸輸送体である。SLC1A5は、グルタミン、アスパラギンならびに分岐鎖および芳香族アミノ酸を含む全ての中性アミノ酸を基質として受け入れ、メチル化アミノ酸、アニオン性アミノ酸およびカチオン性アミノ酸を排除する。SLC1A5は、脂肪、前立腺、肺、腎臓、結腸および胎盤などの多くの組織で発現される。SLC1A5は、RD114/D型レトロウイルスの受容体としても作用することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0021】

【特許文献1】国際公開第2016/134371号

【特許文献2】国際公開第2015/095412号

【非特許文献】

【0022】

【非特許文献1】Castellanos et al., Am J Clin Exp Immunol. 2017; 6(4): 66-75

【非特許文献2】Altevogt et al., Int. J. Cancer. 2016; 138: 1565-1576

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0023】

本発明は、ナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体およびCD16受容体、ならびに腫瘍関連抗原B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。このようなタンパク質は、1種より多くのNK活性化受容体と結合することができ、NKG2Dへの天然リガンドの結合を遮断し得る。ある特定の実施形態では、タンパク質はヒトのNK細胞を刺激することができる。一部の実施形態では、タンパク質は、ヒトならびにげっ歯類およびカンクイザルなどの他の種のNK細胞を刺激することができる。本発明のさまざまな態様および実施形態を以下でさらに詳細に説明する。

【0024】

ある特定の実施形態では、本発明は、例えば、がん細胞上のB7-H3、ならびにナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体およびCD16受容体に結合して、ナチュラルキラー細胞を活性化するタンパク質（例えば、多重特異性結合タンパク質）を提供する。結合タンパク質（例えば、多重特異性結合タンパク質）は、本明細書に記載される医薬組成物および治療方法に有用である。例えば、B7-H3、ならびにナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体およびCD16受容体に結合する抗原結合部位を含むタンパク質の結合によって、がん細胞の破壊に向けたナチュラルキラー細胞の活性が増強される。例えば、がん細胞上のB7-H3に結合する抗原結合部位を含むタンパク質（例えば、多重特異性結合タンパク質）の結合によって、がん細胞をナチュラルキラー細胞に近づけ、ナチュラルキラー細胞によるがん細胞の直接的および間接的破壊が促進される。例示的な多重特異性結合タンパク質のさらなる説明を以下で提供する。

【0025】

本開示の多重特異性結合タンパク質の第1の成分は、例えば、B7-H3発現細胞に結合する。

【0026】

本開示の多重特異性結合タンパク質の第2の成分はNKG2D受容体発現細胞に結合し、該細胞は、それだけに限らないが、NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞およびCD8⁺ $\alpha\beta$ T細胞を含み得る。NKG2Dに結合すると、多重特異性結合タンパク質は、ULBP6およびMICAなどの天然リガンドがNKG2Dに結合してNKG2D受容体を活性化するのを遮

10

20

30

40

50

断し得る。

【0027】

本開示の多重特異性結合タンパク質の第3の成分は、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、肥満細胞および濾胞樹状細胞を含む白血球の表面上のFc受容体であるCD16を発現する細胞に結合する。

【0028】

本開示の一部のタンパク質は、10nMの K_D またはそれよりも弱い親和性でNKG2Dに結合する。

【0029】

したがって、本発明の一態様は、NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位と；腫瘍関連抗原B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する第2の抗原結合部位と；CD16に結合するのに十分な抗体Fcドメイン、その部分、またはCD16に結合する第3の抗原結合部位とを組み込むタンパク質を提供する。

10

【0030】

抗原結合部位はそれぞれ、抗体重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよく（例えば、抗体のように配置される、または融合してscFvを形成する）、または抗原結合部位の1つもしくは複数が、単一ドメイン抗体、例えばラクダ抗体のような V_H H抗体もしくは軟骨魚類で見られる抗体のような V_NA_R 抗体であってもよい。

20

【0031】

一態様では、本発明は、NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位と、腫瘍関連抗原B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する第2の抗原結合部位と、CD16に結合するのに十分な抗体Fcドメイン、その部分、またはCD16に結合する第3の抗原結合部位と、腫瘍関連抗原B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する追加の抗原結合部位とを含む多重特異性結合タンパク質を提供する。

30

【0032】

本発明は、NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位が一本鎖可変領域断片(scFv)であり、腫瘍関連抗原B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する第2のおよび／または追加の抗原結合部位がFab断片であるタンパク質を提供する。本開示はまた、NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位がscFvであり、腫瘍関連抗原B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する第2のおよび／または追加の抗原結合部位がscFvであるタンパク質を提供する。

40

【0033】

本発明は、NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位がFab断片であり、腫瘍関連抗原B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する第2の抗原結合部位がscFvであるタンパク質を提供する。

【0034】

本発明は、NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位がscFvであり、腫瘍関連抗原B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、

50

SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する第2の抗原結合部位がFab断片であるタンパク質を提供する。

【0035】

一態様では、本発明のタンパク質は、ヒンジ配列を介して抗体定常ドメインに連結した一本鎖可変領域断片(scfv)を含む。一部の実施形態では、ヒンジはアミノ酸Ala-Serを含む。一部の他の実施形態では、ヒンジはアミノ酸Ala-SerまたはまたはGly-Ala-Serを含む。一部の実施形態では、ヒンジはアミノ酸Thr-Lys-Glyをさらに含む。scfvは重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含み得る。一部の実施形態では、scfvは、NKG2D、または腫瘍関連抗原B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1もしくはSLC1A5に結合する。ヒンジ配列は、標的抗原への結合の柔軟性を提供する。

10

【0036】

一部の実施形態では、本発明のタンパク質は、(a) NKG2Dに結合するFab断片を含む第1の抗原結合部位と；(b) B7-H3に結合する一本鎖可変領域断片(scfv)を含む第2の抗原結合部位と；(c) CD16に結合するのに十分な抗体Fcドメインもしくはその部分、またはCD16に結合する第3の抗原結合部位とを含む。

【0037】

scfvの一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは軽鎖可変ドメインとジスルフィド架橋を形成する。例えば、ジスルフィド架橋は、重鎖可変ドメインのC44残基と軽鎖可変ドメインのC100残基との間に形成され得、アミノ酸位置はKabatanobashiに従って番号付けされる。一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、GGGGSGGGGSGGGGGSGGGGGSG(「(G4S)₄」)(配列番号126)のアミノ酸配列を含むペプチドリンカーなどのフレキシブルリンカーを介して軽鎖可変ドメインに連結している。scfvの一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは軽鎖可変ドメインのN末端に位置する。scfvの一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは軽鎖可変ドメインのC末端に位置する。

20

【0038】

一態様では、NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位と、腫瘍関連抗原B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する第2の抗原結合部位と、CD16に結合するのに十分な抗体Fcドメイン、その部分、またはCD16に結合する第3の抗原結合部位と、腫瘍関連抗原B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する追加の抗原結合部位とを含む上記の多重特異性結合タンパク質内で、NKG2D結合部位は、配列番号1、配列番号41、配列番号49、配列番号57、配列番号59、配列番号61、配列番号69、配列番号77、配列番号85および配列番号93から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインを含む。

30

40

【0039】

NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位は、一部の実施形態では、例えば、配列番号1と少なくとも90%(例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%)同一のアミノ酸配列を有する、ならびに／または配列番号1のCDR1(配列番号105)、CDR2(配列番号106)およびCDR3(配列番号107)配列と同一のアミノ酸配列を組み込むことによって、配列番号1に関連する重鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。配列番号1に関連する重鎖可変ドメインをさまざまな軽鎖可変ドメインと連結して、NKG2D結合部位を形成することができる。例えば、配列番号1に関連する重鎖可変ドメインが組み込まれる第1の抗原結合部位は、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、

50

24、26、28、30、32、34、36および40に関連する配列のいずれか1つから選択される軽鎖可変ドメインがさらに組み込まれていてもよい。例えば、第1の抗原結合部位は、配列番号1と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインならびに配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36および40から選択される配列のいずれか1つと少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインが組み込まれる。

【0040】

10

あるいは、第1の抗原結合部位は、配列番号41に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号42に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第1の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号41と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号41のCDR1（配列番号43）、CDR2（配列番号44）およびCDR3（配列番号45）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号42と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号42のCDR1（配列番号46）、CDR2（配列番号47）およびCDR3（配列番号48）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

20

【0041】

他の実施形態では、第1の抗原結合部位は、配列番号49に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号50に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第1の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号49と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号49のCDR1（配列番号51）、CDR2（配列番号52）およびCDR3（配列番号53）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号50と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号50のCDR1（配列番号54）、CDR2（配列番号55）およびCDR3（配列番号56）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

30

【0042】

あるいは、第1の抗原結合部位は、例えば、それぞれ、配列番号57と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一のアミノ酸配列および配列番号58と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一のアミノ酸配列を有することによって、配列番号57に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号58に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。

40

【0043】

別の実施形態では、第1の抗原結合部位は、配列番号59に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号60に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第1の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号59と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号59のCDR1（配列番号127）、CDR2（配列番号128）およびCDR3（配列番号129）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号60と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、9

50

４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号６０のＣＤＲ１（配列番号１３０）、ＣＤＲ２（配列番号１３１）およびＣＤＲ３（配列番号１３２）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【００４４】

NKG2Dに結合する第１の抗原結合部位は、一部の実施形態では、配列番号６１に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号６２に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第１の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号６１と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号６１のＣＤＲ１（配列番号６３または３４１）、ＣＤＲ２（配列番号６４）およびＣＤＲ３（配列番号６５または３４２）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第２の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号６２と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号６２のＣＤＲ１（配列番号６６）、ＣＤＲ２（配列番号６７）およびＣＤＲ３（配列番号６８）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。一部の実施形態では、第１の抗原結合部位は、配列番号６９に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号７０に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第１の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号６９と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号６９のＣＤＲ１（配列番号７１または３４３）、ＣＤＲ２（配列番号７２）およびＣＤＲ３（配列番号７３または３４４）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第２の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号７０と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号７０のＣＤＲ１（配列番号７４）、ＣＤＲ２（配列番号７５）およびＣＤＲ３（配列番号７６）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【００４５】

一部の実施形態では、第１の抗原結合部位は、配列番号７７に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号７８に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第１の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号７７と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号７７のＣＤＲ１（配列番号７９または３４５）、ＣＤＲ２（配列番号８０）およびＣＤＲ３（配列番号８１または３４６）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第２の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号７８と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号７８のＣＤＲ１（配列番号８２）、ＣＤＲ２（配列番号８３）およびＣＤＲ３（配列番号８４）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【００４６】

一部の実施形態では、第１の抗原結合部位は、配列番号８５に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号８６に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第１の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号８５と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号８５のＣＤＲ１（配列番号８７または３４７）、ＣＤＲ２（配列番号８８）およびＣＤＲ３（配列番号８９または３４８）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第２の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号８６と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％

、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 8 6 の C D R 1 (配列番号 9 0)、C D R 2 (配列番号 9 1) および C D R 3 (配列番号 9 2) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【 0 0 4 7 】

一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部位は、配列番号 3 5 1 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 8 6 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 1 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 3 5 1 と少なくとも 9 0 % (例えば、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 3 5 1 の C D R 1 (配列番号 8 7 または 3 4 7)、C D R 2 (配列番号 8 8) および C D R 3 (配列番号 3 5 2 または 3 5 4) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 8 6 と少なくとも 9 0 % (例えば、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 8 6 の C D R 1 (配列番号 9 0)、C D R 2 (配列番号 9 1) および C D R 3 (配列番号 9 2) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【 0 0 4 8 】

一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部位は、配列番号 3 5 3 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 8 6 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 1 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 3 5 3 と少なくとも 9 0 % (例えば、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 3 5 3 の C D R 1 (配列番号 8 7 または 3 4 7)、C D R 2 (配列番号 8 8) および C D R 3 (配列番号 3 5 5 または 3 8 5) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 8 6 と少なくとも 9 0 % (例えば、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 8 6 の C D R 1 (配列番号 9 0)、C D R 2 (配列番号 9 1) および C D R 3 (配列番号 9 2) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【 0 0 4 9 】

一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部位は、配列番号 3 5 6 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 8 6 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 1 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 3 5 6 と少なくとも 9 0 % (例えば、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 3 5 6 の C D R 1 (配列番号 8 7 または 3 4 7)、C D R 2 (配列番号 8 8) および C D R 3 (配列番号 3 5 7 または 3 5 8) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 8 6 と少なくとも 9 0 % (例えば、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 8 6 の C D R 1 (配列番号 9 0)、C D R 2 (配列番号 9 1) および C D R 3 (配列番号 9 2) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【 0 0 5 0 】

一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部位は、配列番号 3 5 9 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 8 6 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 1 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 3 5 9 と少なくとも 9 0 % (例えば、 9 0 %、 9 1 %、 9 2 %、 9 3 %、 9 4 %、 9 5 %、 9 6 %、 9 7 %、 9 8 %、 9 9 %または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 3 5 9 の C D R 1 (配列番号 8 7 または 3 4 7)、C D R 2 (配列番号 8 8) および C D R 3 (配列番号 3 6

0 または 3 6 1) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 8 6 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 8 6 の C D R 1 (配列番号 9 0)、C D R 2 (配列番号 9 1) および C D R 3 (配列番号 9 2) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0 0 5 1】

一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部位は、配列番号 3 6 2 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 8 6 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 1 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 3 6 2 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 3 6 2 の C D R 1 (配列番号 8 7 または 3 4 7)、C D R 2 (配列番号 8 8) および C D R 3 (配列番号 3 6 3 または 3 6 4) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 8 6 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 8 6 の C D R 1 (配列番号 9 0)、C D R 2 (配列番号 9 1) および C D R 3 (配列番号 9 2) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0 0 5 2】

一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部位は、配列番号 3 6 5 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 8 6 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 1 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 3 6 5 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 3 6 5 の C D R 1 (配列番号 8 7 または 3 4 7)、C D R 2 (配列番号 8 8) および C D R 3 (配列番号 3 6 6 または 3 6 7) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 8 6 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 8 6 の C D R 1 (配列番号 9 0)、C D R 2 (配列番号 9 1) および C D R 3 (配列番号 9 2) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0 0 5 3】

一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部位は、配列番号 9 3 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 9 4 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 1 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 9 3 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 9 3 の C D R 1 (配列番号 9 5 または 3 4 9)、C D R 2 (配列番号 9 6) および C D R 3 (配列番号 9 7 または 3 5 0) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 9 4 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 9 4 の C D R 1 (配列番号 9 8)、C D R 2 (配列番号 9 9) および C D R 3 (配列番号 1 0 0) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0 0 5 4】

一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部位は、例えば、それぞれ、配列番号 1 0 1 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一のアミノ酸配列および配列番号 1 0 2 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、

９７％、９８％、９９％または１００％）同一のアミノ酸配列を有することによって、配列番号１０１に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号１０２に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。一部の実施形態では、第１の抗原結合部位が、例えば、それぞれ、配列番号１０３と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一のアミノ酸配列および配列番号１０４と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一のアミノ酸配列を有することによって、配列番号１０３に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号１０４に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。

【００５５】

一部の実施形態では、Ｂ７－Ｈ３に結合する第２の抗原結合部位は、配列番号１０９または３８６に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号１１３または３８７に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第２の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号１０９もしくは３８６と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号１０９もしくは３８６のＣＤＲ１（配列番号１１０）、ＣＤＲ２（配列番号１１１）およびＣＤＲ３（配列番号１１２）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第２の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号１１３もしくは３８７と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号１１３もしくは３８７のＣＤＲ１（配列番号１１４）、ＣＤＲ２（配列番号１１５）およびＣＤＲ３（配列番号１１６）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【００５６】

あるいは、Ｂ７－Ｈ３に結合する第２の抗原結合部位は、配列番号１１７に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号１２１に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第２の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号１１７と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号１１７のＣＤＲ１（配列番号１１８）、ＣＤＲ２（配列番号１１９）およびＣＤＲ３（配列番号１２０）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第２の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号１２１と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号１２１のＣＤＲ１（配列番号１２２）、ＣＤＲ２（配列番号１２３）およびＣＤＲ３（配列番号１２４）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【００５７】

あるいは、Ｂ７－Ｈ３に結合する第２の抗原結合部位は、配列番号３６９または３８８に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号３７０または３８９に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第２の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号３６９もしくは３８８と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号３６９もしくは３８８のＣＤＲ１（配列番号３７１）、ＣＤＲ２（配列番号３７２）およびＣＤＲ３（配列番号３７３）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第２の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号３７０もしくは３８９と少なくとも９０％（例えば、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％）同一であってもよい、ならびに／または配列番号３７０もしくは３８９のＣＤＲ１（配列番号３７４）、ＣＤＲ２（配列番号３７５）およびＣＤＲ３（配列番号３７６）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0058】

あるいは、B7-H3に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号377または390に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号378または391に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号377もしくは390と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号377もしくは390のCDR1（配列番号379）、CDR2（配列番号380）およびCDR3（配列番号381）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号378もしくは391と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号378もしくは391のCDR1（配列番号382）、CDR2（配列番号383）およびCDR3（配列番号384）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

10

【0059】

ある特定の実施形態では、本発明のタンパク質は、

（1）それぞれ、配列番号347、88および352のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号90、91および92のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む軽鎖可変ドメイン；

20

（2）それぞれ、配列番号347、88および348のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号90、91および92のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む軽鎖可変ドメイン；

（3）それぞれ、配列番号341、64および342のアミノ酸配列によって表される相補性決定領域1（CDR1）、相補性決定領域2（CDR2）および相補性決定領域3（CDR3）配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号66、67および68のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む軽鎖可変ドメイン；

（4）それぞれ、配列番号343、72および344のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号74、75および76のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む軽鎖可変ドメイン；

30

（5）それぞれ、配列番号345、80および346のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号82、83および84のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む軽鎖可変ドメイン；

（6）それぞれ、配列番号87、88および89のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号90、91および92のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む軽鎖可変ドメイン；

40

（7）それぞれ、配列番号349、96および350のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号98、99および100のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む軽鎖可変ドメイン；

（8）それぞれ、配列番号347、88および355のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号90、91および92のアミノ酸配列によって表されるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む軽鎖可変ドメイン；

（9）それぞれ、配列番号347、88および358のアミノ酸配列によって表される

50

C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(10) それぞれ、配列番号 347、88 および 361 のアミノ酸配列によって表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖可変ドメイン；

(11) それぞれ、配列番号 347、88 および 364 のアミノ酸配列によって表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖可変ドメイン；または

(12) それぞれ、配列番号 347、88 および 367 のアミノ酸配列によって表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびにそれぞれ、配列番号 90、91 および 92 のアミノ酸配列によって表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖可変ドメイン；

を含む、N K G 2 D に結合する F a b を含む第 1 の抗原結合部位と、

重鎖 C D R 1 (C D R H 1)、重鎖 C D R 2 (C D R H 2) および重鎖 C D R 3 (C D R H 3) を含む重鎖可変ドメイン、ならびに軽鎖 C D R 1 (C D R L 1)、軽鎖 C D R 2 (C D R L 2) および軽鎖 C D R 3 (C D R L 3) を含む軽鎖可変ドメインを含み、C D R H 1、C D R H 2、C D R H 3、C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 のアミノ酸配列が、それぞれ、配列番号 110、111、112、114、115 および 116；118、119、120、122、123 および 124；371、372、373、374、375 および 376；または 379、380、381、382、383 および 384 に示される、B 7-H 3 に結合する一本鎖可変領域断片 (s c F v) を含む第 2 の抗原結合部位とを含む。

【0060】

本開示のある特定のタンパク質は、配列番号 329、配列番号 333 または配列番号 335 の配列を含む。

【0061】

本開示のある特定のタンパク質は、配列番号 330、配列番号 334 および配列番号 336 から選択される配列によって表される、抗体 F c ドメインに連結した s c F v を含む。

【0062】

本開示のある特定のタンパク質は、配列番号 329、配列番号 333 または配列番号 335 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一の配列を含む。

【0063】

本開示のある特定のタンパク質は、配列番号 329、配列番号 333 または配列番号 335 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一の配列を含む。

【0064】

本開示のある特定のタンパク質は、配列番号 329、配列番号 333 または配列番号 335 のアミノ酸配列と少なくとも 99% 同一の配列を含む。

【0065】

本開示のある特定のタンパク質は、配列番号 330、配列番号 334 および配列番号 336 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一の配列を含む。

【0066】

本開示のある特定のタンパク質は、配列番号 330、配列番号 334 および配列番号 336 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一の配列を含む。

【0067】

本開示のある特定のタンパク質は、配列番号 330、配列番号 334 および配列番号 3

10

20

30

40

50

36から選択されるアミノ酸配列と少なくとも99%同一の配列を含む。

【0068】

本開示のある特定のタンパク質は、Ala-Serを含むヒンジを介してFcドメインに連結したB7-H3結合scFv（配列番号329、配列番号333または配列番号335）（配列番号330、配列番号334および配列番号336によって表されるscFv-Fc）と；配列番号351を含む重鎖可変ドメインおよびCH1ドメインを含む重鎖部分ならびに軽鎖可変ドメイン（配列番号86）および軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分を含み、重鎖可変ドメインがCH1ドメインに接続されており、CH1ドメインがFcドメインに接続されている（重鎖部分はV_H-CH1-Fcとして表される、アミノ酸配列は配列番号331に示される）、NKG2D結合Fab断片とを含む。

10

【0069】

一部の実施形態では、L1CAMに結合する第2の抗原結合部位は、配列番号133に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号137に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号133と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号133のCDR1（配列番号134）、CDR2（配列番号135）およびCDR3（配列番号136）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号137と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号137のCDR1（配列番号138）、CDR2（配列番号139）およびCDR3（配列番号140）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

20

【0070】

あるいは、L1CAMに結合する第2の抗原結合部位は、配列番号141に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号145に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号141と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号141のCDR1（配列番号142）、CDR2（配列番号143）およびCDR3（配列番号144）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号145と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号145のCDR1（配列番号146）、CDR2（配列番号147）およびCDR3（配列番号148）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

30

【0071】

一部の実施形態では、FLT1に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号150に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号154に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号150と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号150のCDR1（配列番号151）、CDR2（配列番号152）およびCDR3（配列番号153）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号154と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号154のCDR1（配列番号155）、CDR2（配列番号156）およびCDR3（配列番号157）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

40

【0072】

50

あるいは、F L T 1 に結合する第 2 の抗原結合部位は、配列番号 1 5 8 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 1 6 2 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 2 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 1 5 8 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 1 5 8 の C D R 1 (配列番号 1 5 9)、C D R 2 (配列番号 1 6 0) および C D R 3 (配列番号 1 6 1) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 6 2 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 1 6 2 の C D R 1 (配列番号 1 6 3)、C D R 2 (配列番号 1 6 4) および C D R 3 (配列番号 1 6 5) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

10

【0073】

あるいは、K D R に結合する第 2 の抗原結合部位は、配列番号 1 6 6 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 1 7 0 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 2 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 1 6 6 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 1 6 6 の C D R 1 (配列番号 1 6 7)、C D R 2 (配列番号 1 6 8) および C D R 3 (配列番号 1 6 9) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 7 0 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 1 7 0 の C D R 1 (配列番号 1 7 1)、C D R 2 (配列番号 1 7 2) および C D R 3 (配列番号 1 7 3) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

20

【0074】

あるいは、K D R に結合する第 2 の抗原結合部位は、配列番号 1 7 4 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 1 7 8 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 2 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 1 7 4 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 1 7 4 の C D R 1 (配列番号 1 7 5)、C D R 2 (配列番号 1 7 6) および C D R 3 (配列番号 1 7 7) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 7 8 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 1 7 8 の C D R 1 (配列番号 1 7 9)、C D R 2 (配列番号 1 8 0) および C D R 3 (配列番号 1 8 1) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

30

【0075】

あるいは、T N C に結合する第 2 の抗原結合部位は、配列番号 1 8 2 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 1 8 6 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 2 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 1 8 2 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 1 8 2 の C D R 1 (配列番号 1 8 3)、C D R 2 (配列番号 1 8 4) および C D R 3 (配列番号 1 8 5) 配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 1 8 6 と少なくとも 9 0 % (例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %) 同一であってもよい、ならびに／または配列番号 1 8 6 の C D R 1 (配列番号 1 8 7)、C D R 2 (配列番号 1 8 8) および C D R 3 (配列番号 1 8 9) 配列と同一のアミノ酸配列

40

50

が組み込まれていてもよい。

【0076】

あるいは、TNCに結合する第2の抗原結合部位は、配列番号190に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号194に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号190と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号190のCDR1（配列番号191）、CDR2（配列番号192）およびCDR3（配列番号193）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号194と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号194のCDR1（配列番号195）、CDR2（配列番号196）およびCDR3（配列番号197）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

10

【0077】

あるいは、CSPG4に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号198に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号202に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号198と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号198のCDR1（配列番号199）、CDR2（配列番号200）およびCDR3（配列番号201）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号202と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号202のCDR1（配列番号203）、CDR2（配列番号204）およびCDR3（配列番号205）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

20

【0078】

あるいは、CSPG4に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号206に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号210に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号206と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号206のCDR1（配列番号207）、CDR2（配列番号208）およびCDR3（配列番号209）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号210と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号210のCDR1（配列番号211）、CDR2（配列番号212）およびCDR3（配列番号213）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

30

40

【0079】

あるいは、BST1に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号214に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号218に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号214と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号214のCDR1（配列番号215）、CDR2（配列番号216）およびCDR3（配列番号217）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号218と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）

50

同一であってもよい、ならびに／または配列番号 2 1 8 の C D R 1（配列番号 2 1 9）、C D R 2（配列番号 2 2 0）および C D R 3（配列番号 2 2 1）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0080】

あるいは、B S T 1 に結合する第 2 の抗原結合部位は、配列番号 2 2 2 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 2 2 6 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 2 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 2 2 2 と少なくとも 9 0 %（例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 2 2 2 の C D R 1（配列番号 2 2 3）、C D R 2（配列番号 2 2 4）および C D R 3（配列番号 2 2 5）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 2 2 6 と少なくとも 9 0 %（例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 2 2 6 の C D R 1（配列番号 2 2 7）、C D R 2（配列番号 2 2 8）および C D R 3（配列番号 2 2 9）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0081】

あるいは、S E L P に結合する第 2 の抗原結合部位は、配列番号 2 3 0 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 2 3 4 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 2 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 2 3 0 と少なくとも 9 0 %（例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 2 3 0 の C D R 1（配列番号 2 3 1）、C D R 2（配列番号 2 3 2）および C D R 3（配列番号 2 3 3）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 2 3 4 と少なくとも 9 0 %（例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 2 3 4 の C D R 1（配列番号 2 3 5）、C D R 2（配列番号 2 3 6）および C D R 3（配列番号 2 3 7）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0082】

あるいは、S E L P に結合する第 2 の抗原結合部位は、配列番号 2 3 8 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 2 4 2 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 2 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 2 3 8 と少なくとも 9 0 %（例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 2 3 8 の C D R 1（配列番号 2 3 9）、C D R 2（配列番号 2 4 0）および C D R 3（配列番号 2 4 1）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 2 4 2 と少なくとも 9 0 %（例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 2 4 2 の C D R 1（配列番号 2 4 3）、C D R 2（配列番号 2 4 4）および C D R 3（配列番号 2 4 5）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0083】

あるいは、C D 2 0 0 に結合する第 2 の抗原結合部位は、配列番号 2 4 6 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 2 5 0 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第 2 の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 2 4 6 と少なくとも 9 0 %（例えば、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 %）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 2 4 6 の C D R 1（配列番号 2 4 7）、C D R 2（配列番号 2 4 8）および C D R 3（配列番号 2 4 9）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第 2 の抗原結合

部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 250 と少なくとも 90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 250 の CDR1（配列番号 251）、CDR2（配列番号 252）および CDR3（配列番号 253）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0084】

あるいは、INSR（HHF5）に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号 254 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 258 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 254 と少なくとも 90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 254 の CDR1（配列番号 255）、CDR2（配列番号 256）および CDR3（配列番号 257）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 258 と少なくとも 90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 258 の CDR1（配列番号 259）、CDR2（配列番号 260）および CDR3（配列番号 261）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0085】

あるいは、INSR（HHF5）に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号 262 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 266 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 262 と少なくとも 90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 262 の CDR1（配列番号 263）、CDR2（配列番号 264）および CDR3（配列番号 265）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 266 と少なくとも 90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 266 の CDR1（配列番号 267）、CDR2（配列番号 268）および CDR3（配列番号 269）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0086】

あるいは、ITGA6 に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号 270 に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号 274 に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号 270 と少なくとも 90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 270 の CDR1（配列番号 271）、CDR2（配列番号 272）および CDR3（配列番号 273）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号 274 と少なくとも 90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 274 の CDR1（配列番号 275）、CDR2（配列番号 276）および CDR3（配列番号 277）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0087】

あるいは、ITGA6 に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号 278 のアミノ酸配列と同一の CDR1 配列、配列番号 279 のアミノ酸配列と同一の CDR2 配列および配列番号 280 のアミノ酸配列と同一の CDR3 配列を含む重鎖可変ドメイン配列；ならびに配列番号 281 のアミノ酸配列と同一の CDR1 配列、配列番号 282 のアミノ酸配列と同一の CDR2 配列および配列番号 283 のアミノ酸配列と同一の CDR3 配列を含む

軽鎖可変ドメイン配列が組み込まれていてもよい。

【0088】

あるいは、MELTFに結合する第2の抗原結合部位は、配列番号284に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号288に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号284と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号284のCDR1（配列番号285）、CDR2（配列番号286）およびCDR3（配列番号287）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号288と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号288のCDR1（配列番号289）、CDR2（配列番号290）およびCDR3（配列番号291）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

10

【0089】

あるいは、MELTFに結合する第2の抗原結合部位は、配列番号292に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号296に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号292と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号292のCDR1（配列番号293）、CDR2（配列番号294）およびCDR3（配列番号295）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号296と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号296のCDR1（配列番号297）、CDR2（配列番号298）およびCDR3（配列番号299）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

20

【0090】

あるいは、SLC1A5に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号300に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号304に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号300と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号300のCDR1（配列番号301）、CDR2（配列番号302）およびCDR3（配列番号303）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号304と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号304のCDR1（配列番号305）、CDR2（配列番号306）およびCDR3（配列番号307）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

30

40

【0091】

あるいは、SLC1A5に結合する第2の抗原結合部位は、配列番号308に関連する重鎖可変ドメインおよび配列番号312に関連する軽鎖可変ドメインが組み込まれていてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号308と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号308のCDR1（配列番号309）、CDR2（配列番号310）およびCDR3（配列番号311）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号312と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号312のCDR1（配列番号313）、CDR2（配列番号314）およびCDR3（配列番号315）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

50

%）同一であってもよい、ならびに／または配列番号 3 1 2 の C D R 1（配列番号 3 1 3）、C D R 2（配列番号 3 1 4）および C D R 3（配列番号 3 1 5）配列と同一のアミノ酸配列が組み込まれていてもよい。

【0092】

一部の実施形態では、第 2 のおよび／または追加の抗原結合部位は、第 1 の抗原結合部位に存在する軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインが組み込まれる。

【0093】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、C D 1 6 に結合するのに十分な抗体 F c ドメインの部分を組み込み、抗体 F c ドメインは、ヒンジおよび C H 2 ドメイン、ならびに／またはヒト I g G 抗体のアミノ酸配列 2 3 4～3 3 2 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む。変異を抗体定常ドメインに導入して、別の抗体定常ドメインとのヘテロ二量体化を可能にすることができる。例えば、抗体定常ドメインがヒト I g G 1 の定常ドメインに由来する場合、抗体定常ドメインは、ヒト I g G 1 抗体のアミノ酸 2 3 4～3 3 2 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含むことができ、Q 3 4 7、Y 3 4 9、L 3 5 1、Q 3 5 2、S 3 5 4、E 3 5 6、E 3 5 7、K 3 6 0、Q 3 6 2、S 3 6 4、T 3 6 6、L 3 6 8、K 3 7 0、N 3 9 0、K 3 9 2、T 3 9 4、D 3 9 9、S 4 0 0、D 4 0 1、F 4 0 5、Y 4 0 7、K 4 0 9、T 4 1 1 および K 4 3 9 からなる群から選択される 1 つまたは複数の位置で異なり、アミノ酸位置が E U ナンバリングに従って番号付けされる。

【0094】

一部の実施形態では、抗体定常ドメインは、ヒト I g G 1 抗体のアミノ酸 2 3 4～3 3 2 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含むことができ、Q 3 4 7 E、Q 3 4 7 R、Y 3 4 9 S、Y 3 4 9 K、Y 3 4 9 T、Y 3 4 9 D、Y 3 4 9 E、Y 3 4 9 C、L 3 5 1 K、L 3 5 1 D、L 3 5 1 Y、Q 3 5 2 E、S 3 5 4 C、E 3 5 6 K、E 3 5 7 Q、E 3 5 7 L、E 3 5 7 W、K 3 6 0 E、K 3 6 0 W、Q 3 6 2 E、S 3 6 4 K、S 3 6 4 E、S 3 6 4 H、S 3 6 4 D、T 3 6 6 V、T 3 6 6 I、T 3 6 6 L、T 3 6 6 M、T 3 6 6 K、T 3 6 6 W、T 3 6 6 S、L 3 6 8 E、L 3 6 8 A、L 3 6 8 D、K 3 7 0 S、N 3 9 0 D、N 3 9 0 E、K 3 9 2 L、K 3 9 2 M、K 3 9 2 V、K 3 9 2 F、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、T 3 9 4 F、D 3 9 9 R、D 3 9 9 K、D 3 9 9 V、S 4 0 0 K、S 4 0 0 R、D 4 0 1 K、F 4 0 5 A、F 4 0 5 T、Y 4 0 7 A、Y 4 0 7 I、Y 4 0 7 V、K 4 0 9 F、K 4 0 9 W、K 4 0 9 D、T 4 1 1 D、T 4 1 1 E、K 4 3 9 D および K 4 3 9 E からなる群から選択される 1 つまたは複数の置換によって異なり、アミノ酸位置が E U ナンバリングに従って番号付けされる。

【0095】

本明細書に記載されるタンパク質のいずれか 1 つを含有する製剤；タンパク質を発現する 1 つまたは複数の核酸を含有する細胞；およびタンパク質を使用して腫瘍細胞死を増強する方法も提供される。

【0096】

本発明の別の態様は、患者のがんを処置する方法を提供する。本方法は、投与を必要とする患者に、治療有効量の本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。多重特異性結合タンパク質を使用して処置される例示的ながんとしては、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、神経膠芽腫、頭頸部がん、肺がん、肝臓がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、肉腫、腎がん、結腸直腸がん、胃がん、神経芽細胞腫、扁平上皮癌および急性骨髄性白血病（A M L）が挙げられる。

【図面の簡単な説明】

【0097】

【図 1】図 1 は、多重特異性結合タンパク質、例えば、三重特異性結合タンパク質（T r i N K E T）の例示的なフォーマットを示す図である。各アームは、N K G 2 D 結合ドメインまたは B 7 - H 3 結合ドメインのいずれかを表すことができる。一部の実施形態では

、NK G 2 D 結合ドメインおよびB 7-H 3 結合ドメインは共通の軽鎖を共有することができる。

【0098】

【図2-1】図2A~2Eは、多重特異性結合タンパク質、例えば、三重特異性結合タンパク質 (T r i N K E T) の5つの例示的なフォーマットを示す図である。図2Aに示されるように、NK G 2 D 標的化 s c F v、B 7-H 3 標的化 F a b 断片、およびヘテロ二量体化抗体定常領域を含有する抗体は、本明細書ではF 3-T r i N K E T と呼ばれる。図2Bに示されるように、B 7-H 3 標的化 s c F v、NK G 2 D 標的化 F a b 断片、およびC D 1 6 に結合するヘテロ二量体化抗体定常領域／ドメインを含有する抗体は、本明細書ではF 3'-T r i N K E T と呼ばれる。図2Cに示されるように、NK G 2 D 結合ドメインとB 7-H 3 結合ドメインの両方が s c F v フォーマットをとることができる。図2D~2Eは、B 7-H 3 に結合する2つの抗原結合部位およびヘテロ二量体化抗体定常領域に融合したNK G 2 D 結合部位を含む3つの抗原結合部位を有する抗体の図である。これらの抗体フォーマットは、本明細書ではF 4-T r i N K E T と呼ばれる。図2Dは、2つのB 7-H 3 結合部位が F a b フォーマットであり、NK G 2 D 結合部位が s c F v フォーマットであることを示しており、本明細書ではF 4-T r i N K E T と呼ばれる。図2Eは、B 7-H 3 結合部位が s c F v フォーマットであり、NK G 2 D 結合部位が s c F v フォーマットであることを示している。ある特定の例示的な多重特異性結合タンパク質では、抗体定常領域上のヘテロ二量体化変異が、一方の定常ドメイン (「C D ドメイン」) 上のK 3 6 0 E およびK 4 0 9 W ; ならびに反対の位置の定常ドメイン上のQ 3 4 7 R、D 3 9 9 V およびF 4 0 5 T を含む (C D ドメイン中に三角形の鍵と鍵穴の形状として示される)。F a b 断片の重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとの間の太い棒はジスルフィド結合を表す。

【図2-2】同上。

【0099】

【図3】図3は、E L I S A アッセイにおけるヒト組換えNK G 2 D に対するNK G 2 D 結合ドメイン (クローンとして列挙) の結合親和性を示す線グラフである。

【0100】

【図4】図4は、E L I S A アッセイにおけるカニクイザル組換えNK G 2 D に対するNK G 2 D 結合ドメイン (クローンとして列挙) の結合親和性を示す線グラフである。

【0101】

【図5】図5は、E L I S A アッセイにおけるマウス組換えNK G 2 D に対するNK G 2 D 結合ドメイン (クローンとして列挙) の結合親和性を示す線グラフである。

【0102】

【図6】図6は、バックグラウンドに対する平均蛍光強度 (M F I) 倍率 (F O B) を示す、フローサイトメトリーによるヒトNK G 2 D を発現しているE L 4 細胞に対するNK G 2 D 結合ドメイン (クローンとして列挙) の結合を示す棒グラフである。

【0103】

【図7】図7は、バックグラウンドに対する平均蛍光強度 (M F I) 倍率 (F O B) を示す、フローサイトメトリーによるマウスNK G 2 D を発現しているE L 4 細胞に対するNK G 2 D 結合ドメイン (クローンとして列挙) の結合を示す棒グラフである。

【0104】

【図8】図8は、天然リガンドU L B P-6 と競合することによる、組換えヒトNK G 2 D-F c に対するNK G 2 D 結合ドメイン (クローンとして列挙) の特異的結合親和性を示す線グラフである。

【0105】

【図9】図9は、天然リガンドM I C A と競合することによる、組換えヒトNK G 2 D-F c に対するNK G 2 D 結合ドメイン (クローンとして列挙) の特異的結合親和性を示す線グラフである。

【0106】

10

20

30

40

50

【図10】図10は、天然リガンドRa e-1デルタと競合することによる、組換えマウスNK G2 D-F cに対するNK G2 D結合ドメイン（クローンとして列挙）の特異的結合親和性を示す線グラフである。

【0107】

【図11】図11は、ヒトNK G2 D-CD3ゼータ融合タンパク質を発現するTNF- α 陽性細胞のパーセンテージを定量することにより、NK G2 D結合ドメイン（クローンとして列挙）によるヒトNK G2 Dの活性化を示す棒グラフである。

【0108】

【図12】図12は、マウスNK G2 D-CD3ゼータ融合タンパク質を発現するTNF- α 陽性細胞のパーセンテージを定量することにより、NK G2 D結合ドメイン（クローンとして列挙）によるマウスNK G2 Dの活性化を示す棒グラフである。

10

【0109】

【図13】図13は、NK G2 D結合ドメイン（クローンとして列挙）によるヒトNK細胞の活性化を示す棒グラフである。

【0110】

【図14】図14は、NK G2 D結合ドメイン（クローンとして列挙）によるヒトNK細胞の活性化を示す棒グラフである。

【0111】

【図15】図15は、NK G2 D結合ドメイン（クローンとして列挙）によるマウスNK細胞の活性化を示す棒グラフである。

20

【0112】

【図16】図16は、NK G2 D結合ドメイン（クローンとして列挙）によるマウスNK細胞の活性化を示す棒グラフである。

【0113】

【図17】図17は、腫瘍細胞に対するNK G2 D結合ドメイン（クローンとして列挙）の細胞傷害性効果を示す棒グラフである。

【0114】

【図18】図18は、示差走査蛍光定量法によって測定されたNK G2 D結合ドメイン（クローンとして列挙）の融解温度を示す棒グラフである。

【0115】

【図19】図19A～19Cは、CD16およびNK G2 D結合を使用したNK細胞の相乗的活性化の棒グラフである。図19AはCD107aのレベルを示し；図19BはIFN- γ のレベルを示し；図19CはCD107aとIFN- γ のレベルを示している。グラフは平均（n=2） $\pm$ SDを示している。データは、5人の異なる健康なドナーを使用した5つの独立した実験を表す。

30

【0116】

【図20】図20は、IgG様形状を維持する三機能性二重特異性抗体であるTriomab形態のTriNKETを表す図である。このキメラは、2つの親抗体に由来する、それぞれ1つの軽鎖および1つの重鎖を有する2つの半抗体からなる。Triomab形態は、ラット抗体の1/2およびマウス抗体の1/2を含有するヘテロ二量体構築物であり得る。

40

【0117】

【図21】図21は、ノブイントゥホール（knobs-into-holes）（KiH）技術を伴う、KiH Common Light Chain形態のTriNKETを表す図である。KiHは、標的1および2に結合する2つのFab断片、ならびにヘテロ二量体化変異によって安定化されたFcを含有するヘテロ二量体である。KiHフォーマットのTriNKETは、2つの異なる重鎖および両重鎖と対形成する共通の軽鎖を含有する、標的1および標的2に結合する2つのFab断片を有するヘテロ二量体構築物であり得る。

【0118】

50

【図 2 2】図 2 2 は、天然に存在するフレキシブルリンカーを介して 2 つのモノクローナル抗体の標的結合ドメインを組み合わせて、四価 I g G 様分子をもたらす、二重可変ドメイン免疫グロブリン (D V D - I g (商標)) 形態の T r i N K E T を表す図である。D V D - I g (商標) は、抗原 2 を標的化する可変ドメインが抗原 1 を標的化する F a b 断片の可変ドメインの N 末端に融合しているホモ二量体構築物である。構築物は通常の F c を含有する。

【0 1 1 9】

【図 2 3】図 2 3 は、F c に融合した、標的 1 および標的 2 に結合する 2 つの F a b 断片を含有するヘテロ二量体構築物である、直交 F a b 断片界面 (O r t h o - F a b) 形態の T r i N K E T を表す図である。軽鎖 (L C) - 重鎖 (H C) 対形成は直交界面によって確保される。ヘテロ二量体化は F c 中の変異によって確保される。

10

【0 1 2 0】

【図 2 4】図 2 4 は、2 - i n - 1 I g フォーマットの T r i N K E T を表す図である。

【0 1 2 1】

【図 2 5】図 2 5 は、F c に融合した、標的 1 および標的 2 に結合する 2 つの異なる F a b 断片を含有するヘテロ二量体構築物である、E S 形態の T r i N K E T を表す図である。ヘテロ二量体化は F c 中の静電ステアリング変異によって確保される。

【0 1 2 2】

【図 2 6】図 2 6 は、F a b アーム交換形態における T r i N K E T を表す図である：重鎖および結合した軽鎖 (半分子) を別の分子からの重鎖 - 軽鎖ペアと交換することにより F a b 断片アームを交換する抗体は、二重特異性抗体をもたらす。F a b アーム交換形態 (c F a e) は、標的 1 および 2 に結合する 2 つの F a b 断片、ならびにヘテロ二量体化変異によって安定化された F c を含有するヘテロ二量体である。

20

【0 1 2 3】

【図 2 7】図 2 7 は、標的 1 および 2 に結合する 2 つの F a b 断片、ならびにヘテロ二量体化変異によって安定化された F c を含有するヘテロ二量体である、S E E D ボディ形態 (S E E D B o d y f o r m) の T r i N K E T を表す図である。

【0 1 2 4】

【図 2 8】図 2 8 は、2 つの異なる H C のヘテロ二量体化を誘導するためにロイシンジッパーが使用される、L u Z - Y 形態の T r i N K E T を表す図である。L u Z - Y 形態は、F c に融合した、標的 1 および 2 に結合する 2 つの異なる s c F a b を含有するヘテロ二量体である。ヘテロ二量体化は、F c の C 末端に融合したロイシンジッパーモチーフによって確保される。

30

【0 1 2 5】

【図 2 9】図 2 9 は、C o v - X ボディ形態の T r i N K E T を表す図である。

【0 1 2 6】

【図 3 0】図 3 0 A ~ 3 0 B は、抗原 1 を標的化する 1 つの F a b 断片がカッパ L C を含有し、抗原 2 を標的化する第 2 の F a b がラムダ L C を含有する、ヘテロ二量体化変異によって安定化された F c に融合した 2 つの異なる F a b 断片を有するヘテロ二量体構築物である、κ λ ボディ形態の T r i N K E T を表す図である。図 3 0 A は κ λ ボディの一形態の例示的な図であり；図 3 0 B は別の κ λ ボディの例示的な図である。

40

【0 1 2 7】

【図 3 1】図 3 1 は、共に F c ドメインに融合している、標的 1 に結合する F a b 断片および標的 2 に結合する s c F a b を含む、O a s c - F a b ヘテロ二量体構築物を表す図である。ヘテロ二量体化は、F c ドメイン中の変異によって確保される。

【0 1 2 8】

【図 3 2】図 3 2 は、抗原 1 および 2 に結合する 2 つの異なる F a b 断片、ならびにヘテロ二量体化変異によって安定化されている F c を含有するヘテロ二量体構築物である、D u e t M a b を表す図である。F a b 断片 1 および 2 は、正しい軽鎖および重鎖の対形成

50

を確保する示差的 S-S 架橋を含有する。

【0129】

【図33】図33は、標的1および2に結合する2つの異なる Fab 断片、ならびにヘテロ二量体化変異によって安定化された Fc を有するヘテロ二量体構築物である、Cross mAb を表す図である。CL および CH1 ドメイン、ならびに VH および VL ドメインが切り替えられ、例えば、CH1 が VL とインラインで融合しており、CL が VH とインラインで融合している。

【0130】

【図34】図34は、抗原2に結合する Fab 断片が、抗原1に結合する Fab 断片の HC の N 末端に融合しているホモ二量体構築物である、Fit-Ig を表す図である。構築物は野生型 Fc を含有する。

10

【0131】

【図35】図35は、B7-H3 発現ヒトがん細胞系 (A) 786-O、(B) BT-474 および (C) HCC1954 への B7-H3 標的化 Tr iNK E T およびその親モノクローナル抗体の結合を示す線グラフである。

【0132】

【図36】図36は、特異的溶解%を測定するための DELFIA 細胞傷害性アッセイによって測定されるように、Tr iNK E T が親 mAb よりも B7-H3 発現がん細胞の NK 細胞媒介溶解を増強することを示す棒グラフである。

【0133】

20

【図37】図37A~37Bは、特異的溶解パーセントを測定するための DELFIA 細胞傷害性アッセイによって測定される、B7-H3 Tr iNK E T および親モノクローナル抗体によって媒介される BT-474 (図37A) および HCC1954 (図37B) 標的細胞の KHYG-1 CD16V 細胞殺滅を示し、Tr iNK E T が親 mAb よりも強力であり (低い EC50)、高い最大溶解に到達することを示す線グラフである。

【0134】

【図38】図38A~38Bは、B7-H3 Tr iNK E T または親モノクローナル抗体の存在下での BT-474 (図38A) および 786-O (図38B) 細胞によるヒト NK 細胞の活性化を示す線グラフである。IFN γ および CD107a ダブルポジティブ NK 細胞のパーセンテージは、それぞれの親 mAb と比較して、10 μ g/ml の B7-H3 Tr iNK E T で処理した共培養物で高く、Tr iNK E T が親 mAb よりも NK 細胞を刺激することを示している。

30

【発明を実施するための形態】

【0135】

本発明は、ナチュラルキラー細胞上の NKGD2D 受容体および CD16 受容体、ならびに腫瘍関連抗原 B7-H3 に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、B7-H3 または別の腫瘍関連抗原に結合する追加の抗原結合部位をさらに含む。本発明はまた、このような多重特異性結合タンパク質を含む医薬組成物、ならびにがんを処置するなどの目的のために、このような多重特異性タンパク質および医薬組成物を使用する治療方法を提供する。本発明のさまざまな態様を以下の節で示すが、ある特定の節に記載される本発明の態様は、いずれの特定の節にも限定されるべきではない。

40

【0136】

本発明の理解を促進するために、いくつかの用語および句を以下で定義する。

【0137】

本明細書で使用される「a」および「an」という用語は「1つまたは複数」を意味し、文脈が不適切でない限り、複数形を含む。

【0138】

本明細書で使用される場合、「抗原結合部位」という用語は、抗原結合に参加する免疫グロブリン分子の部分を指す。ヒト抗体では、抗原結合部位は、重 (「H」) 鎖および軽

50

(「L」)鎖のN末端可変(「V」)領域のアミノ酸残基によって形成される。重鎖および軽鎖のV領域内の3つの高度に多様な範囲は「超可変領域」と呼ばれ、これらは「フレームワーク領域」または「FR」として公知のより保存された隣接範囲の間に挿入されている。よって、「FR」という用語は、免疫グロブリンの超可変領域の間におよびこれに隣接して天然に見出されるアミノ酸配列を指す。ヒト抗体分子では、軽鎖の3つの超可変領域および重鎖の3つの超可変領域が、抗原結合表面を形成するように三次元空間で互いに対して配置されている。抗原結合表面は、結合抗原の三次元表面と相補的であり、重鎖および軽鎖の各々の3つの超可変領域は「相補性決定領域」または「CDR」と呼ばれる。ラクダおよび軟骨魚類などのある特定の動物では、抗原結合部位が単一抗体鎖によって形成されて、「単一ドメイン抗体」をもたらす。抗原結合部位は、インタクト抗体、抗原結合表面を保持する抗体の抗原結合断片、または単一ポリペプチドで重鎖可変ドメインを軽鎖可変ドメインに接続するためのペプチドリinkerを使用したs c F vなどの組換えポリペプチドに存在することができる。

10

【0139】

本明細書で使用される「腫瘍関連抗原」という用語は、それだけに限らないが、がんに関連するタンパク質、糖タンパク質、ガングリオシド、炭水化物、脂質を含む任意の抗原を意味する。このような抗原は、悪性細胞上、または腫瘍関連血管、細胞外基質、間葉系間質もしくは免疫浸潤物などの腫瘍微小環境中で発現され得る。

【0140】

本明細書で使用される場合、「抗原結合部位」という用語は、抗原結合に参加する免疫グロブリン分子の部分の部分を指す。ヒト抗体では、抗原結合部位が、重(「H」)鎖および軽(「L」)鎖のN末端可変(「V」)領域のアミノ酸残基によって形成される。重鎖および軽鎖のV領域内の3つの高度に多様な範囲は「超可変領域」と呼ばれ、これらは「フレームワーク領域」または「FR」として公知のより保存された隣接範囲の間に挿入されている。よって、「FR」という用語は、免疫グロブリンの超可変領域の間におよびこれに隣接して天然に見出されるアミノ酸配列を指す。ヒト抗体分子では、軽鎖の3つの超可変領域および重鎖の3つの超可変領域が、抗原結合表面を形成するように三次元空間で互いに対して配置されている。抗原結合表面は、結合抗原の三次元表面と相補的であり、重鎖および軽鎖の各々の3つの超可変領域は「相補性決定領域」または「CDR」と呼ばれる。ラクダおよび軟骨魚類などのある特定の動物では、抗原結合部位が単一抗体鎖によって形成されて、「単一ドメイン抗体」をもたらす。抗原結合部位は、インタクト抗体、抗原結合表面を保持する抗体の抗原結合断片、または単一ポリペプチドで重鎖可変ドメインを軽鎖可変ドメインに接続するためのペプチドリinkerを使用したs c F vなどの組換えポリペプチドに存在することができる。本明細書に開示される重鎖可変領域または軽鎖可変領域中の全てのアミノ酸位置はK a b a tナンバリングに従って番号付けされる。

20

30

【0141】

抗原結合部位のCDRは、K a b a t et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977)およびK a b a t et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991)、Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)、およびMacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)に記載される方法によって決定することができる。これらの定義の下で決定されるCDRは、典型的には互いに対して比較すると、アミノ酸残基の重複またはサブセットを含む。ある特定の実施形態では、「CDR」という用語は、MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)およびMartin A., Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains, in Antibody Engineering, Kontermann and Dubel, eds., Chapter 31, pp. 422-439, Springe

40

50

r-Verlag, Berlin (2001) によって定義されるCDRである。ある特定の実施形態では、「CDR」という用語は、Kabata et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) および Kabata et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991) によって定義されるCDRである。ある特定の実施形態では、抗体の重鎖CDRおよび軽鎖CDRは、種々の規則 (different convention) を使用して定義される。例えば、ある特定の実施形態では、重鎖CDRはMacCallum (上記) に従って定義され、軽鎖CDRはKabata (上記) に従って定義される。CDRH1、CDRH2およびCDRH3は重鎖CDRを表し、CDRL1、CDRL2およびCDRL3は軽鎖CDRを表す。

10

【0142】

本明細書で使用される場合、「対象」および「患者」という用語は、本明細書に記載される方法および組成物によって処置される生物を指す。このような生物には、好ましくは、それだけに限らないが、哺乳動物 (例えば、マウス、類人猿、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど) が含まれ、より好ましくは、ヒトが含まれる。

【0143】

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な化合物 (例えば、本発明の化合物) の量を指す。有効量は、1回または複数回の投与、塗布または投与量で投与することができ、特定の製剤に限定されることも、投与経路に限定されることも意図していない。本明細書で使用される場合、「処置する」という用語は、状態、疾患、障害などの改善をもたらす、任意の効果、例えば軽減すること、減少させること、モジュレートすること、改善することもしくは排除すること、またはその症状を改善することを含む。

20

【0144】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、活性剤と、組成物を *in vivo* または *ex vivo* での診断的または治療的使用に特に適したものに、不活性または活性の担体の組合せを指す。

【0145】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、リン酸緩衝食塩溶液、水、エマルジョン (例えば、油/水型もしくは水/油型エマルジョンなど)、およびさまざまな種類の湿潤剤などの標準的な医薬担体のいずれかを指す。組成物はまた、安定剤および保存剤を含むことができる。担体、安定剤およびアジュバントの例については、例えば、Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA [1975] を参照されたい。

30

【0146】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される塩」という用語は、対象に投与すると、本発明の化合物またはその活性代謝産物もしくは残基を提供することができる、本発明の化合物の任意の薬学的に許容される塩 (例えば、酸または塩基) を指す。当業者に公知のように、本発明の化合物の「塩」は、無機酸または有機酸および無機塩基または有機塩基から得られ得る。例示的な酸としては、それだけに限らないが、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ベンゼンスルホン酸などが挙げられる。シュウ酸などの他の酸も、それ自体は薬学的に許容されないが、本発明の化合物およびその薬学的に許容される酸付加塩を得る際の間mediateとして有用な塩の調製に使用され得る。

40

【0147】

例示的な塩基としては、それだけに限らないが、アルカリ金属 (例えば、ナトリウム) 水酸化物、アルカリ土類金属 (例えば、マグネシウム) 水酸化物、アンモニア、および式

50

NW_4^+ (式中、Wは $C_1 \sim 4$ アルキルである) の化合物などが挙げられる。

【0148】

例示的な塩としては、それだけに限らないが、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、樟脳酸塩、カンファースルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、フルコヘプタン酸塩 (flucoheptanoate)、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パモ酸塩 (palmoate)、ペクチン酸塩、過硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシル酸塩、ウンデカン酸塩などが挙げられる。塩の他の例としては、 Na^+ 、 NH_4^+ および NW_4^+ (式中、Wは $C_1 \sim 4$ アルキル基である) 等などの適切なカチオンと複合した本発明の化合物のアニオンが挙げられる。

10

【0149】

治療的使用については、本発明の化合物の塩が、薬学的に許容されるとして企図される。しかしながら、薬学的に許容されない酸および塩基の塩も、例えば、薬学的に許容される化合物の調製または精製において用途を見出し得る。

【0150】

本明細書を通して、組成物が特定の成分を有する、含む (including) もしくは含む (comprising) と記載されている場合、またはプロセスおよび方法が特定のステップを有する、含む (including) もしくは含む (comprising) と記載されている場合、さらに、列挙される成分から本質的になるまたはそれからなる本発明の組成物が存在すること、ならびに列挙される処理ステップから本質的になるまたはそれからなる本発明によるプロセスおよび方法が存在することが企図される。

20

【0151】

一般に、パーセンテージを指定する組成物は、特に指定しない限り、重量による。さらに、変数が定義を伴わない場合、変数の前の定義が支配する。

I. タンパク質

【0152】

一態様では、本発明は、ナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体およびCD16受容体、ならびに腫瘍関連抗原B7-H3に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。多重特異性結合タンパク質は、本明細書に記載される医薬組成物および治療方法に有用である。ナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体およびCD16受容体への多重特異性結合タンパク質の結合によって、B7-H3を発現する腫瘍細胞の破壊に向けたナチュラルキラー細胞の活性が増強される。B7-H3発現細胞への多重特異性結合タンパク質の結合によって、がん細胞をナチュラルキラー細胞に近づけ、ナチュラルキラー細胞によるがん細胞の直接的および間接的破壊が促進される。一部の例示的な多重特異性結合タンパク質のさらなる説明を以下で提供する。

30

【0153】

別の態様では、本発明は、ナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体およびCD16受容体、ならびに腫瘍関連抗原L1CAMに結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。多重特異性結合タンパク質は、本明細書に記載される医薬組成物および治療方法に有用である。ナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体およびCD16受容体への多重特異性結合タンパク質の結合によって、L1CAMを発現する腫瘍細胞の破壊に向けたナチュラルキラー細胞の活性が増強される。L1CAM発現細胞への多重特異性結合タンパク質の結合によって、がん細胞をナチュラルキラー細胞に近づけ、ナチュラルキラー細胞によるがん細胞の直接的および間接的破壊が促進される。

40

【0154】

さらに別の態様では、本発明は、ナチュラルキラー細胞上のNKG2D受容体およびC

50

D16受容体、ならびにFLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5からなる群から選択される腫瘍関連抗原に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。多重特異性結合タンパク質は、本明細書に記載される医薬組成物および治療方法に有用である。ナチュラルキラー細胞上のNKGD受容体およびCD16受容体への多重特異性結合タンパク質の結合によって、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5を発現する腫瘍細胞の破壊に向けたナチュラルキラー細胞の活性が増強される。FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5発現細胞への多重特異性結合タンパク質の結合によって、がん細胞をナチュラルキラー細胞に近づけ、ナチュラルキラー細胞によるがん細胞の直接的および間接的破壊が促進される。

10

【0155】

多重特異性結合タンパク質の第1の成分はNKGD受容体発現細胞に結合し、該細胞は、それだけに限らないが、NK細胞、 $\gamma\delta$ T細胞およびCD8⁺ $\alpha\beta$ T細胞を含み得る。NKGDに結合すると、多重特異性結合タンパク質は、ULBP6およびMICAなどの天然リガンドがNKGDに結合してNK細胞を活性化するのを遮断し得る。

【0156】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質の第2の成分はB7-H3に結合する。B7-H3発現細胞は、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、神経膠芽腫、頭頸部がん、肺がん、肝臓がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、肉腫、腎がん、結腸直腸がん、胃がん、神経芽細胞腫、扁平上皮癌および急性骨髄性白血病(AML)で見出され得る。

20

【0157】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質の第2の成分はL1CAMに結合する。L1CAM発現細胞は、膀胱がん、腎がん、乳がん、子宮頸がん、肉腫、肺がん、頭頸部がん、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、黒色腫、卵巣がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、消化管間質腫瘍(GIST)、胆管癌、結腸直腸がん、膵臓がんおよび前立腺がんで見出され得る。

30

【0158】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質の第2の成分はFLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する。FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5発現細胞は、白血病、例えば急性骨髄性白血病およびT細胞白血病で見出され得る。

【0159】

多重特異性結合タンパク質の第3の成分は、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、肥満細胞および濾胞樹状細胞を含む白血球の表面上のFc受容体であるCD16を発現する細胞に結合する。

40

【0160】

本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質はさまざまなフォーマットをとることができる。例えば、1つのフォーマットは、第1の免疫グロブリン重鎖、第1の免疫グロブリン軽鎖、第2の免疫グロブリン重鎖および第2の免疫グロブリン軽鎖を含むヘテロ二量体多重特異性抗体である(図1)。第1の免疫グロブリン重鎖は、第1のFc(ヒンジ-CH2-CH3)ドメイン、第1の重鎖可変ドメインおよび必要に応じて、第1のCH1重鎖ドメインを含む。第1の免疫グロブリン軽鎖は、第1の軽鎖可変ドメインおよび必要に応じて、第1の軽鎖定常ドメインを含む。第1の免疫グロブリン軽鎖は、第1の免疫グロブリン重鎖と一緒にあって、NKGDに結合する抗原結合部位を形成する。第2の

50

免疫グロブリン重鎖は、第2のFc（ヒンジ-CH2-CH3）ドメイン、第2の重鎖可変ドメインおよび必要に応じて、第2のCH1重鎖ドメインを含む。第2の免疫グロブリン軽鎖は、第2の軽鎖可変ドメインおよび必要に応じて、第2の軽鎖定常ドメインを含む。第2の免疫グロブリン軽鎖は、第2の免疫グロブリン重鎖と一緒に、B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する抗原結合部位を形成する。第1のFcドメインおよび第2のFcドメインは一緒に、CD16に結合することができる（図1）。一部の実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖は第2の免疫グロブリン軽鎖と同一である。

【0161】

別の例示的なフォーマットは、第1の免疫グロブリン重鎖、第2の免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含むヘテロ二量体多重特異性抗体を伴う（図2Aおよび2B）。第1の免疫グロブリン重鎖は、リンカーまたは抗体ヒンジのいずれかを介して、対形成し、NKG2Dに結合する、またはB7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1もしくはSLC1A5抗原に結合する重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインで構成された一本鎖可変領域断片（scFv）に融合した第1のFc（ヒンジ-CH2-CH3）ドメインを含む。第2の免疫グロブリン重鎖は、第2のFc（ヒンジ-CH2-CH3）ドメイン、第2の重鎖可変ドメインおよびCH1重鎖ドメインを含む。免疫グロブリン軽鎖は、軽鎖可変ドメインおよび軽鎖定常ドメインを含む。第2の免疫グロブリン重鎖は免疫グロブリン軽鎖と対形成し、NKG2Dに結合する、または腫瘍関連抗原B7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1もしくはSLC1A5に結合する。第1のFcドメインおよび第2のFcドメインは一緒に、CD16に結合することができる（図2Aおよび2B）。

【0162】

別の例示的なフォーマットは、第1の免疫グロブリン重鎖および第2の免疫グロブリン重鎖を含むヘテロ二量体多重特異性抗体を伴う（図2C）。第1の免疫グロブリン重鎖は、リンカーまたは抗体ヒンジのいずれかを介して、対形成し、NKG2Dに結合する、またはB7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1もしくはSLC1A5抗原に結合する重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインで構成された一本鎖可変領域断片（scFv）に融合した第1のFc（ヒンジ-CH2-CH3）ドメインを含む。第2の免疫グロブリン重鎖は、リンカーまたは抗体ヒンジのいずれかを介して、対形成し、NKG2Dに結合する、またはB7-H3、L1CAM、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1もしくはSLC1A5に結合する重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインで構成された一本鎖可変領域断片（scFv）に融合した第2のFc（ヒンジ-CH2-CH3）ドメインを含む。第1のFcドメインおよび第2のFcドメインは一緒に、CD16に結合することができる（図2C）。

【0163】

一部の実施形態では、上記の一本鎖可変領域断片（scFv）はヒンジ配列を介して抗体定常ドメインに連結している。一部の実施形態では、ヒンジはアミノ酸Ala-Serを含む。一部の他の実施形態では、ヒンジはアミノ酸Ala-SerおよびThr-Lys-Glyを含む。ヒンジ配列は、標的抗原への結合の柔軟性を提供し、柔軟性と最適な形状寸法との間のバランスをとることができる。

【0164】

一部の実施形態では、上記の一本鎖可変領域断片（scFv）は重鎖可変ドメインおよ

10

20

30

40

50

び軽鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは軽鎖可変ドメインとジスルフィド架橋を形成して、s c F vの安定性を増強する。例えば、ジスルフィド架橋は、重鎖可変ドメインのC 4 4残基と軽鎖可変ドメインのC 1 0 0残基との間に形成され得、アミノ酸位置はK a b a tで番号付けされる。一部の実施形態では、重鎖可変ドメインはフレキシブルリンカーを介して軽鎖可変ドメインに連結している。任意の適切なリンカー、例えば、(G₄S)₄リンカーを使用することができる。s c F vの一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは軽鎖可変ドメインのN末端に位置する。s c F vの一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは軽鎖可変ドメインのC末端に位置する。

【0165】

本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質は、1つまたは複数の追加の抗原結合部位をさらに含むことができる。追加の抗原結合部位（複数可）は、必要に応じてリンカー配列を介して、定常領域C H 2ドメインのN末端または定常領域C H 3ドメインのC末端に融合し得る。ある特定の実施形態では、追加の抗原結合部位（複数可）は、必要に応じてジスルフィド安定化されている一本鎖可変領域断片（s c F v）の形態をとって、四価または三価多重特異性結合タンパク質をもたらす。例えば、多重特異性結合タンパク質は、N K G 2 D結合部位と、B 7-H 3、L 1 C A M、F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R（H H F 5）、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1またはS L C 1 A 5結合部位と、腫瘍関連抗原に結合する第3の抗原結合部位と、C D 1 6に結合するのに十分な抗体定常領域もしくはその部分、またはC D 1 6に結合する第4の抗原結合部位とを含む。これらの抗原結合部位のいずれか1つは、F a b断片またはs c F v、例えば上記のs c F vの形態をとることができる。一部の実施形態では、第3の抗原結合部位は、B 7-H 3、L 1 C A M、F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R（H H F 5）、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1またはS L C 1 A 5とは異なる腫瘍関連抗原に結合する。一部の実施形態では、第3の抗原結合部位は、B 7-H 3、L 1 C A M、F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R（H H F 5）、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1およびS L C 1 A 5から選択される同じ腫瘍関連抗原に結合する。一部の実施形態では、第3の抗原結合部位は、B 7-H 3、L 1 C A M、F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R（H H F 5）、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1およびS L C 1 A 5から選択される腫瘍関連抗原に結合する腫瘍関連抗原結合部位と同じアミノ酸配列（複数可）を有する。例示的なフォーマットを図2 Dおよび2 Eに示す。したがって、多重特異性結合タンパク質は、B 7-H 3、L 1 C A M、F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R（H H F 5）、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1またはS L C 1 A 5の二価の結合（b i v a l e n t e n g a g e m e n t）を提供することができる。多重特異性タンパク質によるB 7-H 3の二価の結合は、がん細胞表面上のB 7-H 3、L 1 C A M、F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R（H H F 5）、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1またはS L C 1 A 5を安定化し、がん細胞に対するNK細胞の細胞傷害性を増強することができる。多重特異性タンパク質によるB 7-H 3、L 1 C A M、F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R（H H F 5）、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1またはS L C 1 A 5の二価の結合は、がん細胞への多重特異性タンパク質のより強力な結合を付与し、それによって、がん細胞に対する、特に低レベルのB 7-H 3、L 1 C A M、F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R（H H F 5）、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1またはS L C 1 A 5を発現しているがん細胞に対するNK細胞のより強力な細胞傷害性応答を促進することができる。

【0166】

多重特異性結合タンパク質は、追加のフォーマットをとることができる。一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、I g G様形状を維持する三機能性二重特異性抗体

である、Triomab形態である。このキメラは、2つの親抗体に由来する、それぞれ1つの軽鎖および1つの重鎖を有する2つの半抗体からなる。

【0167】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質はKiH形態であり、ノブイントゥホール (KiH) 技術が関与する。KiHは、 C_H3 ドメインを操作して、各重鎖に「ノブ」または「ホール」のいずれかを作製して、ヘテロ二量体化を促進することを伴う。「ノブイントゥホール (KiH)」Fc技術の裏にある概念は、小さな残基を嵩高い残基で置換することにより (例えば、EUナンバリングのT366W $_{C_H3A}$)、「ノブ」を一方のCH3ドメイン (CH3A) に導入することであった。「ノブ」を収容するために、ノブに最も近い隣接残基を小さな残基で置き換えることにより (例えば、T366S/L368A/Y407V $_{C_H3B}$)、相補的な「ホール」面が他方のCH3ドメイン (CH3B) 上に作製された。「ホール」変異は、構造に指南されたファージライブラリークリーニングによって最適化された (Atwell S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library, J. Mol. Biol. (1997) 270 (1): 26-35)。KiH FcバリエーションのX線結晶構造 (Elliott JM, Ultsch M, Lee J, Tong R, Takeda K, Spiess C, et al., Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction. J. Mol. Biol. (2014) 426 (9): 1947-57; Mimoto F, Kadono S, Katada H, Igawa T, Kamikawa T, Hattori K. Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγRs. Mol. Immunol. (2014) 58 (1): 132-8) によって、ヘテロ二量体化が、CH3ドメイン間コア界面で立体相補性によって駆動される疎水性相互作用によって熱力学的に好まれる一方で、ノブ-ノブおよびホール-ホール界面は、それぞれ、立体障害および好ましい相互作用の破壊のためにホモ二量体化を好まないことが実証された。

【0168】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、天然に存在するフレキシブルリンカーを介して2つのモノクローナル抗体の標的結合ドメインを組み合わせて、四価IgG様分子をもたらす、二重可変ドメイン免疫グロブリン (DVD-Ig (商標)) 形態である。

【0169】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、直交Fab界面 (Ortho-Fab) 形態である。ortho-Fab IgG手法 (Lewis SM, Wu X, Pustilnik A, Sereno A, Huang F, Rick HL, et al., Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. Nat. Biotechnol. (2014) 32 (2): 191-8) では、構造に基づく領域設計が、他方のFab断片にいかなる変化も与えることなく、一方のFab断片のみにLCおよびHC $_{VH}-CH_1$ 界面での相補的変異を導入する。

【0170】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、2-in-1 Igフォーマットである。一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、Fcに融合した、標的1お

よび標的 2 に結合する 2 つの異なる F a b 断片を含有するヘテロ二量体構築物である、E S 形態である。ヘテロ二量体化は F c 中の静電ステアリング変異によって確保される。

【0171】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、抗原 1 を標的化する F a b 1 がカッパ L C を含有し、抗原 2 を標的化する第 2 の F a b がラムダ L C を含有する、ヘテロ二量体化変異によって安定化された F c に融合した 2 つの異なる F a b 断片を有するヘテロ二量体構築物である、κ λ ボディ形態である。図 30 A は κ λ ボディの一形態の例示的な図であり；図 30 B は別の κ λ ボディの例示的な図である。

【0172】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は F a b アーム交換形態である（重鎖および結合した軽鎖（半分子）を別の分子からの重鎖－軽鎖ペアと交換することにより F a b アームを交換する抗体は、二重特異性抗体をもたらす）。

【0173】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は S E E D ボディ形態である。鎖交換操作ドメイン（S E E D）プラットフォームは、天然抗体の治療用途を拡大する機能であり、非対称および二重特異性抗体様分子を生成するために設計された。このタンパク質操作プラットフォームは、保存された C H 3 ドメイン内の免疫グロブリンの構造的に関連する配列の交換に基づく。S E E D 設計は、A G および G A S E E D C H 3 ドメインのホモ二量体化を退ける一方で、A G / G A ヘテロ二量体の効率的な生成を可能にする（M u d a M. e t a l. , P r o t e i n E n g. D e s. S e l. (2011, 24 (5) : 447 – 54)）。

【0174】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は L u Z – Y 形態である、そこでは、2 つの異なる H C のヘテロ二量体化を誘導するためにロイシンジッパーが使用される（W r a n i k, B J. e t a l. , J. B i o l. C h e m. (2012), 287 : 43331 – 9）。

【0175】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は C o v – X ボディ形態である。二重特異性 C o v X ボディでは、2 つの異なるペプチドが分岐アゼチジノンリンカーを使用して結合されて、部位特異的に温和な条件下で足場抗体に融合されている。ファーマコフォアは機能的活性を担う一方、抗体足場は長い半減期および I g 様分布を与える。ファーマコフォアは、化学的に最適化することができる、または他のファーマコフォアで置き換えて、最適化されたもしくは特有の二重特異的抗体を生成することができる（D o p p a l a p u d i V R e t a l. , P N A S (2010), 107 (52) ; 22611 – 22616）。

【0176】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、F c に融合している、標的 1 に結合する F a b 断片および標的 2 に結合する s c F a b を含む、O a s c – F a b ヘテロ二量体形態である。ヘテロ二量体化は、F c 中の変異によって確保される。

【0177】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、抗原 1 および 2 に結合する 2 つの異なる F a b 断片、ならびにヘテロ二量体化変異によって安定化された F c を含有するヘテロ二量体構築物である、D u e t M a b 形態である。F a b 断片 1 および 2 は、正しい L C および H C の対形成を確保する示差的 S – S 架橋を含有する。

【0178】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、ヘテロ二量体化によって安定化された F c に融合した、標的 1 および 2 に結合する 2 つの異なる F a b 断片を有するヘテロ二量体構築物である、C r o s s m a b 形態である。C L および C H 1 ドメイン、ならびに V H および V L ドメインが切り替えられ、例えば、C H 1 が V L とインフレイムで融合しており、C L が V H とインフレイムで融合している。

10

20

30

40

50

【0179】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、抗原2に結合するFab断片が、抗原1に結合するFab断片のHCのN末端に融合しているホモ二量体構築物である、F i t - I g 形態である。構築物は野生型Fcを含有する。

【0180】

表1は、組み合わせて、NKGDに結合することができる、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのペプチド配列を列挙している。NKGD結合ドメインは、NKGDに対する結合親和性が異なり得るにもかかわらず、全てヒトNK細胞を活性化する。特に指示しない限り、表1に提供されるCDR配列はKababで決定される。

【表1-1】

10

表 1		
クローン	重鎖可変領域アミノ酸配列	軽鎖可変領域アミノ酸配列
ADI- 27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLLTV SS (配列番号 :1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYNSTPITFGGGTKVEIK (配列番号 :2)

20

【表 1 - 2】

	CDR1 (配列番号 :105) - GSFSGYYWS CDR2 (配列番号 :106) - EIDHSGSTNYPNPSLKS CDR3 (配列番号 :107) - ARARGPWSFDP	
ADI- 27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLLTV SS (配列番号 :3)	EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFS SGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGSSPITFGGGTKVEIK (配列番号 :4)
ADI- 27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLLTV SS (配列番号 :5)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYHSFYTFGGGTKVEIK (配列番号 :6)
ADI- 27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLLTV SS (配列番号 :7)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQSNSYYTFGGGTKVEIK (配列番号 :8)
ADI- 27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLLTV SS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDFFATY YCQQYNSYPTFGGGGTKVEIK (配列番号 :10)

10

20

30

40

【表 1 - 3】

	(配列番号 :9)	
ADI- 28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWGFDPWGQGTLLTV SS (配列番号 :11)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CRTSQSISSYLNWYQQKPGQP PKLLIYWASTRESGVPDRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDSATYY CQQSYDIPYTFGQGTKLEIK (配列番号 :12)
ADI- 28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLLTV SS (配列番号 :13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYGSFPITFGGGTKVEIK (配列番号 :14)
ADI- 28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLLTV SS (配列番号 :15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPDDEFATY YCQQSKEVPWTFGQGTKVEIK (配列番号 :16)
ADI- 29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLLTV SS (配列番号 :17)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYNSFPTFGGGTKVEIK (配列番号 :18)
ADI- 29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG

10

20

30

40

【表 1 - 4】

	YCARARGPWSFDPWGQGLVTV SS (配列番号 :19)	SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYDIYPTFGGGTKVEIK (配列番号 :20)
ADI- 29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGLVTV SS (配列番号 :21)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYDSYPTFGGGTKVEIK (配列番号 :22)
ADI- 29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGLVTV SS (配列番号 :23)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYGSFPTFGGGTKVEIK (配列番号 :24)
ADI- 29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGLVTV SS (配列番号 :25)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYQSFPFSGGGTKVEIK (配列番号 :26)
ADI- 29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGLVTV SS (配列番号 :27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYSSFSTFGGGTKVEIK (配列番号 :28)
ADI- 29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK

10

20

30

40

【表 1 - 5】

	WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLLTV SS (配列番号 :29)	APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYESYSTFGGGTKVEIK (配列番号 :30)
ADI- 29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLLTV SS (配列番号 :31)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYDSFITFGGGTKVEIK (配列番号 :32)
ADI- 29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLLTV SS (配列番号 :33)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYQSYPTFGGGTKVEIK (配列番号 :34)
ADI- 29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGTLLTV SS (配列番号 :35)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYHSFPTFGGGTKVEIK (配列番号 :36)
ADI- 29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRVTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY CARARGPWSFDPWGQGTLLTVSS (配列番号 :37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVIT CRASQSIGSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYELYSYTFGGGTKVEIK (配列番号 :38)

10

20

30

40

【表 1 - 6】

ADI- 29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGFSFGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYPNPSLKSRTVIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGLTVTV SS (配列番号 :39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCQQYDTFITFGGGTKVEIK (配列番号 :40)
ADI- 27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADESTSTAYMELSSLRSEDNAV YYCARGDSSIRHAYYYYGMDVW GQGTTVTVSS (配列番号 :41) CDR1 (配列番号 :43) - GTFSSYAIS (Kabatでない)または SYAIS (配列番号 :337) CDR2 (配列番号 :44) - GIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (配列番号 :45) - ARGDSSIRHAYYYYGMDV (Kabat でない)または GDSSIRHAYYYYGMDV (配列番号 :338)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQSVLYSSNNKNYLAWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESG VPDRFSGSGGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQQYYSTPITFGG GTKVEIK (配列番号 :42) CDR1 (配列番号 :46) - KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2 (配列番号 :47) - WASTRES CDR3 (配列番号 :48) - QQYYSTPIT
ADI- 29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTV SGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLE WIGSIYYSGSTYYNPSLKSRTVISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARGSDRFHPYFDYWGQGLTVT VSS (配列番号 :49) CDR1 (配列番号 :51) - GSISSSSYYWG (Kabatでない)または SSSYWG (配列番号 :339)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSRYLAWYQQKPGQ APRLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISLLEPEDFAVY YCQQFDTPPTFGGGTKVEIK (配列番号 :50) CDR1 (配列番号 :54) - RASQSVSRYLA CDR2 (配列番号 :55) - DASNRAT

10

20

30

40

【表 1 - 7】

	CDR2 (配列番号 :52) - SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (配列番号 :53) - ARGSDRFHPYFDY (Kabatでない)または GSDRFHPYFDY (配列番号 :340)	CDR3 (配列番号 :56) - QQFDTWPPT
ADI- 29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCA VYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEIDHSGSTNYNPSLKSRTIS VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVY YCARARGPWSFDPWGQGLTVTV SS (配列番号 :57)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTIT CRASQSISSWLAWYQQKPGK APKLLIYKASSLESGVPSRFSG SGSGTEFTLTISLQPDDEFATY YCEQYDSYPTFGGGGTKVEIK (配列番号 :58)
ADI- 28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC ASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTI TADSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARRGRKASGSFYFYYGMDV WGQGTTTVTVSS (配列番号 :59) CDR1 (配列番号 :127) - GTFSSYAIS CDR2 (配列番号 :128) - GIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (配列番号 :129) - ARRGRKASGSFYFYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATIN CESSQSLLNSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKPLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQNDYSYPYTFG QGKLEIK (配列番号 :60) CDR1 (配列番号 :130) - ESSQSLLNSGNQKNYLT CDR2 (配列番号 :131) - WASTRES CDR3 (配列番号 :132) - QNDYSYPYT
ADI- 29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYMHWRQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGAPNYGDTTHDYYY MDVWGKGTITVTVSS (配列番号 :61)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQYDDWPFTFGGGGTKVEI K (配列番号 :62)

10

20

30

40

【表 1 - 8】

	CDR1 (配列番号 :63) - YTFTSYMH (Kabatでない)または SYMH (配列番号 :341) CDR2 (配列番号 :64) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (配列番号 :65) - ARGAPNYGDTTHDYYYMDV (Kabatでない)または GAPNYGDTTHDYYYMDV (配列番号 :342)	CDR1 (配列番号 :66) - RASQSVSSNLA CDR2 (配列番号 :67) - GASTRAT CDR3 (配列番号 :68) - QQYDDWPFT	10
ADI- 29463 (F63)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTGYMHWRQAPGQG LEWMGWINPNSGGTNYAQKFQG RVTMTRDTSISTAYMELSLRSD DTAVYYCARDTGEYYDTDDHGM DVWGQGTTVTVSS (配列番号 :69) CDR1 (配列番号 :71) - YTFTGYMH (Kabatでない)または GYMH (配列番号 :343) CDR2 (配列番号 :72) - WINPNSGGTNYAQKFQG CDR3 (配列番号 :73) - ARDTGEYYDTDDHGMDV (Kabat でない)またはDTGEYYDTDDHGMDV (配列番号 :344)	EIVLTQSPGTLSPGERATLS CRASQSVSSNLAWYQQKPGQ APRLLIYGASTRATGIPARFSG SGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCQQDDYWPPTFGGGTKVEI K (配列番号 :70) CDR1 (配列番号 :74) - RASQSVSSNLA CDR2 (配列番号 :75) - GASTRAT CDR3 (配列番号 :76) - QQDDYWPPT	20
ADI- 27744 (A44)	EVQLLESGLLVQPGSLRLSCA ASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISGGSTYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKDGGYYDSGAGDYWGQG TLVTVSS (配列番号 :77)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVIT CRASQGIDSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGVSYPRTFGGGTKVEIK (配列番号 :78)	40

【表 1 - 9】

	CDR1 (配列番号 :79) - FTFSSYAMS (Kabatでない)または SYAMS (配列番号 :345) CDR2 (配列番号 :80) - AISGSGGSTYYADSVKG CDR3 (配列番号 :81) - AKDGGYYDSGAGDY (Kabatでない) または DGGYYDSGAGDY (配列番号 :346)	CDR1 (配列番号 :82) - RASQGIDSWLA CDR2 (配列番号 :83) - AASSLQS CDR3 (配列番号 :84) - QQGVSYPR
ADI- 27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGL WVSSISSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAPMGAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (配列番号 :85) CDR1 (配列番号 :87) - FTFSSYSMN (Kabatでない)または SYSMN (配列番号 :347) CDR2 (配列番号 :88) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 (配列番号 :89) - ARGAPMGAAAGWFDP (Kabatでない) または GAPMGAAAGWFDP (配列番号 :348)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (配列番号 :86) CDR1 (配列番号 :90) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号 :91) - AASSLQS CDR3 (配列番号 :92) - QQGVSPRT
ADI- 29378 (E78)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTFTSYMHWRQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAREGAGFAYGMDYYY MDVWGKGTTVTVSS (配列番号 :93)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWYQQKPGQ APRLIYDASNRATGIPARFSG SGSGTDFTLTISSLPEPDAFVY YCQQSDNWPFTFGGGTKVEIK (配列番号 :94) CDR1 (配列番号 :98) - RASQSVSSYLA

10

20

30

40

【表 1 - 1 0】

	CDR1 (配列番号 :95) - YTFTSYMH (Kabatでない)または SYMH (配列番号 :349) CDR2 (配列番号 :96) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (配列番号 :97) - AREGAGFAYGMDYYYMDV (Kabatでない)または EGAGFAYGMDYYYMDV (配列番号 :350)	CDR2 (配列番号 :99) - DASNRAT CDR3 (配列番号 :100) - QQSDNWPFT
A49MI	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAPIGAAAGWFDPWGQG TLVTVSS (配列番号 :351) CDR1: FTFSSYSMN (配列番号 :87)(Kabatでない)またはSYSMN (配列番号 :347) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (配列番号 :88) CDR3: (Kabatでない) ARGAPIGAAAGWFDP (配列番号 :354) または GAPIGAAAGWFDP (配列番号 :352)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (配列番号 :86) CDR1 (配列番号 :90) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号 :91) - AASSLQS CDR3 (配列番号 :92) - QQGVSPRT
A49MQ	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAPQGAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (配列番号 :353)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (配列番号 :86) CDR1 (配列番号 :90) - RASQGISSWLA

10

20

30

40

【表 1 - 1 1】

	CDR1: FTFSSYSMN (配列番号 :87)(Kabatでない)またはSYSMN (配列番号 :347) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (配列番号 :88) CDR3 (Kabatでない) (配列番号 :385) - ARGAPQGAAAGWFDP または CDR3 (配列番号 :355) - GAPQGAAAGWFDP	CDR2 (配列番号 :91) - AASSLQS CDR3 (配列番号 :92) - QQGVSPRT
A49ML	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAPLGAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (配列番号 :356) CDR1: FTFSSYSMN (配列番号 :87)(Kabatでない)またはSYSMN (配列番号 :347) CDR2: SISSSSYIYYADSVKG (配列番号 :88) CDR3 (Kabatでない) (配列番号 :357) - ARGAPLGAAAGWFDP または CDR3 (配列番号 :358) - GAPLGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (配列番号 :86) CDR1 (配列番号 :90) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号 :91) - AASSLQS CDR3 (配列番号 :92) - QQGVSPRT
A49MF	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WVSSISSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAPFGAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (配列番号 :359)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (配列番号 :86) CDR1 (配列番号 :90) - RASQGISSWLA

10

20

30

40

【表 1 - 1 2】

	CDR1: FTFSSYSMN (配列番号 :87)(Kabatでない)またはSYSMN (配列番号 :347) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (配列番号 :88) CDR3 (Kabatでない) (配列番号 :360) - ARGAPFGAAAGWFDP または CDR3 (配列番号 :361) - GAPFGAAAGWFDP	CDR2 (配列番号 :91) - AASSLQS CDR3 (配列番号 :92) - QQGVSPRT
A49MV	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WSSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAPVGAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS (配列番号 :362) CDR1: FTFSSYSMN (配列番号 :87)(Kabatでない)またはSYSMN (配列番号 :347) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (配列番号 :88) CDR3 (Kabatでない) (配列番号 :363) - ARGAPVGAAAGWFDP または CDR3 (配列番号 :364) - GAPVGAAAGWFDP	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (配列番号 :86) CDR1 (配列番号 :90) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号 :91) - AASSLQS CDR3 (配列番号 :92) - QQGVSPRT
A49- コンセンサス	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCA ASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE WSSSISSSSSYIYYADSVKGRFTIS RDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGAPXGAAAGWFDPWGQ GTLVTVSS, ここで、Xは M, L, I, V, Q,またはF である (配列番号 :365)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQGVSPRTFGGGTKVEIK (配列番号 :86) CDR1 (配列番号 :90) - RASQGISSWLA

10

20

30

40

【表 1 - 1 3】

	CDR1: FTFSSYSMN (配列番号 :87)(Kabatでない)または SYSMN (配列番号 :347) CDR2: SISSSSSYIYYADSVKG (配列番号 :88) CDR3 (Kabatでない) (配列番号 :366) - ARGAPXGAAAGWFDPまたはCDR3 (配列番号 :367) - GAPXGAAAGWFDP, ここで、Xは M, L, I, V, Q,またはFである	CDR2 (配列番号 :91) - AASSLQS CDR3 (配列番号 :92) - QQGVSPRT
--	--	---

10

【0181】

あるいは、US9, 273, 136に例示されるように、配列番号101によって表される重鎖可変ドメインを配列番号102によって表される軽鎖可変ドメインと対形成させて、NKGDに結合することができる抗原結合部位を形成することができる。

20

配列番号101

【化1】

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFI
 RYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGL
 GDGTYFDYWGGTTTVTVSS

配列番号102

【化2】

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDL
 LPSGVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTK
 LTVL

30

【0182】

あるいは、US7, 879, 985に例示されるように、配列番号103によって表される重鎖可変ドメインを配列番号104によって表される軽鎖可変ドメインと対形成させて、NKGDに結合することができる抗原結合部位を形成することができる。

配列番号103

【化3】

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYS
 GSANYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWG
 QGTMVTVSS

40

配列番号104

【化4】

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS
 RATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGGGTKVEIK

50

【 0 1 8 3 】

一態様では、本開示は、ナチュラルキラー細胞上のNK G 2 D受容体およびC D 1 6受容体、ならびに抗原B 7－H 3に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。表2は、組み合わせて、B 7－H 3に結合することができる、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインの一部の例示的な配列を列挙している。

【表2－1】

表 2		
クローン	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
エノブリッツマブ (MacroGenics, Inc.)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSFGMHWVRQAP GKGLEWVAYISSDSSAIYYAD TVKGRFTISRDNANKNSLYLQM NSLRDEDTAVYYCGRGR ENIYYGSRLDYWGQGTTVTVS SA (配列番号 :109) CDR1 (配列番号 :110) - GFTFSSF CDR2 (配列番号 :111) - SSDSSA CDR3 (配列番号 :112) - GRENIYYGSRLDY	DIQLTQSPSFLSASVGDRV TITCKASQNVDNTNVAWY QQKPGKAPKALIYSASYR YSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYN NYPFTFGQGTKLEIKR (配列番号 :113) CDR1(配列番号 :114) - QNVDNTNVA CDR1 Chothia (配列番号 : 368) - KASQNVDNTNVA CDR2 (配列番号 :115) - SASYRYS CDR3 (配列番号 :116) - QQYNNYPFT
エノブリッツマブ (scFv構築物中)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSFGMHWVRQAP GKCLEWVAYISSDSSAIYYAD TVKGRFTISRDNANKNSLYLQM	DIQLTQSPSFLSASVGDRV TITCKASQNVDNTNVAWY QQKPGKAPKALIYSASYR YSGVPSRFSGSGSGTDFTL

10

20

30

40

【表 2 - 2】

	NSLRDEDTAVYYCGRGRENIIY YGSRLDYWGQGTTVTVSSA (配列番号 :386) CDR1 (配列番号 :110) - GFTFSSF CDR2 (配列番号 :111) - SSDSSA CDR3 (配列番号 :112) - GRENIIYGSRLDY	TISSLQPEDFATYYCQQYN NYPFTFGCGTKLEIK (配列番号 :387) CDR1(配列番号 :114) - QNVDTNVA CDR1 Chothia (配列番号 : 368) - KASQNVDTNVA CDR2 (配列番号 :115) - SASYRYS CDR3 (配列番号 :116) - QQYNNYPFT
オンブルタマブ (Y-mAbs Therapeutics, Inc.)	QVQLQQSGAELVKPGASVKLS CKASGYTFTNYDINWVRQRPE QGLEWIGWIFPGDGSTQYNEK FKGKATLTDTSSSTAYMQLS RLTSEDSAVYFCARQTTATWF AYWGQGTLLVTVSAA (配列番号 :117) CDR1 (配列番号 :118) - NYDIN CDR2 (配列番号 :119) - WIFPGDGSTQY CDR3 (配列番号 :120) - QTTATWFAY	DIVMTQSPATLSVTPGDR VSLSCRASQSIDYHLHWY QKSHESPRLLIKYASQSI SGIPSRFSGSGSGSDFTLSI NSVEPEDVGVYYCQNGHS FPLTFGAGTKLELKR (配列番号 :121) CDR1 (配列番号 :122) - RASQSIDYHL CDR2 (配列番号 :123) - YASQSI CDR3 (配列番号 :124) - QNGHSFPLT
huM30 (Daiichi Sankyo, Inc.)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTNYVMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDVKY NEKFKGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARWGY YGSPLYFDYWQGQTLTVS S (配列番号 :369) CDR1 (配列番号 :371) -	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASSRLIYMHYQQ KPGQAPRPLIYATSNLASG IPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQQWNSNP PTFGQGTKVEIK (配列番号 :370) CDR1 (配列番号 :374) - RASSRLIYMH

10

20

30

40

【表 2 - 3】

	GYTFTNY CDR2 (配列番号 :372) - NPYNDD CDR3 (配列番号 :373) - WGYYGSPLYFYFDY	CDR2 (配列番号 :375) - ATSNLAS CDR3 (配列番号 :376) - QQWNSNPPT
huM30 (scFv構築物中)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTNYYVMHWVRQA PGQCLEWMGYINPYNDDVKY NEKFKGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDVAVYYCARWGY YGSPLYFYFDYWGGQGLTVTS S (配列番号 :388) CDR1 (配列番号 :371) - GYTFTNY CDR2 (配列番号 :372) - NPYNDD CDR3 (配列番号 :373) - WGYYGSPLYFYFDY	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASSRLIYMHVYQQ KPGQAPRPLIYATSNLASG IPARFSGSGSGTDFTLTSS LEPEDFAVYYCQQWNSNP PTFGCGTKVEIK (配列番号 :389) CDR1 (配列番号 :374) - RASSRLIYMH CDR2 (配列番号 :375) - ATSNLAS CDR3 (配列番号 :376) - QQWNSNPPT
huAb13v1 (AbbVie Inc.) US 20170355769 A1	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTC AVTGYSITSGYSWHWIRQFPG NGLEWMGYIHSSGSTNYPNPSL KSRISISRDTSKNQFFLKLSSVT AADTAVYYCAGYDDYFEYW GQGTTVTVSS (配列番号 :377) CDR1 (配列番号 :379) - GYSITSGY CDR2 (配列番号 :380) - HSSGS CDR3 (配列番号 :381) - YDDYFEY	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCKASQNVGFNVAWY QQKPGKSPKALIYSASYR YSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFAEYFCQQYN WYPFTFGGQGTKLEIK (配列番号 :378) CDR1 (配列番号 :382) - KASQNVGFNVA CDR2 (配列番号 :383) - SASYRYS CDR3 (配列番号 :384) - QQYNWYPFT
huAb13v1 (scFv構築物中)	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTC AVTGYSITSGYSWHWIRQFPG NCLEWMGYIHSSGSTNYPNPSL KSRISISRDTSKNQFFLKLSSVT AADTAVYYCAGYDDYFEYW GQGTTVTVSS (配列番号 :390)	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCKASQNVGFNVAWY QQKPGKSPKALIYSASYR YSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFAEYFCQQYN WYPFTFGGQGTKLEIK (配列番号 :391)

10

20

30

40

【表 2 - 4】

CDR1 (配列番号 :379) - GYSITSGY	CDR1 (配列番号 :382) - KASQNVGFNVA
CDR2 (配列番号 :380) - HSSGS	CDR2 (配列番号 :383) - SASYRYS
CDR3 (配列番号 :381) - YDDYFEY	CDR3 (配列番号 :384) - QQYNWYPFT

10

【0184】

あるいは、配列番号125によって定義されるアミノ酸配列またはその成熟細胞外断片への結合についてスクリーニングすることにより、B7-H3に結合することができる新規な抗原結合部位を同定することができる。

配列番号125

【化5】

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSEPEP
GFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRV
RVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITC SSYQG
YPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSC LVRNPV
LQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLI
WQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRV RVADEGSFTC
FVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVITC SSYRGYPEAEVFWQ
DGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSC LVRNPVLQQDAHGS
VTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGE
GEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

20

30

【0185】

一態様では、本開示は、ナチュラルキラー細胞上のNKGD2D受容体およびCD16受容体、ならびに抗原L1CAMに結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。表3は、組み合わせて、L1CAMに結合することができる、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインの一部の例示的な配列を列挙している。

【表 3 - 1】

表 3		
クローン	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
特許公開番号	EVQLQQSGAELVRPGALVKLS CKASGFNIKDYMQWVKQRP EQGLEWIGWIDPENGKTVFDP	DIVMTQSQKFMSTSVGDR VSVTCKASQNVGTNVAW YQQKPGHSPKALIYSTSYR

40

【表 3 - 2】

US20170306015 A1	KFRGKASISADTSSNTAYLQLS SLTSEDVAVYYCARWNPLAF WGQGTLLVTVSS (配列番号 :133) CDR1 (配列番号 :134) - FNIKDYMQ CDR2 (配列番号 :135) - WIDPENGKTVFDPKFRG CDR3 (配列番号 :136) - WNPLAF	YSGVPDRFTGSGSGTDFTL TIRNVQSEDLAEYFCQQY NTYPYTFGGGGTKLEIK (配列番号 :137) CDR1(配列番号 :138) - KASQNVGTNVA CDR2 (配列番号 :139) - STSYRYS CDR3 (配列番号 :140) - QQYNTYPYT
特許公開番号 US20150344571 A1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSRFGMHWVRQAP GKGLEWVAFISNDGSNKYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRPEDTAVYYCARGRAY GSGSLFDPWGQGTLLVTVSS (配列番号 :141) CDR1 (配列番号 :142) - RFGMH CDR2 (配列番号 :143) - FISNDGSNKYYADSVK CDR3 (配列番号 :144) - GRAYGSGSLFDP	DIQLTQSPSSLSASVGDV TITCRASRTISIIYVNWYRQ RPGKAPESLIYAASNLSHG VPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQSIGRG VVTFGQGTKLEIK (配列番号 :145) CDR1 (配列番号 :146) - RASRTISIIYVN CDR2 (配列番号 :147) - AASNLS CDR3 (配列番号 :148) - QQSIGRGVVT

10

20

30

【0186】

あるいは、配列番号149によって定義されるアミノ酸配列またはその成熟細胞外断片への結合についてスクリーニングすることにより、L1CAMに結合することができる新規な抗原結合部位を同定することができる。

配列番号149

40

【化6-1】

MVVALRYVWPLLLCSPCLLIQIPEEYEGHHVMEPPVITEQSPRRLVVFPTDDISLKCE
ASGKPEVQFRWTRDGVHFKPKEELGVTVYQSPHSGSFTITGNNNSNFAQRFQGIYRCF
ASNKLGTAMSHEIRLMAEGAPKWPKETVKPVEVEEGESVVLPCNPPPSAEPLRIYW
MNSKILHIKQDERVTMGQNGNLYFANVLTSDNHSDYICHAHFPGTRTIIQKEPIDLRV
KATNSMIDRKPRLLFPTNSSHLVALQGQPLVLECIAEGFPTPTIKWLRPSGPMADR

【化 6 - 2】

VTYQNHNTLQLLKVGEEDDGEYRCLAENSLGSARHAYYVTVEAAPYWLHKPQSH
 LYGPGETARLDCQVQGRPQPEVTWRINGIPVEELAKDQKYRIQRGALILSNVQPSDT
 MVTQCEARNRHGLLLANAYIYVVQLPAKILTADNQTYMAVQGSTAYLLCKAFGAP
 VPSVQWLDEDGTTVLQDERFFPYANGTLGIRDLQANDTGRYFCLAANDQNNVTIMA
 NLKVKDATQITQGPRSTIEKKGSRVTFTCQASFDPSLQPSITWRGDGRDLQELGDSK
 YFIEDGRLVIHSLDYSDQGNYSVASTELDVVESRAQLLVVGSPGPVPRVLSDLHLL
 TQSQVRVSWSPAEDHNAPIEKYDIEFEDKEMAPEKWYSLGKVPGNQTSTTLKLSPIV
 HYTFRVTAINKYGPGEPSVSETVVTPEAAPEKNPVDVKGEGNETTNMVITWKPLR
 WMDWNAPQVQYRVQWRPQGTRGPWQEIVSDPFLVVSNTSTFVPYEIKVQAVNSQ
 GKGPPEQVTIGYSGEDYPQAIPELEGIEILNSSAVLVKWRPVDLAQVKGHLRGYNVT
 YWREGSQRKHSKRHHKDHVVVPANTTSVILSGLRPYSSYHLEVQAFNGRGS GPASE
 FTFSTPEGVPGHPEALHLECQSNTSLLLRWQPPLSHNGVLTGYVLSYHPLDEGGKGQ
 LSFNLRDPELRTHNLTDLSPHLRYRFQLQATTKEGPGEAIVREGGTMALSGISDFGNI
 SATAGENYSVVSWSVPKEGQCNRFRHILFKALGEEKGGASLSPQYVSYNQSSYTQWD
 LQPDTDYEIHLFKERMFRHQMAVKTNGTGRVRLPPAGFATEGWFIGFVSAIILLLLVL
 LILCFIKRSKGGKYSVKDKEDTQVDSEARPMKDETFGEYRSLESDNEEKAFGSSQPSL
 NGDIKPLGSDDSLADYGGSVQVFNEDGSFIGQYSGKKEKEAAGGNDSSGATSPINP
 AVALE

10

20

【0 1 8 7】

一態様では、本開示は、ナチュラルキラー細胞上のNK G 2 D受容体およびC D 1 6受
 容体、ならびに抗原F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L
 P、C D 2 0 0、I N S R (H H F 5)、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1または
 S L C 1 A 5に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。表4は、組み合わせて、
 F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I
 N S R (H H F 5)、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1またはS L C 1 A 5に結合
 することができる、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインの一部の例示的な配列を列
 挙している。

30

【表 4 - 1】

表 4		
クローン	重鎖可変ドメインアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインアミノ酸配列
抗FLT1 (イクルマブ)	QAQVVESGGGVVQSGRSLRLS CAASGFAFSSYGMHWVRQAP GKGLEWVAVIWDGSENKYY	EIVLTQSPGTLSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIP

40

10

40

10

20

30

40

【表 4 - 4】

	CDRH3: GGGSIYYAMDY (配列番号 :185)	CDRL3: MQHLEYPLT (配列番号 :189)
TNC US7968685B2 (D5)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAASWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKAHNAFD YWGQGTLVTVSR (配列番号 :190) CDRH1: SYAAS (配列番号 :191) CDRH2: AISGSGGSTYYADSVK (配列番号 :192) CDRH3: AHNAFDY (配列番号 :193)	SELTQDPAVSVALGQTVRIT CQGDSLRSYYASWYQQKP GQAPVLVIYGKNNRPSGIPD RFSGSSSGNTASLTITGAQA EDEADYYCNSSVYTMPPVV FGGGTKLTVLG (配列番号 :194) CDRL1: QGDSLRSYYAS (配列番号 :195) CDRL2: GKNNRPS (配列番号 :196) CDRL3: NSSVYTMPPVV (配列番号 :197)
CSPG4 (US20180072811 A1)	AEVQLVESGGGVVVRPGGSLRL SCAASGFTFDDYGMSWVRQA PGKGLEWVSGINWNGGSTGY ADSVKGRFTISRDN AKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGVL SRYFDYWGQGTLVTVSS (配列番号 :198) CDRH1: GFTFDDYG (配列番号 :199) CDRH2: INWNGGST (配列番号 :200) CDRH3: ARGVLSRYFDY (配列番号 :201)	EIELTQSPATLSLSPGERATL SCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASN RATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSEPE DFAVYYCQQRSNWPPAFG GGTKVEIKR (配列番号 :202) CDRL1: QSVSSY (配列番号 :203) CDRL2: DAS (配列番号 :204) CDRL3: QQRSNWPPA (配列番号 :205)
CSPG4	QVQLQESGPGLVKPSQTLST CTVSGGSITSGYYWNWIRQHP	DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASQGIRNYLNWYQQK

10

20

30

40

【表 4 - 5】

(US20140242083 A1 (LC007 M4-3 ML2))	GKGLEWIGYITFDGSNNYNPS LKSRTVISRDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCAFDYWGQ GTLVTVSS (配列番号 :206) CDRH1: SGYYWN (配列番号 :207) CDRH2: YITFDGSNNYNPSLKS (配列番号 :208) CDRH3: FDY (配列番号 :209)	PGKAPKLLIYYTSSLHSGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQP EDFATYYCQQYSALPWTFG QGTKVEIK (配列番号 :210) CDRL1: RASQGIRNYLN (配列番号 :211) CDRL2: YTSSLHS (配列番号 :212) CDRL3: QQYSALPWT (配列番号 :213)
BST1 (MEN1112 (BST1-A2-NF US20160002354 A1))	QAYLQQSGPELVKAGASVKM SCKASGYSFIEYTINWVKQ SHGKSLEWIGNIDPYYGTTY NQMFTGKATLTVDQSSNTAY MQLKSLTSEDSAVYFCARG SAWFPYWGQGTLTVSA (配列番号 :214) CDRH1: GYSFIEYTINW (配列番号 :215) CDRH2: GNIDPYYGTTYYNQMFT (配列番号 :216) CDRH3: ARGSAWFPY (配列番号 :217)	DIVMSQSPAIMSASPGEKVT MTCSASSSVTYMYWYQQK PGSSPRLLIYDTSNLASGVP VRFSGSGSGTSYSLTISRME AEDTATYYCQQWSNYPLTF GAGTKLELK (配列番号 :218) CDRL1: SASSSVTYMY (配列番号 :219) CDRL2: DTSNLAS (配列番号 :220) CDRL3: QQWSNYPLT (配列番号 :221)
BST1 (BST1-A3 US20160002354 A1)	QVQLQQSRAELVMPGASVKM SCKTSGYTFSDYWVHWVRQR PGQGLEWIGAI DGSDTFNDYS QKFKGRATLTVDSSSTVYMQ LSSLTSEDSAVYYCARG GLLQYWGGQTTLTVSS (配列番号 :222)	DIQLTQSPASLSASVGETVTI TCRASNIYSYLAWYQQKQ GKSPQLLVYNTKTLGEGVP SRFSGSGSGTQFSLKINSLQP EDFGSYHCQHHYGTPFTFG SGTKLEIK (配列番号 :226)

10

20

30

40

10

20

30

40

【表 4 - 7】

	CDRH2: YPGDGS (配列番号 :240) CDRH3: RGEYGN YEGAMDY (配列番号 :241)	CDRL1: KASQSVDYDGH SYMN (配列番号 :243) CDRL2: AASNLES (配列番号 :244) CDRL3: QQSDENPLT (配列番号 :245)	10
CD200 (サマリズマブ)	QVQLQQSGSELKKPGASVKIS CKASGYSFTDYIILWVRQNP KGLEWIGHIDPYYGSSNYNLK FKGRVTITADQSTTTAYMELS SLRSED TAVYYCGRSKRDYFD YWGQGTTLTVSSA (配列番号 :246) CDRH1: GYSFTDY (配列番号 :247) CDRH2: DPYYGS (配列番号 :248) CDRH3: SKRDYFDY (配列番号 :249)	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTI TCKASQDINSYLSWFQQKP GKAPKLLIYRANRLVDGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQP EDFAVYYCLQYDEFPYTFG GGTKLEIKR (配列番号 :250) CDRL1: QDINSYLS (配列番号 :251) CDRL2: RANRLVD (配列番号 :252) CDRL3: LQYDEFPYT (配列番号 :253)	20 30
INSR (US20170037135 A1)	EVQLVETGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYAMHWVRQAP GKGLEWVAVISYSGSNKY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARHEW GFGFDYWGQGT TTVTVSS (配列番号 :254) CDRH1: GFTFSSYA (配列番号 :255) CDRH2: ISYSGSNK (配列番号 :256)	DVVM TQSPLSLPVT LGQPA SISCRSSQSLVYGDGNTYLN WFQQRPGQSPRRLIYKVS N RDSGVPDRFSGSGSGTEFTL KISRVEAEDVGVYFCMQGT YWPGTFGGG TKLEIKRTVA APS (配列番号 :258) CDRL1: QSLVYGDGNTY (配列番号 :259) CDRL2: KVS (配列番号 :260)	40

【表 4 - 8】

	CDRH3: ARHEWGFGFDY (配列番号 :257)	CDRL3: MQGTYWP (配列番号 :261)
INSR (US20170114152 A1)	QVQLQQSGPELVKPGALVKIS CKASGYTFTNYDIHWVKQRP GQGLEWIGWIYPGDGSTKYNE KFKGKATLTADKSSSTAYMH LSSLTSEKSAVYFCAREWA YWGQGTLLTVSA (配列番号 :262) CDRH1: GYTFTNYDIH (配列番号 :263) CDRH2: WIYPGDGSTKYNEKFKG (配列番号 :264) CDRH3: EWAY (配列番号 :265)	DIQMTQSPSSLSASLGERVS LTCRASQDIGGNLYWLQQG PDGTIKRLIYATSSLDGVP KRFSGSRSGSDYSLTISSLES EDFVDYYCLQYSSSPWTFG GGTKMEIK (配列番号 :266) CDRL1: RASQDIGGNLY (配列番号 :267) CDRL2: ATSSLDS (配列番号 :268) CDRL3: LQYSSSPWT (配列番号 :269)
ITGA6 (a6b4 WO 2008127655)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSEYTMSWVRQAP GKGLEWVSRIYSSGGHTEY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGS YYHYHYGMDVWGQGTITVTV SS (配列番号 :270) CDRH1: EYTMS (配列番号 :271) CDRH2: RIYSSGGHTEYADSVKG (配列番号 :272) CDRH3: GSGYYHYHYGMDV (配列番号 :273)	DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASQSISSYLNWYQQKP GKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYSTPITFGQG TRLEIK (配列番号 :274) CDRL1: RASQSISSYLN (配列番号 :275) CDRL2: AASSLQS (配列番号 :276) CDRL3: QQSYSTPIT (配列番号 :277)

10

20

30

40

【表 4 - 9】

ITGA6 (インテグリン a6b4 US20160194400 A1)	CDRH1: GYYMH (配列番号 :278) CDRH2: INPSGGTTRLAQKFQ (配列番号 :279) CDRH3: EAHSSGSYFFDY (配列番号 :280)	CDRL1: RASQSISTWLA (配列番号 :281) CDRL2: QASTLTS (配列番号 :282) CDRL3: QEYNSYSPWA (配列番号 :283)
MELTF US20170320960 A1 (hSC57.32ss1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYRIEWVRQAP GQGLEWMGEILPRGGNTNY NEKFKGRVTFTADTSTSTAYM ELRSLRSDDTAVYYCARDG YYGRFAYWGQGLTVTVSS (配列番号 :284) CDRH1: NYRIE (配列番号 :285) CDRH2: EILPRGGNTNYNEKFKG (配列番号 :286) CDRH3: DDGYGRFAY (配列番号 :287)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYYTSRLHSGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQP EDFATYYCQQGNTLPPTFG GGTKVEIK (配列番号 :288) CDRL1: RASQDISNYLN (配列番号 :289) CDRL2: YTSRLHS (配列番号 :290) CDRL3: QQGNTLPPT (配列番号 :291)
MELTF US20170320960 A1 (hSC57.32)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYRIEWVRQAP GQGLEWMGEILPRGGNTNY NEKFKGRVTFTADTSTSTAYM ELRSLRSDDTAVYYCARDG YYGRFAYWGQGLTVTVSS (配列番号 :292) CDRH1: NYRIE (配列番号 :293) CDRH2: EILPRGGNTNYNEKFKG (配列番号 :294)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYYTSRLHSGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQP EDFATYYCQQGNTLPPTFG GGTKVEIK (配列番号 :296) CDRL1: RASQDISNYLN (配列番号 :297) CDRL2: YTSRLHS (配列番号 :298)

10

20

30

40

【表 4 - 1 0】

	CDRH3: DDGY YGRFAY (配列番号 :295)	CDRL3: QQGNTLPPT (配列番号 :299)
SLC1A5 US20130323789 A1 (HV2LV3)	QVQLVQSGSELKKPGAPVKVS CKASGYTFSTFGMSWVRQAP GQGLKWMGWIHTYAGVPIY GDDFKGRFVFSLDTSVSTAYL QISSLKAEDTAVYFCARRSDN YRYFFDYWGQGTTVTVSS (配列番号 :300) CDRH1: GYTFSTF (配列番号 :301) CDRH2: HTYAGV (配列番号 :302) CDRH3: RSDNYRYFFDY (配列番号 :303)	DIQMTQSPSSLSASLGDRV ITCRASQDIRNYLNWYQQK PGKAPKLLIYYTSRLHSGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQP EDFATYFCQQGHTLPPTFG QGTKLEIK (配列番号 :304) CDRL1: RASQDIRNYLN (配列番号 :305) CDRL2: YTSRLHS (配列番号 :306) CDRL3: QQGHTLPPT (配列番号 :307)
SLC1A5 WO2018089393 (生殖細胞系列 17cl0)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLT CAVYGGSFSGYYWSWIRQPP GKGLEWIGEIIHSGGANYNPS LKS RVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARGQGKNW HYDYFDYWGQGT LVTVSSA (配列番号 :308) CDRH1: GYYWS (配列番号 :309) CDRH2: EIIHSGGANYNPS LKS (配列番号 :310) CDRH3: GQGKNWHYDYFDY (配列番号 :311)	DIQMTQSPSTLSASVGDR VTITCRASQSIRSWLAWYQ QKPGKAPKLLIYKASILKIG VPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQYYYSYRT FGQGTKVEIK (配列番号 :312) CDRL1: RASQSIRSWLA (配列番号 :313) CDRL2: KASILKI (配列番号 :314) CDRL3: QQYYYSYRT (配列番号 :315)

10

20

30

40

【0188】

あるいは、それぞれ、配列番号 316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327または328によって定義されるアミノ酸配列への結合についてスクリーニングすることにより、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR (HHF5)、ITGA

50

6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合することができる新規な抗原結合部位を同定することができる。表5は、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1およびSLC1A5の例示的な配列を列挙している。一部の実施形態では、配列番号316～328の1つまたは複数はプレプロタンパク質のアミノ酸配列である。当業者であれば、プレプロタンパク質が（例えば、シグナルペプチドを除去することおよび／または2つもしくはそれよりも多い鎖に切断することによって）哺乳動物細胞中で成熟タンパク質にプロセシングされ得ることを認識するはずである。したがって、それぞれ、配列番号316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327または328によって定義されるアミノ酸配列の成熟細胞外断片への結合についてスクリーニングすることにより、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR(HHF5)、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合することができる新規な抗原結合部位を同定することもできる。

【表5-1】

表 5		
抗原	アミノ酸配列	配列番号
FLT1	MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPELSLKGTQHIMQA GQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSITKSACGRNGKQFCS TLTNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIYIFISDTGRPFVE MYSEIPEIIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIW DSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDV QISTPRPVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRAS VRRRIDQSNSHANIFYSVLTIDKMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSV NTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFFSPSEV VWLKDGLPATEKSARYLTRGYSLIKDVTEEDAGNYTILLSIKQSN VFKNLTATLIVNVKPQIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQILTCTAYGIP QPTIKWFWHPCNHNHSEARCDFCNNEESFILDADSNMGNRIESIT QRMALIEGKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVGTVGRNISFYIT DVPNGFHVNLKMPTEGEDLKL SCTVNKFLYRDVTWILLRTVNN RTMHYSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNVSLQDSGTYACRARNVY TGEEILQKKEITIRDQEAPYLLRNLSDHTVAISSSTTLDCHANGVPE PQITWFKNNHKIQQEPGII LGPGSSSTLFIERVTEEDEGVYHCKATNQ KGSVESSAYLTVQGTSDKSNLELITLTCTCVAATLFWLLLTFLIRK MKRSSEIKTDYLSIIMDPDEVPLDEQCERLPYDASKWEFARERLK LGKSLGRGAFGKVQASAFGIKKSPTCRTVAVKMLKEGATASEY KALMTELKILTHIGHHLNVVNLGACTKQGGPLMVIVEYCKYGN LSNYLKSQRDLFFLNKDAALHMEPKKEKMEPGLEQGKKPRLDSV TSSESFASSGFQEDKSLSDVEEEDSDGIFYKEPITMEDLISYSFQVA	316

表 5		
抗原	アミノ酸配列	配列番号
	RGMEFLSSRKCIHRDLAARNILLSENN VVKICDFGLARDIYKNPDY VRKGDTRLPLKWMAPESIFDKIYSTKSDVWSYGVLLWEIFSLGGS PYPGVQMDDEFCSRRLREGMRMRAPEYSTPEIYQIMLDCWHRDPK ERPRFAELVEKLGDLLQANVQQDGKDYIPINAILTGNSGFTYSTPA FSEDFFKESISAPKFNSGSSDDVRYVNAFKFMSLERIKTFEELLPNA TSMFDDYQGDSSSTLLASPMLKRFTWTDSKPKASLKIDLRVTSKSK ESGLSDVSRPSFCHSSCGHVSEGKRRFTYDHAELERKIACCSPPPD YNSVVLYSTPPI	
KDR	MQSKVLLAVALWLCVETRAASVGLPSVSLDLPRLSIQKDILTIKAN TTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVTECSDFLCKTLTIP KVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVYVQDYRSPFIASVSDQHGVV YITENKNKTVVIPCLGSISNLNVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSK KGFTIPSYMISYAGMVFCFAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVL SPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKKL NRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKN STFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKYLGYPPEIKW YKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSESDTGNVTVILTNPISKEKQSH VVSLVVYVPPQIGEKSLISPVDSYQYGTQTTLCTVYAIPPPHHIH WYWQLEEECANEPSQAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEVNK NQFALIEGKNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFH VTRGPEITLQPDMPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKLGPPQPL PIHVGEPLTPVCKNLDLWKLNATMFSNSTNDILIMELKNASLQD QGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRLTVLERVAPTITGNLENQTTSIG ESIEVSCTASGNPPPQIMWFKDNETLVEDSGIVLKDGNRNLTIRRV RKEDEGLYTCQACSVLGCALVEAFFIIEGAQEKTNLEIILVGTAVI AMFFWLLLVIILRTVVKRANGGELKTGYLSIVMDPDELPLDEHCER LPYDASKWEFPRDRLKLGKPLGRGAFGQVIEADAFGIDKTATCRT VAVKMLKEGATHSEHRALMSELKILIHIGHHLNVVNLLGACTKPG GPLMVIVEFCKFGNLSTYLRSKRNEFVVPYKTKGARFRQGKDYVG AIPVDLKRRLDSITSSQSSASSGFVEEKSLSDVEEEEAPEDLYKDFL TLEHLICYSFQVAKGMEFLASRKCIHRDLAARNILLSSEKNVVKICD FGLARDIYKDPDYVRKGDARLPLKWMAPETIFDRVYTIQSDVWSF GVLLWEIFSLGASYPGVKIDEEFCRRLKEGTRMRAPDYTTPEMY QTMLDCWHGEPSPQRPTFSELVEHLGNLLQANAQQDGKDYIVLPIS ETLSMEEDSGLSLPTSPVSCMEEEEEVCDPKFHYDNTAGISQYLQNS KRKSRPVSVKTFEDIPLPEVKVIPDDNQTDSGMVLASEELKTLE DRTKLSPSFGGMVPSKSRRESVASEGSNQTSGYQSGYHSDDTDTTV YSSEEAECLKLIEIGVQTGSTAQILQPDSTTLSSPPV	317

40

【表 5 - 3】

表 5		
抗原	アミノ酸配列	配列番号
TNC	MGAMTQLLAGVFLAFLALATEGGVLKKVIRHKRQSGV NATLPEE NQPVVFNHVYNIKLPGVSGQCSVDLESASGEKDLAPPSEPSSEFQEH TVDGENQIVFTHRINIPRRACGCAAAPDVKELLSRLEELLENLVSSL REQCTAGAGCCLQPATGRLDTRPFCSGRGNFSTEGCGCVCEPGW KGPNCSEPECPGNCHLRGRCIDGQCICDDGFTGEDCSQLACPSDCN DQGKCVNGVCICFEGYAGADCSREICVPCSEEHGTCVDGLCVCH DGFAGDDCNKPLCLNNCYNRGRCVENECVCDEGFTGEDCSELICP NDCFDRGRCINGTCYCEEGFTGEDCGKPTCPHACHTQGRCEEQC VCDEGFAGVDCSEKRCPADCHNRGRCVDGRCECDDGFTGADCG ELKCPNGCSGHGRCVNGQCVCDEGYTGEDCSQLRCPNDCHSRGR CVEGKCVCEQGFGKYDCSDMSCPNDCHQHGRCVNGMCVCDDG YTGEDCRDRQCPRDCSNRGLCVDGQCVCEDGFTGPDCAELSCPN DCHGQGRCVNGQCVCHEGFMGKDCKEQRCPSDCHGQGRCVDG QCICHEGFTGLDCGQHSCPSDCNNLGQCVSGRCICNEGYSGEDCS EVSPPKDLVVTEVTEETVNLAWDNEMRVTEYLVVYTPTHEGGLE MQFRVPGDQTSTIIQELEPGVEYFIRVFAILENKKKSIPVSARVATYL PAPEGLKFKSIKETSVEVEWDPLDIAFETWEIIFRNMNKEDEGEITK SLRRPETSRYRQTGLAPGQEYEISLHIVKNNTRGPGLKRVT TTRLDA PSQIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLT EDENQYSIGNLKPDT EYEVSLISRRGDMSSNPAKETFTTGLDAPRN LRRVSQTDNSITLEWRNGKAAIDSYRIKYAPISGGDHA EVDVPSQ QATTKTTLTGLRPGTEYGIGVSAVKEDKESNPATINAATELDTPKD LQVSETAETSLTLLWKTPAKFDRLNYSLPTGQWVGVLPRNT TSYVLRGLEPGQEYNVLLTAEKGRHKS KPARVKASTEQAPELENL TVTEVGWDGLRLNWTAAADQAYEHFIIQVQEANKVEAARNLTPVG SLRAVDIPGLKAATPYTVSIYGVIGYRTPVLSAEASTGETPNLGE VVVAEVGWDALKLNWTAPEGAYEYFFIQVQEADTVEAAQNLT PGGLRSTDL PGLKAATHYTITIRGVTQDFSTTPLSVEVLTEEVPDM GNLTVTEVSWDALRLNWTTPDGT YDQFTIQVQEADQVEEAHNLT VPGSLRSMEIPGLRAGTPYTVTLHGEVRGHSTRPLAVEVVTEDLP QLGDLAVSEVGWDGLRLNWTAAADNAYEHFVIQVQEVNKVEAAQ NLTLPGSLRAVDIPGLEAATPYRVSIYGVIRGYRTPVLSAEASTAK EPEIGNLNVSDITPESFNL SWMATDGIFETFTIEIIDS NRLLTVEYNI SGAERTAHISGLPPSTDFIVYLSGLAPSIRTKTISATATTEALPLEN LTISDINPYGFTVSWMASENAFDSFLVT VVDSGKLLDPQEFTLSGT QRKLELRGLITGIGYEMVSGFTQGHQTKPLRAEIVTEAEPEVDNL LVSDATPDGFRLSWTADEGVFDNFVLKIRD TKKQSEPLEITLLAPE RTRDITGLREATEYEIELYGISKGRRSQTVSAIATTAMGSPKEVIFS DITENSATVSWRAPTAQVESFRITYVPITGGTPSMVTVDGTKTQTR	318 10 20 30 40

【表 5-4】

表 5		
抗原	アミノ酸配列	配列番号
	LVKLIPGVEYLVSIAMKGFEESEPVS GSFTTALDGPSGLVTANITD SEALARWQPAIATVDSYVISYTGEKVPEITRTVSGNTVEYALTDLE PATEYTLRIFAEGPQKSSTITAKFTTDLDSPRDLTATEVQSETALL TWRPPRASVTGYLLVYESVDGTVKEVIVGPDTTSSYSLADLSPSTH YTAKIQALNGPLRSNMIQTIFTTIGLLYPPFKDCSQAMLNGDTTSG LYTIYLNKDKAEELEVFCDMTSDGGGWIVFLRRKNGRENFYQNW KAYAAGFGDRREEFWLGLDNLNKITAQQGYELRVDLRDHGETAF AVYDKFSVGDAKTRYKLKVEGYSGTAGDSMAYHNRSFSTFDK DTDSAITNCALSYKGAFWYRNCHRVNLMGRYGDNNHSQGVNWF HWKGHEHSIQFAEMKL RPSNFRNLEGRRKRA	
TNN	MSLQEMFRFPMGLLLGSVLLVASAPATLEPPGCSNKEQQVTVSHT YKIDVPKSALVQVDADPQPLSDDGASLLALGEAREEQNIIFRHNIR LQTPQKDCELAGSVQDLLARVKKLEEEMVEMKEQCSAQRCCQG VTDL SRHCSGHGTF SLETCSCHCEE GREGPACERLACPGACSGHG RCVDGRCLCHEPYVGADCGYPACPENCSGHGECVRGVCQCHEDF MSEDCESEKRCPGDCSGHGFCDTGECYCEEFTGLDCAQVVPQG LQLLKNTEDSLLVSWEPSSQVDHYLLSYYPLGKELSGKQIQVPKE QHSYEILGLLPGTKYIVTLRNVKNEVSSSPQHLLATTDLAVLGTA WVTDETENSLDVEWENPSTEVDYYKLRYGPMTGQEVAEVTVPKS SDPKSRYDITGLHPGTEYKITVVP MRGELEGKPILLNGRTEIDSPTN VVTDRVTEDTATVSWDPVQAVIDKYVVRYTSADGDTKEMAVHK DESSTVLTGLKPGEAYKVYVWAERGNQGSKKADTNALTEIDSPA NLVTDRVTENTATISWDPVQATIDKYVVRYTSADDQETREVLVG KEQSSTVLTGLRPGVEYTVHVWAQKGDRESKKADTNAPT DIDSP KNLVTD RVTENMATVSWDPVQA AIDKYVVRYTSAGGETREVPV GKEQSSTVLTGLRPGMEYMVHVWAQKGDQESKKADTKAQT D D SPQNLVTDRVTENMATVSWDPVRATIDRYVVRYTSAKDGETREV PVGKEQSSTVLTGLRPGVEYTVHVWAQKGAQESKKADTKAQT D I DSPQNLVTDWVTENTATVSWDPVQATIDRYVVHYTSANGETREV PVGKEQSSTVLTGLRPGMEYTVHVWAQKGNQESKKADTKAQT E I DGPKNLVTDWVTENMATVSWDPVQATIDKYM VRYTSADGETRE VPVGKEHSSTVLTGLRPGMEYMVHVWAQKGAQESKKADTKAQT ELDP PRNL RPSAVTQSGGILTWTPPSAQIHGYILTYQFPDGT VKEM QLGREDQRFALQGLEQGATYPVSLVAFKGGRRSRNVSTTLSTVGA RFPHPSDCSQVQQNSNAASGLYTIY LHGDASRPLQVYCDMETDG GGWIVFQRRNTGQLDFFKRWRSYVEGFGDPMKEFWLGLDKLHN LTTGTPARYEVRVDLQTANESAYAIYDFFQVASSKERYKLTVGKY RGTAGDALTYHNGWKFTTFDRDNDIALSNCALTHHGGWWYKNC	319

【表 5 - 5】

表 5		
抗原	アミノ酸配列	配列番号
	HLANPNGRYGETKHSEGVNWEPWKGHEFSIPYVELKIRPHGYSRE PVLGRKKRTLGRRLRTF	
CSPG4	MQSGPRPPLPAPGLALALTLTMLARLASAASFFGENHLEVPVATA LTDIDLQLQFSTSQPEALLLLAAGPADHLLQLYSGRLQVRLVLGQ EELRLQTPAETLLSDSIPHTVVLTVVEGWATLSVDGFLNASSAVPG APLEVPHYGLFVGGTGTLGLPYLRGTSRPLRGCLHAATLNGRSLLR PLTPDVHEGCAEEFSASDDVALGFSGPHSLAAFPAGWTQDEGTLE FTLTTQSRQAPLAFQAGGRRGDFIYVDIFEGHLRAVVEKGQGTVL LHNSVPVADGQPHEVSVHINAHRLAISVDQYPTHTSNRGVLSYLEP RGSLLLGGDLAEASRHLQEHRLGLTPEATNASLLGCMEDLSVNGQ RRGLREALLTRNMAAGCRLEEEYEDDAYGHYEAFTSLAPEAWP AMELPEPCVPEPGLPPVFANFTQLLTISPLVVAEGGTAWLEWRHV QPTLDLMEAE LRKSQVLF SVTRGARHGELELDIPGAQARKMFTLL DVVNRKARFIHDGSEDTS DQLVLEVSVTARVPMPSCLRRGQTYLL PIQVNPVNDPPHIFPHGSLMVILEHTQKPLGPEVFQAYDPDSACEG LTFQVLGTSSGLPVERRDQPGEPATEFSCRELEAGSLVYVHRGGPA QDLTFRVSDGLQASPPATLKVVAIRPAIQIHRSTGLRLAQGSAMPIL PANLSVETNAVVGQDVSVLFRVTGALQFGELQKQGAGGVEGAEW WATQAFHQRDVEQGRVRYLSTDPQHHA YDTVENLALEVQVGQEI LSNLSFPVTIQRATVWMLRLEPLHTQNTQQETLTTAHLEATLEEA GPSPPTFHYEVVQAPRKGNLQLQGTRLSDGQGFTQDDIQAGRVTY GATARASEAVEDTFRFRVTAPPYFSPLYTFPIHIGGDPDAPVL TNV LLVVPEGGEGVLSADHLFVKSLNSASYLYEVMERPRHGR LAWRG TQDKTTMVTSTFTNEDLLRGRLVYQHDDSETTEDDIPFVATRQGES SGDMAWEEVRGVFRVAIQPVNDHAPVQTISRIFHVARGGRLLTT DDVAFSDADSGFADAQLVLTRKDLLFGSIVAVDEPTRPIYRFTQED LRKRRVLFVHSGADRGWIQLQVSDGQHQA TALLEVQASEPYLRV ANGSSLVVPQGGQGTIDTAVLHLD TNLDIRSGDEVHYHV TAGPR WGQLVRAGQPATAFSQQDLLDGAVLYSHNGSLSPRDTMAFSVEA GPVHTDATLQVTIALEGPLAPLKLVRHKKIYVFQGEAAEIRRDQLE AAQEAVPPADIVFSVKSPPSAGYLMVSRGALADEPPSLDPVQSFS QEAVDTGRVLYLHSRPEAWSDAFSLDVASGLGAPLEGVLVELEV LPAAIPLEAQNF SVPEGGS LTLAPLLRVSGPYFPTLLGLSLQVLEP PQH GALQKEDGPQARTLSAFSWRMVEEQ LIRYVHDGSETLTDSFV LMANASEMDRQSHPVAF TVTVLPVNDQPPILTTNTGLQMWEGAT APIPAEALRSTDGDSGSEDLVYTIEQPSNGRVVLRGAPGTEVRSFT QAQLDGGGLVLF SHRGTL DGGFRFRLSDGEHTSPGHFFRVTAQKQV LLSLKGSQTLTVCPGSVQPLSSQTLRASSSAGTDPQLLLYRVVRGP QLGRLFHAQQDSTGEALVNFTQAEVYAGNILYEHMPPEPFWEA	320

10

20

30

40

0

20

30

40

【表 5 - 7】

表 5		
抗原	アミノ酸配列	配列番号
	LWGNFSYGSICSFHCLEGQLLNGSAQTACQENGHWSTTVPTCQA GPLTIQEALTYFGGAVASTIGLIMGGTLLALLRKRFRQKDDGKCPL NPHSHLGTYGVTNAAFDPSP	
CD200	MERLVIRMPFSLSTYSLVWVMAAVVLCTAQVQVVTQDEREQLY TPASLKCSLQNAQEALIVTWQKKKAVSPENMVTFSENHGVVIQPA YKDKINITQLGLQNSTITFWNITLEDEGCYMCLFNTFGFGKISGTA CLTVYVQPIVSLHYKFSEDHLNITCSATARPAPMVFWKVPRSGIEN STVTLSHPNGTTSVTSILHIKDPKNQVGKEVICQVLHLGTVTDFKQ TVNKGYWFSVPLLSIVSLVILLVLISILLYWKRHRNQDRGELSQG VQKMT	323
INSR	MATGGRRGAAAAPLLVAVAALLLGAAGHLYPGEVCPGMDIRNN LTRLHELENCVIEGHLQILLMFKTRPEDFRDLSFPKLIMITDYLLL FRVYGLESKDLFPNLTVIRGSRLFFNYALVIFEMVHLKELGLYNL MNITRGSVRIEKNNELCYLATIDWSRILDSVEDNYIVLNKDDNEEC GDICPGTAKGKTNCPATVINGQFVERCWTHSHCQKVCPTICKSHG CTAEGLCCHSECLGNCSQPDDPTKCVACRNFYLDGRCVETCPPPY YHFQDWRCVNFSCQDLHHKCKNSRRQGCHQYVIHNNKCIPECP SGYTMNSSNLLCTPCLGPCPKVCHLLEGEKTIDSVTSAQELRGCTV INGSLIINIRGGNNLAAELEANLGLIEEISGYLKIRRSYALVSLSFFR KLRLIRGETLEIGNYSFYALDNQNLRLQLWDWSKHNLITQGKLFF HYNPKLCLSEIHKMEEVSGTKGRQERNDIALKTNGDQASCENELL KFSYIRTSFDKILLRWEPYWPPDFRDLLGFMLFYKEAPYQNVTEFD GQDACGSNSWTVDIDPPLRSNDPKSQNHGWLMRGLKPWTQY AIFVKTLVTFSDERRTYGAKSDIIVVQTDATNPSVPLDPISVSNSSS QIILKWKPPSDPNGNITHYL VFWERQAEDSELFELDYCLKGLKLPS RTWSPPFESEDSQKHNSQSEYEDSAGECCSCPKTDSQILKELEESSFR KTFEDYLHN VVFPVPRKTSSGTGAEDPRPSRKRRSLGDVGNVTVA PTVAAFPNTSSTSVPTSPEEHRPFKEVVKESLVISGLRHFTGYRIE LQACNQDTPEERCSVAAYVSARTMPEAKADDIVGPVTHEIFENNV VHLMWQEPKEPNGLIVLYEVSYRRYGDEELHLCVSRKHFALE CRLRGLSPGNYSVRIRATSLAGNGSWTEPTYFYVTDYLDVPSNIA KIIIGPLIFVFLFSVIGSIYLFLRKRQPDGPLGLYASSNPEYLSASD VFPCSVYVPDEWEVSREKITLLRELQGSGFMVYEGNARDIIKGE AETRVAVKTVNESASLRERIEFLNEASVMKGFTCHHVRLLG VVS KGQPTLVVMELMAHGDLKSYLRSLRPEAENNPGRPPPTLQEMIQ MAAEIADGMAYLNAKKFVHRDLAARNCMVAHDFTVKIGDFGMT RDIYETDYYRKGGKGLLPVRWMAPESLKDGVFTTSSDMWSFGVV LWEITSLAEQPYQGLSNEQVLKFVMDGGYLDQPDNCPERVTDLM RMCWQFNPKMRPTFLEIVNLLKDDLHPSFPEVSFFHSEENKAPESE	324

10

20

30

40

【表 5 - 8】

表 5		
抗原	アミノ酸配列	配列番号
	ELEMEFEDMENVPLDRSSHQCREEAGGRDGGSSSLGFKRSYEEHIP YTHMNGGKKNRILTLPRSNPS	
ITGA6	MAAAGQLCLLYLSAGLLSRLGAAFNLDTREDNVIRKYGDPSLFG FSLAMHWQLQPEDKRLLLVGAPRAEALPLQRANRTGGLYSCDIT ARGPCTRIEFDNDADPTSESKEDQWMGVTVQSQGPGGKVVTCAH RYEKRQHVNTKQESRDIFGRCYVLSQNLRIEDDMDGGDWSFCDG RLRGHEKFGSCQQGVAATFTKDFHYIVFGAPGTYNWKGIVRVEQ KNNTFFDMNIFEDGPYEVGGETEHDLSVPVPANSYLGLLFLTSVS YTDPDQFVYKTRPPREQPDTFPDVMMNSYLGFSLDGSGKIVSKDE ITFVSGAPRANHSGAVVLLKRDMKSAHLLPEHIFDGEGLASSFGY DVAVVDLNDKGWQDIVIGAPQYFDRDGEVGGAVYVYMNQQGR WNNVKPIRLNGTKDSMFGIAVKNIGDINQDGYPDIAVGAPYDDL KVFIIYHGSANGINTKPTQVLKGISPYFGYSIAGNMDLDRNSYPDVA VGSLSDSVTIFRSRPVINIQKTITVTPNRIDLRQKTACGAPSGICLQV KSCFEYTANPAGYNPSISIVGTLEAEKERRKSGLSSRVQFRNQGSE PKYTQELTLKRQKQKVCMEETLWLQDNIRDKLRPIITASVEIQEP SSRRRVNSLPEVLPILNSDEPKTAHIDVHFLKEGCGDDNVCNSNLK LEYKFCTREGNQDKFSYLPIQKGVPELVLDQKDIALEITVTNSPS NPRNPTKDGDDAHEAKLIATFPDTLTYSAYRELRAFPEKQLSCVA NQNGSQADCELGNPFKRNSNVTFYLVLTTEVTFTDTPDLINLKLE TTSNQDNLAPITAKAKVVIELLLSVSGVAKPSQVYFGGTVVGEQA MKSEDEVGSLIEYEFRVINLGKPLTNLGTATLNIQWPKEISNGKWL LYLVKVESKGLEKVTCEPQKEINSLNLTESHNSRKKREITEKQIDD NRKFSLFAERKYQTLNCSVNVNCVNIRCPLRGLDSKASLILRSRLW NSTFLEEYSKLNLYLDILMRAFIDVTA AAENIRLPNAGTQVRVTVFP SKTVAQYSGVPWWIILVAILAGILMLALLVFILWKCGFFKRSRYD DSVPRYHAVRIRKEEREIKDEKYIDNLEKKQWITKWNENESYS	325
MELTF	MRGPSGALWLLALRTVLGGMEVRWCATSDPEQHKCGNMSEAF REAGIQPSLLCVRGTSADHCVQLIAAQEADAITLDGGAIYEAGKEH GLKPVVGEVYDQEVGTSYYAVAVVRRSSHVTIDTLKGVKSCHTGI NRTVGWNVPVGYLVESGRLSVMGCDVLKAVSDYFGGSCVPGAG ETSYSESLCRLCRGDSSGEGVCDKSPLERYDYDYGAFRCLAEGAG DVAFVKHSTVLENTDGKTLPSWGQALLSQDFELLCRDGSRADVT EWRQCHLARVPAHAVVVRADTDGGLIFRLLNEGQRLFSHEGSSSQ MFSSEAYGQKDLLFKDSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMKGL LCDPNRLPPYLRWCVLSTPEIQKCGDMAVAFRRQRLKPEIQCVA KSPQHCMERIQAEQVDAVTLSGEDIYTAGKTYGLVPAAGEHYAPE DSSNSYYVAVVRRDSSHAFTLDELRGKRSCHAGFGSPAGWDVP VGALIQRGFIRPKDCDVLTA VSEFFNASCVPVNNPKNYPSSLCALC	326

10

20

30

40

【表 5 - 9】

表 5		
抗原	アミノ酸配列	配列番号
	VGDEQGRNKC VGNSQERYYYGYRGAFRCLVENAGDVAFVRHTTV FDNTNGHNSEPWAAELRSEDYELLCPNGARAEVSQFAACNLAQIP PHAVMVRPDTNIFTVYGLLDKAQDLFGDDHNKNGFKMFDSSNYH GQDLLFKDATVRAVPVGEKTTYRGWLGLDYVAAALEGMSSQQCS GAAAPAPGAPLLPLLLPALAARLLPPAL	10
PECAM1	MQPRWAQGATMWLGVLTLTLLCSSLEGQENSFTINSVDMKSLPD WTVQNGKNLTLCFADVSTTSHVKPQHQMFLFYKDDVLFYNISSM KSTESYFIPEVRIYDSGTYKCTVIVNNKEKTTAEYQVLVEGVSPR VTLDKKEAIQGGIVRVNCSVPEEKAPIHFTIEKLELNEKMOVKLKRE KNSRDQNFVILEFPVEEQDRVLSFRCQARIISGIHMQTSESTKSELV TVTESFSTPKFHISPTGMIMEGAQLHIKCTIQVTHLAQEFPEIIIQKD KAIVAHNRHGNKAVYSVMAMVEHSGNYTCKVESSRISKVSSIVV NITELFSKPELESSFTHLDQGERLNLSCSIPGAPPANFTIQKEDTIVS QTQDFTKIASKSDSGTYICTAGIDKVVKKSNVTQIVVCEMLSQPRI SYDAQFEVIKGTIEVRCEISGTLPISYQLLKT SKVLENSTKNSND PAVFKDNPTEDVEYQCVADNCHSHAKMLSEVLRVKVIAPVDEVQ ISILSSKVVESGEDIVLQCAVNEGSGPITYKFYREKEGKPFYQMTSN ATQAFWTKQKASKEQEGEYYCTAFNRANHASSVPRSKILT VRVIL APWKKGLIAVVIIGVIALLIIAAKCYFLRKAKAKQMPVEMSRPAV PLLNSNNEKMSDPNMEANSHYGHND DVRNHAMKPINDNKEPLNS DVQYTEVQVSSAESHKDLGKKDTETVYSEVRKAVPDAVESRYSR TEGSLDGT	327 20 30
SLC1A5	MVADPPRDSKGLAAAEPTANGGLALASIEDQGAAAGGYCGSRDQ VRRCLRANLLVLLTVVAVVAGVALGLGVSGAGGALALGPERLSA FVFPGELLRLRLRMILPLVVC SLIGGAASLDPGALGRLGAWALLF FLVTLLASALGVGLALALQPGAASAAINASVGAAGSAENAPSKE VLDSFLDLARNIFPSNLVSAAFRSYSTTYEERNITGTRVKVPVGQE VEGMNILGLVVFAIVFGVALRKLGP EGELLIRFFNSFNEATMVLVS WIMWYAPVGIMFLVAGKIVEMEDVGLLFARLGKYILCCLLGHAIH GLLVPLIYFLFTRKNPYRFLWGIVTPLATAFGTSSSSATLPLMMK CVEENNGVAKHISR FILPIGATVNMDGAALFQCVA AVFIAQLSQQS LDFVKIITILVTATASSVGAAGIPAGGVLT LAIILEAVNLPVDHISLIL AVDWLVDRSCTVLNVEGDALGAGLLQNYVDRTESRSTEP ELIQV KSELPLDPLPVPTEEGNPLLKHYRGPAGDATVASEKESVM	328 40

【0189】

Fcドメイン内では、CD16結合が、ヒンジ領域およびCH2ドメインによって媒介される。例えば、ヒトIgG1内では、CD16との相互作用が、アミノ酸残基Asp265-Glu269、Asn297-Thr299、Ala327-Ile332、Leu234-Ser239、およびCH2ドメイン中の炭水化物残基N-アセチル-D-グルコサミンに主に集中している (Sondermann et al., Nature

、 406 (6793) : 267-273 参照)。公知のドメインに基づいて、例えば、ファージディスプレイライブラリーもしくは酵母表面ディスプレイ cDNA ライブラリーを使用することにより、CD16 に対する結合親和性を増強もしくは減少させるように変異を選択することができる、または相互作用の公知の三次元構造に基づいて変異を設計することができる。

【0190】

ヘテロ二量体抗体重鎖の組立は、同じ細胞中で2つの異なる抗体重鎖配列を発現させることにより達成することができるが、これは各抗体重鎖のホモ二量体の組立ならびにヘテロ二量体の組立をもたらし得る。ヘテロ二量体の優先的な組立の促進は、US13/494870、US16/028850、US11/533709、US12/875015、US13/289934、US14/773418、US12/811207、US13/866756、US14/647480 および US14/830336 に示されるように、各抗体重鎖定常領域の CH3 ドメイン中に異なる変異を組み込むことにより達成することができる。例えば、ヒト IgG1 に基づく CH3 ドメインで、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドが互いに選択的にヘテロ二量体化することを可能にするアミノ酸置換の異なるペアをこれらの2つの鎖内に組み込んで、変異を導入することができる。以下に例示されるアミノ酸置換の位置は全て Kabat のように EU インデックスに従って番号付けされている。

【0191】

1つのシナリオでは、第1のポリペプチド中のアミノ酸置換が元のアミノ酸をアルギニン(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)から選択されるより大きなアミノ酸で置き換え、第2のポリペプチド中の少なくとも1つのアミノ酸置換が元のアミノ酸(複数可)をアラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)またはバリン(V)から選択されるより小さなアミノ酸(複数可)で置き換えて、結果としてより大きなアミノ酸置換(突出部)がより小さなアミノ酸置換(窪み)の表面にはまる。例えば、一方のポリペプチドが T366W 置換を組み込むことができ、他方が T366S、L368A および Y407V を含む3つの置換を組み込むことができる。

【0192】

本発明の抗体重鎖可変ドメインを、必要に応じて、CH1 ドメインを含むまたは含まない、ヒンジ、CH2 および CH3 ドメインを含む IgG 定常領域などの抗体定常領域と少なくとも90%同一のアミノ酸配列に連結することができる。一部の実施形態では、定常領域のアミノ酸配列は、ヒト IgG1 定常領域、IgG2 定常領域、IgG3 定常領域または IgG4 定常領域などのヒト抗体定常領域と少なくとも90%同一である。一部の他の実施形態では、定常領域のアミノ酸配列は、ウサギ、イヌ、ネコ、マウスまたはウマなどの別の哺乳動物の抗体定常領域と少なくとも90%同一である。ヒト IgG1 定常領域と比較して、例えば、Q347、Y349、L351、S354、Q352、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405、Y407、K409、T411 および/または K439 で、1つまたは複数の変異を定常領域に組み込むことができる。例示的な置換としては、例えば、Q347E、Q347R、Y349S、Y349K、Y349T、Y349D、Y349E、Y349C、T350V、L351K、L351D、L351Y、Q347R、S354C、E356K、E357Q、E357L、E357W、K360E、K360W、Q362E、S364K、S364E、S364H、S364D、T366V、T366I、T366L、T366M、T366K、T366W、T366S、L368E、L368A、L368D、K370S、N390D、N390E、K392L、K392M、K392V、K392F、K392D、K392E、T394F、T394W、D399R、D399K、D399V、S400K、S400R、D401K、F405A、F405T、F405L、Y407A、Y407I、Y407V、K409F、K409W、K409D、T411D、T411E、K439D および K439E が挙げられる。

【0193】

ある特定の実施形態では、ヒト IgG1 定常領域の CH1 に組み込むことができる変異は、アミノ酸 V125、F126、P127、T135、T139、A140、F170、P171 および／または V173 にあり得る。ある特定の実施形態では、ヒト IgG1 定常領域の Cκ に組み込むことができる変異は、アミノ酸 E123、F116、S176、V163、S174 および／または T164 にあり得る。

【0194】

あるいは、アミノ酸置換を、表 6 に示される以下の置換のセットから選択することができる。

【表 6 - 1】

10

表 6		
	第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
セット1	S364E/F405A	Y349K/T394F
セット2	S364H/D401K	Y349T/T411E
セット3	S364H/T394F	Y349T/F405A
セット4	S364E/T394F	Y349K/F405A
セット5	S364E/T411E	Y349K/D401K
セット6	S364D/T394F	Y349K/F405A
セット7	S364H/F405A	Y349T/T394F
セット8	S364K/E357Q	L368D/K370S
セット9	L368D/K370S	S364K
セット10	L368E/K370S	S364K
セット11	K360E/Q362E	D401K
セット12	L368D/K370S	S364K/E357L
セット13	K370S	S364K/E357Q
セット14	F405L	K409R

20

【表 6 - 2】

30

セット15	K409R	F405L
-------	-------	-------

【0195】

あるいは、アミノ酸置換を、表 7 に示される以下の置換のセットから選択することができる。

40

【表 7】

表 7		
	第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
セット1	K409W	D399V/F405T
セット2	Y349S	E357W
セット3	K360E	Q347R
セット4	K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
セット5	Q347E/K360E/K409W	Q347R/D399V/F405T
セット6	Y349S/K409W	E357W/D399V/F405T

10

【0196】

あるいは、アミノ酸置換を、表8に示される以下の置換のセットから選択することができる。

【表 8】

表 8		
	第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
セット1	T366K/L351K	L351D/L368E
セット2	T366K/L351K	L351D/Y349E
セット3	T366K/L351K	L351D/Y349D
セット4	T366K/L351K	L351D/Y349E/L368E
セット5	T366K/L351K	L351D/Y349D/L368E
セット6	E356K/D399K	K392D/K409D

20

30

【0197】

あるいは、各ポリペプチド鎖中の少なくとも1つのアミノ酸置換を表9から選択することができる。

【表 9-1】

表 9	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F K392D, K392E,

40

【表 9-2】

	K409F, K409W, T411D および T411E
--	----------------------------------

【0198】

50

あるいは、少なくとも1つのアミノ酸置換を、第1のポリペプチドの列に示される位置（複数可）が任意の公知の負に帯電したアミノ酸によって置き換えられ、第2のポリペプチドの列に示される位置（複数可）が任意の公知の正に帯電したアミノ酸によって置き換えられている、表10の以下の置換のセットから選択することができる。

【表10】

表 10	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
K392, K370, K409, または K439	D399, E356, または E357

10

【0199】

あるいは、少なくとも1つのアミノ酸置換を、第1のポリペプチドの例に示される位置（複数可）が任意の公知の正に帯電したアミノ酸によって置き換えられ、第2のポリペプチドの列に示される位置（複数可）が任意の公知の負に帯電したアミノ酸によって置き換えられている、表11の以下のセットから選択することができる。

【表11】

表 11	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
D399, E356, または E357	K409, K439, K370, または K392

20

【0200】

あるいは、アミノ酸置換を表12の以下のセットから選択することができる。

【表12】

表 12	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
T350V, L351Y, F405A, および Y407V	T350V, T366L, K392L, および T394W

30

【0201】

あるいは、またはさらに、第1または第2のポリペプチド鎖のいずれかにS354C、および反対側のポリペプチド鎖にY349Cを導入して、2つのポリペプチドの界面内に人工的なジスルフィド架橋を形成することにより、ヘテロ多量体タンパク質の構造的安定性を増加させることができる。

【0202】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、位置T366でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366、L368およびY407からなる群から選択される1つまたは複数の位置でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

40

【0203】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T366、L368およびY407からなる群から選択される1つまたは複数の位置でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、位置T366でIgG1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0204】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、E357、K360、Q362、S364、L368、K370、T394、D401、F405およびT411からなる群から選択される1つまたは複数の位置でIgG1定常領域の

50

アミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9、E 3 5 7、S 3 6 4、L 3 6 8、K 3 7 0、T 3 9 4、D 4 0 1、F 4 0 5およびT 4 1 1からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0205】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9、E 3 5 7、S 3 6 4、L 3 6 8、K 3 7 0、T 3 9 4、D 4 0 1、F 4 0 5およびT 4 1 1からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、E 3 5 7、K 3 6 0、Q 3 6 2、S 3 6 4、L 3 6 8、K 3 7 0、T 3 9 4、D 4 0 1、F 4 0 5およびT 4 1 1からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

10

【0206】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、L 3 5 1、D 3 9 9、S 4 0 0およびY 4 0 7からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6、N 3 9 0、K 3 9 2、K 4 0 9およびT 4 1 1からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0207】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6、N 3 9 0、K 3 9 2、K 4 0 9およびT 4 1 1からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、L 3 5 1、D 3 9 9、S 4 0 0およびY 4 0 7からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

20

【0208】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Q 3 4 7、Y 3 4 9、K 3 6 0およびK 4 0 9からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Q 3 4 7、E 3 5 7、D 3 9 9およびF 4 0 5からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

30

【0209】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Q 3 4 7、E 3 5 7、D 3 9 9およびF 4 0 5からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9、K 3 6 0、Q 3 4 7およびK 4 0 9からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0210】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、K 3 7 0、K 3 9 2、K 4 0 9およびK 4 3 9からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、D 3 5 6、E 3 5 7およびD 3 9 9からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

40

【0211】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、D 3 5 6、E 3 5 7およびD 3 9 9からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、K 3 7 0、K 3 9 2、K 4 0 9およびK 4 3 9からなる群から選択される1つまたは複数の位置でI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0212】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、L 3 5

50

1、E 3 5 6、T 3 6 6 および D 3 9 9 からなる群から選択される 1 つまたは複数の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9、L 3 5 1、L 3 6 8、K 3 9 2 および K 4 0 9 からなる群から選択される 1 つまたは複数の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0 2 1 3】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9、L 3 5 1、L 3 6 8、K 3 9 2 および K 4 0 9 からなる群から選択される 1 つまたは複数の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、L 3 5 1、E 3 5 6、T 3 6 6 および D 3 9 9 からなる群から選択される 1 つまたは複数の位置で I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

10

【0 2 1 4】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、S 3 5 4 C 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9 C 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0 2 1 5】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Y 3 4 9 C 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、S 3 5 4 C 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

20

【0 2 1 6】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、K 3 6 0 E および K 4 0 9 W 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0 2 1 7】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、K 3 6 0 E および K 4 0 9 W 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

30

【0 2 1 8】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6 W 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6 S、T 3 6 8 A および Y 4 0 7 V 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0 2 1 9】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6 S、T 3 6 8 A および Y 4 0 7 V 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 6 6 W 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

40

【0 2 2 0】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 5 0 V、L 3 5 1 Y、F 4 0 5 A および Y 4 0 7 V 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、K 3 9 2 L および T 3 9 4 W 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なる。

【0 2 2 1】

一部の実施形態では、抗体定常領域の一方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 5 0 V、T 3 6 6 L、K 3 9 2 L および T 3 9 4 W 置換によって I g G 1 定常領域のアミノ酸配列と異なり、抗体定常領域の他方のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は、T 3 5 0 V、

50

L 3 5 1 Y、F 4 0 5 AおよびY 4 0 7 V置換によってI g G 1定常領域のアミノ酸配列と異なる。

例示的な多重特異性結合タンパク質

【0222】

本開示のT r i N K E Tは、その配列が以下で提供される（C D R（C h o t h i a ナンバリング）には下線を引く）、A 4 9 M I－F 3'－T r i N K E T－エノブリツズマブである。

【0223】

A 4 9 M I－F 3'－T r i N K E T－エノブリツズマブは、A l a－S e rを含むヒンジを介してF cドメインに連結した、B 7－H 3に結合する、エノブリツズマブに由来する一本鎖可変領域断片（s c F v）（配列番号329）（s c F v－F cポリペプチドの配列は配列番号330によって表される）と；重鎖可変ドメイン（配列番号351）およびC H 1ドメインを含む重鎖部分ならびに軽鎖可変ドメイン（配列番号86）および軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分を含む、A 4 9 M Iに由来するN K G 2 D結合F a b断片とを含み、重鎖可変ドメインはC H 1ドメインに接続されており、C H 1ドメインはF cドメインに接続されており、B 7－H 3結合s c F vに連結しているF cドメインと二量体を形成する。

【0224】

B 7－H 3結合s c F vは、（G₄S）₄リンカーによってエノブリツズマブの軽鎖可変ドメインに接続されたエノブリツズマブの重鎖可変ドメインを含む。s c F v（配列番号329）の重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインはV L－（G₄S）₄－V Hとして接続されており；V LおよびV Hは、それぞれ、Q 1 0 0 CおよびG 4 4 C置換の結果として1 0 0 V L－4 4 V H S－S架橋を含有する。以下の配列番号329および配列番号330のアミノ酸配列中、システイン残基は太字イタリックで下線を引いており、（G₄S）₄リンカー（G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S、配列番号126）は太字で下線を引いている。

エノブリツズマブs c F v

【化7-1】

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVDTNVAWYQKPGKAPKALIIYSASYRYS
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGCGTKLEIKGGGGSGG
GGSGGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSGMHWRQAPG

【化7-2】

KCLEWVAYISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGR
GRENIYYGSRLDYWGQGTTVTVSS

（配列番号：329）

【0225】

配列番号330は、A l a－S e rを含むヒンジを介してF cドメインに連結したB 7－H 3結合s c F v（s c F v－F c）の完全配列を表す。s c F vに連結したF cドメインは、以下の配列中で、太字で下線を引いた、Q 3 4 7 R、D 3 9 9 VおよびF 4 0 5 T置換を含む。このF cドメインは、太字イタリックで下線を引いたS 3 5 4 C置換をさらに含む。

エノブリツズマブs c F v－F c

【化 8】

DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQNVDTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYRYS
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGCGTKLEIKGGGSGG
 GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWRQAPG
 KCLEWVAYISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGR
 GRENIYYGSRLDYWGQGTTVTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
 YKTPPVVLVSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号：330)

【0226】

配列番号331は、Fcドメインに接続された、NKG2D結合部位の重鎖可変ドメイン（配列番号351）およびCH1ドメインを含む、A49MIに由来するFab断片の重鎖部分を表す。配列番号331中のFcドメインは、B7-H3結合scFv（配列番号330）に連結したFc上のS354C置換とジスルフィド結合を形成する、CH3ドメイン中のY349C置換を含む。配列番号331中、FcドメインはK360EおよびK409W置換も含む。

A49MI V_H

【化 9】

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYI
 YYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWG
 QGTLVTVSS

(配列番号：351)

A49MI V_H - CH1 - Fc

【化 10-1】

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYI
 YYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAPIGAAAGWFDPWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI

【化 10-2】

SKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTEENQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSWLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号：331)

【0227】

配列番号332は、NKG2D結合部位の軽鎖可変ドメイン（配列番号86）および軽鎖定常ドメインを含む配列である、A49MI由来のFab断片の軽鎖部分を表す。

A49MI V_L

【化 11】

DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGTKVEIK

(配列番号：86)

A49MI V_L - CL

【化 1 2】

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG
VPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQGVSFPRTFGGGKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号：332)

【0228】

ある特定の実施形態では、本開示の T r i N K E T は、N K G 2 D 結合 F a b 断片に連結した F c ドメインが Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T の置換を含み、エノブリ
ツズマブ s c F v に連結した F c ドメインがヘテロ二量体を形成するためにマッチング置
換 K 3 6 0 E および K 4 0 9 W を含むことを除いて、A 4 9 M I - F 3 ' - T r i N K E
T - エノブリツズマブと同一である。ある特定の実施形態では、本開示の T r i N K E T
は、N K G 2 D 結合 F a b 断片に連結した F c ドメインが C H 3 ドメイン中に S 3 5 4 C
置換を含み、エノブリツズマブ s c F v に連結した F c ドメインがジスルフィド結合を形
成するために C H 3 ドメイン中にマッチング Y 3 4 9 C 置換を含むことを除いて、A 4 9
M I - F 3 ' - T r i N K E T - エノブリツズマブと同一である。

10

【0229】

本開示の別の T r i N K E T は、その配列が以下で提供される (C D R (C h o t h i
a ナンバリング) には下線を引く)、A 4 9 M I - F 3 ' - T r i N K E T - h u M 3 0
である。

20

【0230】

A 4 9 M I - F 3 ' - T r i N K E T - h u M 3 0 は、A l a - S e r を含むヒンジを
介して F c ドメインに連結した、B 7 - H 3 に結合する、h u M 3 0 に由来する s c F v
(配列番号 335) (s c F v - F c ポリペプチドの配列は配列番号 336 によって表さ
れる) と；重鎖可変ドメイン (配列番号 351) および C H 1 ドメインを含む重鎖部分な
らびに軽鎖可変ドメイン (配列番号 86) および軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分を含
む、A 4 9 M I に由来する N K G 2 D 結合 F a b 断片とを含み、重鎖可変ドメインは C H 1
ドメインに接続されており、C H 1 ドメインは F c ドメインに接続されており、B 7 - H
3 結合 s c F v に連結している F c ドメインと二量体を形成する。

30

【0231】

B 7 - H 3 結合 s c F v は、(G ₄ S) ₄ リンカーによって h u M 3 0 の軽鎖可変ドメ
インに接続された h u M 3 0 の重鎖可変ドメインを含む。s c F v (配列番号 335) の
重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインは V L - (G ₄ S) ₄ - V H として接続されて
おり；V L および V H は、それぞれ、Q 1 0 0 C および G 4 4 C 置換の結果として 1 0 0
V L - 4 4 V H S - S 架橋を含有する。以下の配列番号 335 および配列番号 336 の
アミノ酸配列中、システイン残基は太字イタリックで下線を引いており、(G ₄ S) ₄ リ
ンカー (G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S、配列番号 126) は太字で下線を
引いている。

h u M 3 0 s c F v

40

【化 1 3】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPA
RFSGSGSGTDFLTITSLLEPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYYVMHWVRQAPGQC
LEWMGYINPYNDLVKYNKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWG
YYGSPLYFYFDYWGQGLTVTVSS

(配列番号：335)

【0232】

配列番号 336 は、A l a - S e r を含むヒンジを介して F c ドメインに連結した B 7

50

－H 3 結合 $s c F v$ ($s c F v - F c$) の完全配列を表す。 $s c F v$ に連結した $F c$ ドメインは、以下の配列中で、太字で下線を引いた、Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T 置換を含む。この $F c$ ドメインは、太字イタリックで下線を引いた S 3 5 4 C 置換をさらに含む。

h u M 3 0 $s c F v - F c$

【化 1 4】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSRLIYMHWYQQKPGQAPRPLIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQWNSNPPTFGCGTKVEIKGGGSGGGGS
GGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYVMHWVRQAPGQC
 LEWMGYINPYNDDDVKYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARW
YYGSPLYYFDYWGGQGLVTVSS

AS

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPRVYTLPPCRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLYSDGSFTLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号：3 3 6)

【0 2 3 3】

上記の配列番号 3 3 1 は、 $F c$ ドメインに接続された、NKG 2 D 結合部位の重鎖可変ドメイン (配列番号 3 5 1) および CH 1 ドメインを含む、A 4 9 M I に由来する Fab 断片の重鎖部分を表す。配列番号 3 3 1 中の $F c$ ドメインは、B 7－H 3 結合 $s c F v$ (配列番号 3 3 6) に連結した $F c$ 上の S 3 5 4 C 置換とジスルフィド結合を形成する、CH 3 ドメイン中の Y 3 4 9 C 置換を含む。配列番号 3 3 1 中、 $F c$ ドメインは K 3 6 0 E および K 4 0 9 W 置換も含む。

【0 2 3 4】

上記の配列番号 3 3 2 は、NKG 2 D 結合部位の軽鎖可変ドメイン (配列番号 8 6) および軽鎖定常ドメインを含む、A 4 9 M I 由来の Fab 断片の軽鎖部分を表す。

【0 2 3 5】

ある特定の実施形態では、本開示の T r i N K E T は、NKG 2 D 結合 Fab 断片に連結した $F c$ ドメインが Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T の置換を含み、h u M 3 0 $s c F v$ に連結した $F c$ ドメインがヘテロ二量体を形成するためにマッチング置換 K 3 6 0 E および K 4 0 9 W を含むことを除いて、A 4 9 M I－F 3'－T r i N K E T－h u M 3 0 と同一である。ある特定の実施形態では、本開示の T r i N K E T は、NKG 2 D 結合 Fab 断片に連結した $F c$ ドメインが CH 3 ドメイン中に S 3 5 4 C 置換を含み、h u M 3 0 $s c F v$ に連結した $F c$ ドメインがジスルフィド結合を形成するために CH 3 ドメイン中にマッチング Y 3 4 9 C 置換を含むことを除いて、A 4 9 M I－F 3'－h u M 3 0 と同一である。

【0 2 3 6】

本開示の別の T r i N K E T は、その配列が以下で提供される (CDR (C h o t h i a ナンバリング) には下線を引く)、A 4 9 M I－F 3'－T r i N K E T－h u A b 1 3 v 1 である。

【0 2 3 7】

A 4 9 M I－F 3'－T r i N K E T－h u A b 1 3 v 1 は、A l a－S e r を含むヒンジを介して $F c$ ドメインに連結した、B 7－H 3 に結合する、h u A b 1 3 v 1 に由来する $s c F v$ (配列番号 3 3 3) ($s c F v - F c$ ポリペプチドの配列は配列番号 3 3 4 によって表される) と；重鎖可変ドメイン (配列番号 3 5 1) および CH 1 ドメインを含む重鎖部分ならびに軽鎖可変ドメイン (配列番号 8 6) および軽鎖定常ドメインを含む軽鎖部分を含む、A 4 9 M I に由来する NKG 2 D 結合 Fab 断片とを含み、重鎖可変ドメインは CH 1 ドメインに接続されており、CH 1 ドメインは $F c$ ドメインに接続されてお

10

20

30

40

50

【 0 2 3 8 】

10

【化 1 5】

(配列番号：3 3 3)

【 0 2 3 9 】

20

【化 1 6】

30

(配列番号：3 3 4)

【 0 2 4 0 】

40

【 0 2 4 1 】

【 0 2 4 2 】

ある特定の実施形態では、本開示の T r i N K E T は、N K G 2 D 結合 F a b 断片に連結した F c ドメインが Q 3 4 7 R、D 3 9 9 V および F 4 0 5 T の置換を含み、h u A b 1 3 v 1 s c F v に連結した F c ドメインがヘテロ二量体を形成するためにマッチング置換 K 3 6 0 E および K 4 0 9 W を含むことを除いて、A 4 9 M I - F 3 ' - T r i N K E T - h u A b 1 3 v 1 と同一である。ある特定の実施形態では、本開示の T r i N K E T は、N K G 2 D 結合 F a b 断片に連結した F c ドメインが C H 3 ドメイン中に S 3 5 4 C 置換を含み、h u A b 1 3 v 1 s c F v に連結した F c ドメインがジスルフィド結合を形成するために C H 3 ドメイン中にマッチング Y 3 4 9 C 置換を含むことを除いて、A 4 9 M I - F 3 ' - T r i N K E T - h u A b 1 3 v 1 と同一である。

【0243】

上記の多重特異性タンパク質は、当業者に周知の組換え D N A 技術を使用して作製することができる。例えば、第 1 の免疫グロブリン重鎖をコードする第 1 の核酸配列を第 1 の発現ベクターにクローニングすることができ；第 2 の免疫グロブリン重鎖をコードする第 2 の核酸配列を第 2 の発現ベクターにクローニングすることができ；免疫グロブリン軽鎖をコードする第 3 の核酸配列を第 3 の発現ベクターにクローニングすることができ；第 1、第 2 および第 3 の発現ベクターを一緒に宿主細胞に安定的にトランスフェクトして、多量体タンパク質を生成することができる。

【0244】

多重特異性タンパク質の最高収量を達成するために、異なる比の第 1、第 2 および第 3 の発現ベクターを調査して、宿主細胞へのトランスフェクションのための最適な比を決定することができる。トランスフェクション後、限界希釈、E L I S A、F A C S、顕微鏡法または C l o n e p i x などの当技術分野で公知の方法を使用して、単一クローンを細胞バンク生成のために単離することができる。

【0245】

クローンを、バイオリアクタースケールアップおよび多重特異性タンパク質の維持された発現に適した条件下で培養することができる。遠心分離、深層濾過、細胞溶解、ホモジナイゼーション、凍結-解凍、アフィニティ精製、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用交換クロマトグラフィーおよび混合モードクロマトグラフィーを含む当技術分野で公知の方法を使用して、多重特異性タンパク質を単離および精製することができる。

I I . 多重特異性タンパク質の特徴

【0246】

本明細書に記載される多重特異性タンパク質は、N K G 2 D 結合部位に結合する抗原結合部位と、B 7 - H 3 に結合する抗原結合部位と、C D 1 6 に結合するのに十分な抗体 F c ドメインもしくはその部分、または C D 1 6 に結合する抗原結合部位とを含有する。一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、F 4 - T r i N K E T フォーマットで例示されるように、B 7 - H 3 に結合する追加の抗原結合部位を含有する。

【0247】

一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、対応する B 7 - H 3 モノクローナル抗体、すなわち、多重特異性タンパク質に組み込まれるものと同じ B 7 - H 3 結合部位を含有するモノクローナル抗体と類似の熱安定性を示す。

【0248】

一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、N K 細胞などの N K G 2 D および／または C D 1 6 を発現している細胞と B 7 - H 3 を発現している腫瘍細胞に同時に結合する。N K 細胞への多重特異性タンパク質の結合によって、腫瘍細胞の破壊に向けた N K 細胞の活性が増強され得る。

【0249】

一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、対応する B 7 - H 3 モノクローナル抗体（すなわち、多重特異性タンパク質に組み込まれるものと同じ B 7 - H 3 結合部位を含有するモノクローナル抗体）と類似の親和性で B 7 - H 3 に結合する。一部の実施形態で

は、多重特異性タンパク質は、対応する B 7-H 3 モノクローナル抗体よりも、B 7-H 3 を発現している腫瘍細胞の殺滅において有効である。

【0250】

一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、B 7-H 3 を発現している細胞と共培養すると、初代ヒト NK 細胞を活性化する。NK 細胞活性化は、CD 107a 脱顆粒および IFN- γ サイトカイン産生の増加によって示される。さらに、対応する B 7-H 3 モノクローナル抗体と比較して、多重特異性タンパク質は、B 7-H 3 を発現している細胞の存在下で、ヒト NK 細胞の優れた活性化を示すことができる。

【0251】

一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、B 7-H 3 を発現している細胞と共培養すると、静止および IL-2 活性化ヒト NK 細胞の活性を増強する。

【0252】

一部の実施形態では、B 7-H 3 に結合する対応するモノクローナル抗体と比較して、多重特異性タンパク質は、中レベルおよび低レベルの B 7-H 3 を発現する腫瘍細胞の標的化において利点を提供する。

【0253】

一部の実施形態では、TriNKET の二価 F 4 フォーマット（すなわち、TriNKET は、B 7-H 3 に結合する追加の抗原結合部位を含む）は、TriNKET が B 7-H 3 に結合する結合活性を改善し、事実上、腫瘍細胞表面上の高レベルの B 7-H 3 の発現および維持を安定化する。一部の実施形態では、F 4-TriNKET は、対応する F 3-TriNKET または F 3'-TriNKET よりも強力な B 7-H 3 発現腫瘍細胞の殺滅を媒介する。

【0254】

一部の実施形態では、本明細書に記載される多重特異性タンパク質は、NK G 2 D 結合部位に結合する抗原結合部位と、L 1 C A M に結合する抗原結合部位と、CD 16 に結合するのに十分な抗体 F c ドメインもしくはその部分、または CD 16 に結合する抗原結合部位とを含有する。一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、F 4-TriNKET フォーマットで例示されるように、L 1 C A M に結合する追加の抗原結合部位を含有する。

【0255】

一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、対応する L 1 C A M モノクローナル抗体、すなわち、多重特異性タンパク質に組み込まれるものと同じ L 1 C A M 結合部位を含有するモノクローナル抗体と類似の熱安定性を示す。

【0256】

一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、NK 細胞などの NK G 2 D および／または CD 16 を発現している細胞と L 1 C A M を発現している腫瘍細胞に同時に結合する。NK 細胞への多重特異性タンパク質の結合によって、腫瘍細胞の破壊に向けた NK 細胞の活性が増強され得る。

【0257】

一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、対応する L 1 C A M モノクローナル抗体（すなわち、多重特異性タンパク質に組み込まれるものと同じ L 1 C A M 結合部位を含有するモノクローナル抗体）と類似の親和性で L 1 C A M に結合する。一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、対応する L 1 C A M モノクローナル抗体よりも、L 1 C A M を発現している腫瘍細胞の殺滅において有効である。

【0258】

一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、L 1 C A M を発現している細胞と共培養すると、初代ヒト NK 細胞を活性化する。NK 細胞活性化は、CD 107a 脱顆粒および IFN- γ サイトカイン産生の増加によって示される。さらに、対応する L 1 C A M モノクローナル抗体と比較して、多重特異性タンパク質は、L 1 C A M を発現している細胞の存在下で、ヒト NK 細胞の優れた活性化を示すことができる。

10

20

30

40

50

【0259】

一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、L1CAMを発現している細胞と共培養すると、静止およびIL-2活性化ヒトNK細胞の活性を増強する。

【0260】

一部の実施形態では、L1CAMに結合する対応するモノクローナル抗体と比較して、多重特異性タンパク質は、中レベルおよび低レベルのL1CAMを発現する腫瘍細胞の標的化において利点を提供する。

【0261】

一部の実施形態では、Tr iNKETの二価F4フォーマット（すなわち、Tr iNKETがL1CAMに結合する追加の抗原結合部位を含む）は、Tr iNKETがL1CAMに結合する結合活性を改善し、事実上、腫瘍細胞表面上の高レベルのL1CAMの発現および維持を安定化する。一部の実施形態では、F4-Tr iNKETは、対応するF3-Tr iNKETまたはF3'-Tr iNKETよりも強力なL1CAM発現腫瘍細胞の殺滅を媒介する。

【0262】

一部の実施形態では、本明細書に記載される多重特異性タンパク質は、NKG2D結合部位、CD16結合部位、およびFLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5結合部位を含む。一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、NK細胞などのNKG2Dおよび／またはCD16を発現している細胞とFLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5を発現している腫瘍細胞に同時に結合する。NK細胞への多重特異性タンパク質の結合によって、腫瘍細胞の破壊に向けたNK細胞の活性が増強され得る。

【0263】

一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、対応するFLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5モノクローナル抗体（すなわち、多重特異性タンパク質に組み込まれるものと同じ抗原結合部位を含有するモノクローナル抗体）と類似の親和性でFLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5に結合する。一部の実施形態では、多重特異性タンパク質は、対応するFLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5モノクローナル抗体よりも、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5を発現している腫瘍細胞の殺滅において有効である。

【0264】

ある特定の実施形態では、NKG2D結合部位およびFLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5の結合部位を含む、本明細書に記載される多重特異性タンパク質は、それぞれ、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5を発現している細胞と共培養すると、初代ヒトNK細胞を活性化する。NK細胞活性化は、CD107a脱顆粒およびIFN-γサイトカイン産生の増加によって示される。さらに、対応するFLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5モノクローナル抗体と比較して、多重特異性タンパク質は、それぞれ、FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HHF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1また

は S L C 1 A 5 を発現している細胞の存在下で、ヒト N K 細胞の優れた活性化を示すことができる。

【0265】

ある特定の実施形態では、N K G 2 D 結合部位および F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R (H H F 5)、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1 または S L C 1 A 5 の結合部位を含む、本明細書に記載される多重特異性タンパク質は、それぞれ、F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R (H H F 5)、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1 または S L C 1 A 5 を発現している細胞と共培養された、静止および I L - 2 活性化ヒト N K 細胞の活性を増強する。

10

【0266】

ある特定の実施形態では、F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R (H H F 5)、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1 または S L C 1 A 5 に結合する対応するモノクローナル抗体と比較して、多重特異性タンパク質は、それぞれ、中レベルおよび低レベルの F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R (H H F 5)、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1 または S L C 1 A 5 を発現する腫瘍細胞の標的化において利点を提供する。

I I I . 治療用途

【0267】

本発明は、本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質および／または本明細書に記載される医薬組成物を使用して、がんを処置する方法を提供する。本方法を使用して、B 7 - H 3 を発現しているさまざまながんを処置することができる。一部の実施形態では、がんは、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、神経膠芽腫、頭頸部がん、肺がん、肝臓がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、肉腫、腎がん、結腸直腸がん、胃がん、神経芽細胞腫、扁平上皮癌または急性骨髄性白血病 (A M L) である。

20

【0268】

一部の他の実施形態では、処置されるがんは、B 細胞リンパ腫または T 細胞リンパ腫などの非ホジキンリンパ腫である。ある特定の実施形態では、非ホジキンリンパ腫は、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、原発性縦隔 B 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯 B 細胞リンパ腫、節外性辺縁帯 B 細胞リンパ腫、節性辺縁帯 B 細胞リンパ腫、脾辺縁帯 B 細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、有毛細胞白血病または中枢神経系 (C N S) 原発リンパ腫などの B 細胞リンパ腫である。ある特定の他の実施形態では、非ホジキンリンパ腫は、前駆 T リンパ芽球性リンパ腫、末梢性 T 細胞リンパ腫、皮膚 T 細胞リンパ腫、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫、節外性ナチュラルキラー / T 細胞リンパ腫、腸管症型 T 細胞性リンパ腫、皮下脂肪織炎様 T 細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫または末梢性 T 細胞リンパ腫などの T 細胞リンパ腫である。

30

【0269】

本発明は、本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質および／または本明細書に記載される医薬組成物を使用して、がんを処置する方法を提供する。本方法を使用して、L 1 C A M を発現しているさまざまながんを処置することができる。一部の実施形態では、がんは、膀胱がん、腎がん、乳がん、子宮頸がん、肉腫、肺がん、頭頸部がん、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、黒色腫、卵巣がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、消化管間質腫瘍 (G I S T)、胆管癌、結腸直腸がん、膵臓がんまたは前立腺がんである。

40

【0270】

本発明は、本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質および／または本明細書に記載される医薬組成物を使用して、がんを処置する方法を提供する。一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質および／または本明細書に記載される医薬組成物を使用して、がんおよび／または新生血管を処置する方法を提供す

50

る。本方法を使用して、（例えば、腫瘍細胞および／または新生血管により）F L T 1、K D R、T N C、T N N、C S P G 4、B S T 1、S E L P、C D 2 0 0、I N S R（H H F 5）、I T G A 6、M E L T F、P E C A M 1またはS L C 1 A 5を発現しているさまざまながんを処置することができる。

【0271】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、F L T 1標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のF L T 1標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。F L T 1標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、腎がん、胃がん、神経膠腫、結腸直腸がん、胆道がん、前立腺がん、肉腫および乳がんが挙げられる。

10

【0272】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、K D R標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のK D R標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。K D R標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、腎がん、胃がん、神経膠腫、結腸直腸がん、胆道がん、肺がん、黒色腫、肝臓がん、肉腫、乳がん、中皮腫および甲状腺がんが挙げられる。

【0273】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、T N C標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のT N C標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。T N C標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、子宮頸がん、乳がん、膵臓がん、肺がん、非ホジキンリンパ腫、頭頸部がん、結腸直腸がん、食道がん、神経膠腫および前立腺がんが挙げられる。

20

【0274】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、T N N標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のT N N標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。T N N標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、子宮頸がん、乳がん、膵臓がん、肺がん、非ホジキンリンパ腫、頭頸部がん、結腸直腸がん、食道がん、神経膠腫および前立腺がんが挙げられる。

30

【0275】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、C S P G 4標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のC S P G 4標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。C S P G 4標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、黒色腫、腎がん、肉腫、神経膠腫、頭頸部がん、乳がん、膀胱がん、肺がんおよび子宮頸がんが挙げられる。

【0276】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、B S T 1標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のB S T 1標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。B S T 1標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、急性骨髄性白血病、中皮腫、膀胱がんおよび肉腫が挙げられる。

40

【0277】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、S E L P標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のS E L P標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。S E L P標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、骨髄

50

増殖性腫瘍、急性骨髄性白血病、乳がん、膀胱がん、甲状腺がん、腎がんおよび膵臓がんが挙げられる。

【0278】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、CD200 標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のCD200 標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。CD200 標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、乳がん、結腸直腸がん、B細胞悪性腫瘍、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、リンパ腫および中皮腫が挙げられる。

【0279】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、INSR 標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のINSR 標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。INSR 標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、前立腺がん、胃がん、結腸直腸がん、神経膠芽腫、乳がん、前立腺がん、子宮内膜がん、肝臓がんおよび腎がんが挙げられる。

【0280】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、ITGA6 標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のITGA6 標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。ITGA6 標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、乳がん、白血病、前立腺がん、結腸直腸がん、腎がん、頭頸部がん、卵巣がん、胃がんおよび肺がんが挙げられる。

【0281】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、MELTF 標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のMELTF 標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。MELTF 標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、乳がん、肺がん、黒色腫、膀胱がん、腎がん、肉腫、頭頸部がん、中皮腫、膵臓がんが挙げられる。

【0282】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、PECAM1 標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のPECAM1 標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。PECAM1 標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、固形腫瘍が挙げられる。一部の実施形態では、これらの固形腫瘍は、有意な新生血管に関連し、例えば、膵臓がん、前立腺がん、乳がん、肺がん、頭頸部がん、神経膠芽腫および結腸直腸がんである。

【0283】

一部の実施形態では、本方法は、投与を必要とする患者に、SLC1A5 標的化多重特異性結合タンパク質を投与するステップを含む。本明細書に開示される任意のSLC1A5 標的化多重特異性結合タンパク質を本方法に使用することができる。SLC1A5 標的化多重特異性結合タンパク質によって処置される例示的ながんとしては、それだけに限らないが、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、前立腺がん、腎がん、頭頸部がん、神経芽細胞腫、胃がんおよび卵巣がんが挙げられる。

【0284】

一部の実施形態では、がんは固形腫瘍である。一部の実施形態では、がんは、乳がん、卵巣がん、食道がん、膀胱がんまたは胃がん、唾液腺導管癌、肺腺癌または子宮がんの攻撃的形態、例えば子宮漿液性子宮内膜癌である。一部の他の実施形態では、がんは、脳がん、乳がん、子宮頸がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、白血病、

10

20

30

40

50

肺がん、肝臓がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、直腸がん、腎がん、胃がん、精巣がんまたは子宮がんである。さらに他の実施形態では、がんは、扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、黒色腫、神経芽細胞腫、肉腫（例えば、血管肉腫または軟骨肉腫）、喉頭がん、耳下腺がん、胆道がん（biliary tract cancer）、甲状腺がん、末端黒子型黒色腫、日光角化症、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、腺様嚢胞癌、腺腫、腺肉腫、腺扁平上皮癌、肛門管がん、肛門がん、肛門直腸がん、星細胞系腫瘍、バルトリン腺癌、基底細胞癌、胆道がん（biliary cancer）、骨がん、骨髄がん、気管支がん、気管支腺癌、カルチノイド、胆管癌、軟骨肉腫（chondrosarcoma）、脈絡叢乳頭腫／癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、明細胞癌、結合組織がん、嚢胞腺腫、消化器系がん、十二指腸がん、内分泌系がん、卵黄嚢腫瘍、子宮内膜過形成、子宮内膜間質肉腫、類内膜腺癌、内皮細胞がん、上衣がん、上皮細胞がん、ユーイング肉腫、眼と眼窩のがん、女性性器がん、限局性結節性過形成、胆嚢がん、胃幽門部がん、胃底部がん、ガストリノーマ、神経膠芽腫、グルカゴノーマ、心臓がん、血管芽細胞腫（hemangioblastoma）、血管内皮腫、血管腫、肝腺腫、肝腺腫症、肝胆道がん、肝細胞癌、ホジキン病、回腸がん、インスリノーマ、上皮内腫瘍、上皮間扁平上皮腫瘍（interepithelial squamous cell neoplasia）、肝内胆管がん、浸潤性扁平上皮癌、空腸がん、関節がん、カボジ肉腫、骨盤がん、大細胞癌、大腸がん、平滑筋肉腫、悪性黒子型黒色腫、リンパ腫、男性性器がん、悪性黒色腫、悪性中皮腫瘍、髄芽腫、髄上皮腫、髄膜がん、中皮がん、転移性癌、口腔がん、粘液性類表皮癌、多発性骨髄腫、筋がん、鼻道がん、神経系がん、神経上皮腺癌、結節型黒色腫、非上皮性皮膚がん、非ホジキンリンパ腫、燕麦細胞癌、乏突起神経膠がん（oligodendroglial cancer）、口腔がん、骨肉腫、乳頭状漿液性腺癌、陰茎がん、咽頭がん、下垂体腫瘍、形質細胞腫、偽肉腫、肺芽腫、直腸がん、腎細胞癌、呼吸器系がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、漿液性癌、副鼻腔がん、皮膚がん、小細胞癌、小腸がん、平滑筋がん、軟部組織がん、ソマトスタチン分泌腫瘍、脊椎がん、扁平上皮癌、横紋筋がん、中皮下がん、表在拡大型黒色腫、T細胞白血病、舌がん、未分化癌、尿管がん、尿道がん（urethra cancer）、膀胱がん、泌尿器系がん、子宮頸がん、子宮体がん、ブドウ膜黒色腫、膣がん、疣状癌、ビポーマ、外陰がん、高分化癌またはウィルムス腫瘍である。

10

20

30

40

【0285】

一部の実施形態では、がんは、白血病、例えば急性骨髄性白血病、T細胞白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病または有毛細胞白血病である。一部の他の実施形態では、処置されるがんは、B細胞リンパ腫またはT細胞リンパ腫などの非ホジキンリンパ腫である。ある特定の実施形態では、非ホジキンリンパ腫は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、原発性縦隔B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、脾辺縁帯B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、有毛細胞白血病または中枢神経系（CNS）原発リンパ腫などのB細胞リンパ腫である。ある特定の他の実施形態では、非ホジキンリンパ腫は、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫、末梢性T細胞リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、節外性ナチュラルキラー／T細胞リンパ腫、腸管症型T細胞性リンパ腫、皮下脂肪炎様T細胞リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫または末梢性T細胞リンパ腫などのT細胞リンパ腫である。

IV. 併用療法

【0286】

本発明の別の態様は併用療法を提供する。本明細書に記載される多重特異性結合タンパク質は、がんを処置するための追加の治療剤と組み合わせて使用することができる。

【0287】

がんの処置で併用療法の一部として使用され得る例示的な治療剤としては、例えば、放射線、マイトマイシン、トレチノイン、リボムスチン、ゲムシタビン、ビンクリスチン、

50

エトポシド、クラドリビン、ミトブロニトール、メトトレキサート、ドキソルビシン、カルボコン、ペントスタチン、ニトラクリン、ジノスタチン、セトロレリクス、レトロゾール、ラルチトレキセド、ダウノルビシン、ファドロゾール、フォテムスチン、サイマルファシン、ソブゾキサシ、ネダプラチン、シタラビン、ビカルタミド、ビノレルビン、ベスナリノン、アミノグルテチミド、アムサクリン、プログルミド、酢酸エリブチニウム、ケタンセリン、ドキシフルリジン、エトレチナート、イソトレチノイン、ストレプトゾシン、ニムスチン、ビンデシン、フルタミド、ドロゲニル、ブトシン、カルモフル、ラゾキサン、シゾフィラン、カルボプラチン、ミトラクトール、テガフル、イホスファミド、プレドニムスチン、ピシバニール、レバミゾール、テニポシド、インプロスルファン、エノシタピン、リスリド、オキシメトロン、タモキシフェン、プロゲステロン、メピチオスタン、エピチオスタノール、ホルメスタン、インターフェロナーアルファ、インターフェロナー2アルファ、インターフェロナーベータ、インターフェロナーガンマ（IFN- γ ）、コロニー刺激因子-1、コロニー刺激因子-2、デニロイキン・ジフチトクス、インターロイキン-2、黄体ホルモン放出因子、およびその同族受容体に対する示差的結合、または増加もしくは減少した血清半減期を示し得る上記薬剤のバリエーションが挙げられる。

10

【0288】

がんの処置で併用療法の一部として使用され得る薬剤の追加のクラスは免疫チェックポイント阻害剤である。例示的な免疫チェックポイント阻害剤としては、（i）細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4（CTLA4）、（ii）プログラム細胞死タンパク質1（PD1）、（iii）PDL1、（iv）LAG3、（v）B7-H4、（vi）FLT1、KDR、TNC、TNN、CSPG4、BST1、SELP、CD200、INSR（HGF5）、ITGA6、MELTF、PECAM1またはSLC1A5、（vii）B7-H3および（viii）TIM3の1つまたは複数を阻害する薬剤が挙げられる。CTLA4阻害剤であるイピリムマブは、黒色腫の処置について米国食品医薬品局によって承認されている。

20

【0289】

がんの処置で併用療法の一部として使用され得るさらに他の薬剤は、非チェックポイント標的を標的化するモノクローナル抗体剤（例えば、ハーセプチン）および非細胞傷害剤（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤）である。

30

【0290】

抗がん剤のさらに他のカテゴリーには、例えば、（i）ALK阻害剤、ATR阻害剤、A2Aアンタゴニスト、塩基除去修復阻害剤、Bcr-Ablチロシンキナーゼ阻害剤、ブルトンチロシンキナーゼ阻害剤、CDC7阻害剤、CHK1阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、DNA-PK阻害剤、DNA-PKとmTORの両方の阻害剤、DNMT1阻害剤、DNMT1阻害剤+2-クロロデオキシアデノシン、HDAC阻害剤、ヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤、IDO阻害剤、JAK阻害剤、mTOR阻害剤、MEK阻害剤、MEK阻害剤、MTH1阻害剤、PARP阻害剤、ホスホイノシチド3-キナーゼ阻害剤、PARP1とDHODHの両方の阻害剤、プロテアソーム阻害剤、トポイソメラーゼI阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、VEGFR阻害剤およびWEE1阻害剤から選択される阻害剤；（ii）OX40、CD137、CD40、GITR、CD27、HVEM、TNFRSF25またはICOSのアゴニスト；ならびに（iii）IL-12、IL-15、GM-CSFおよびG-CSFから選択されるサイトカインが含まれる。

40

【0291】

本発明のタンパク質を、原発巣の外科的除去の補助として使用することもできる。

【0292】

多重特異性結合タンパク質および追加の治療剤の量ならびに相対的な投与のタイミングは、所望の組合せ治療効果を達成するために選択され得る。例えば、併用療法を、このような投与を必要とする患者に投与する場合、組合せの治療剤、または治療剤を含む1つま

50

たは複数の医薬組成物は、例えば、逐次的に、併せて、一緒に、同時になどの任意の順序で投与され得る。さらに、例えば、多重特異性結合タンパク質は、追加の治療剤（複数可）がその予防的もしくは治療的效果を発揮する時間の間に投与され得る、または逆もまた同様である。

V. 医薬組成物

【0293】

本開示はまた、治療有効量の本明細書に記載されるタンパク質を含有する医薬組成物を特徴とする。組成物は、さまざまな薬物送達システムに使用するために製剤化することができる。1つまたは複数の生理学的に許容される賦形剤または担体を適切な製剤化のために組成物に含めることもできる。本開示で使用するための適切な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 17th ed., 1985に見出される。薬物送達のための方法の簡潔な概要については、例えば、Langer (Science 249:1527-1533, 1990)を参照されたい。

【0294】

本開示の静脈内薬物送達製剤は、バッグ、ペンまたはシリンジに含有され得る。ある特定の実施形態では、バッグはチューブおよび／または針を含むチャンネルに接続され得る。ある特定の実施形態では、製剤は凍結乾燥製剤または液体製剤であり得る。ある特定の実施形態では、製剤はフリーズドライ（凍結乾燥）され得、約12～60個のバイアルに含有され得る。ある特定の実施形態では、製剤はフリーズドライされ得、45mgのフリーズドライ製剤は1個のバイアルに含有され得る。ある特定の実施形態では、約40mg～約100mgのフリーズドライ製剤は1個のバイアルに含有され得る。ある特定の実施形態では、12、27または45個のバイアルのフリーズドライ製剤を合わせて、静脈内薬物製剤中の治療用量のタンパク質を得る。ある特定の実施形態では、製剤は液体製剤であり得、約250mg／バイアル～約1000mg／バイアルとして保管され得る。ある特定の実施形態では、製剤は液体製剤であり得、約600mg／バイアルとして保管され得る。ある特定の実施形態では、製剤は液体製剤であり得、約250mg／バイアルとして保管され得る。

【0295】

タンパク質は、製剤を形成する緩衝溶液中に治療有効量のタンパク質を含む液体水性医薬製剤で存在することができる。

【0296】

これらの組成物は、従来の滅菌技術によって滅菌され得る、または滅菌濾過され得る。得られた水溶液は、そのまま使用するために包装され得る、または凍結乾燥され得、凍結乾燥調製物は投与前に無菌水性担体と合わせられる。調製物のpHは、典型的には3～11の間、より好ましくは5～9の間または6～8の間、最も好ましくは7～8の間、例えば7～7.5となる。固体形態の得られた組成物は、各々が一定量の上記の1種または複数種の薬剤を含有する、複数の単回投与単位に包装され得る。固体形態の組成物はまた、柔軟な量で容器に包装することもできる。

【0297】

ある特定の実施形態では、本開示は、本開示のタンパク質を、マンニトール、クエン酸一水和物、クエン酸ナトリウム、リン酸二ナトリウム二水和物、リン酸二水素ナトリウム二水和物、塩化ナトリウム、ポリソルベート80、水および水酸化ナトリウムと組み合わせて含む、貯蔵寿命が延長された製剤を提供する。

【0298】

ある特定の実施形態では、pH緩衝溶液中に本開示のタンパク質を含む水性製剤が調製される。本発明のバッファーは、約4～約8、例えば約4.5～約6.0、もしくは約4.8～約5.5の範囲のpHを有し得る、または約5.0～約5.2のpHを有し得る。上に列挙されるpHまでの中間の範囲も本開示の一部であることが意図される。例えば、

上限および／または下限として上に列挙される値のいずれかの組合せを使用した値の範囲が含まれることが意図される。pHをこの範囲内に制御するバッファの例としては、酢酸バッファ（例えば、酢酸ナトリウム）、コハク酸バッファ（コハク酸ナトリウムなど）、グルコン酸バッファ、ヒスチジンバッファ、クエン酸バッファおよび他の有機酸バッファが挙げられる。

【0299】

ある特定の実施形態では、製剤は、pHを約4～約8の範囲に維持するためにクエン酸塩およびリン酸塩を含有する緩衝液系を含む。ある特定の実施形態では、pH範囲は、約4.5～約6.0、または約pH4.8～約5.5、または約5.0～約5.2のpH範囲であり得る。ある特定の実施形態では、緩衝液系は、クエン酸一水和物、クエン酸ナトリウム、リン酸二ナトリウム二水和物および／またはリン酸二水素ナトリウム二水和物を含む。ある特定の実施形態では、緩衝液系は、約1.3mg/mLのクエン酸（例えば、1.305mg/mL）、約0.3mg/mLのクエン酸ナトリウム（例えば、0.305mg/mL）、約1.5mg/mLのリン酸二ナトリウム二水和物（例えば、1.53mg/mL）、約0.9mg/mLのリン酸二水素ナトリウム二水和物（例えば、0.86）および約6.2mg/mLの塩化ナトリウム（例えば、6.165mg/mL）を含む。ある特定の実施形態では、緩衝液系は、1～1.5mg/mLのクエン酸、0.25～0.5mg/mLのクエン酸ナトリウム、1.25～1.75mg/mLのリン酸二ナトリウム二水和物、0.7～1.1mg/mLのリン酸二水素ナトリウム二水和物および6.0～6.4mg/mLの塩化ナトリウムを含む。ある特定の実施形態では、製剤のpHは水酸化ナトリウムで調整される。

【0300】

等張化剤（tonicifier）として作用し、抗体を安定化し得るポリオールを製剤に含めてもよい。ポリオールは、製剤の所望の等張性に関して変えることができる量で製剤に添加される。ある特定の実施形態では、水性製剤は等張性であり得る。添加されるポリオールの量をポリオールの分子量に関して変化させてもよい。例えば、二糖（トレハロースなど）と比較して、少量の単糖（例えば、マンニトール）が添加され得る。ある特定の実施形態では、等張化剤として製剤に使用され得るポリオールはマンニトールである。ある特定の実施形態では、マンニトール濃度は約5～約20mg/mLであり得る。ある特定の実施形態では、マンニトールの濃度は約7.5～15mg/mLであり得る。ある特定の実施形態では、マンニトールの濃度は約10～14mg/mLであり得る。ある特定の実施形態では、マンニトールの濃度は約12mg/mLであり得る。ある特定の実施形態では、ポリオールであるソルビトールが製剤に含まれ得る。

【0301】

界面活性剤（detergent）または界面活性剤（surfactant）を製剤に添加してもよい。例示的な界面活性剤としては、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート20、80等）またはポロキサマー（例えば、ポロキサマー188）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。添加される界面活性剤の量は、製剤化抗体の凝集を減少させる、および／または製剤中の微粒子の形成を最小化する、および／または吸着を減少させるようなものとする。ある特定の実施形態では、製剤はポリソルベートである界面活性剤を含み得る。ある特定の実施形態では、製剤は界面活性剤ポリソルベート80またはTween（登録商標）80を含有し得る。Tween（登録商標）80は、ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレエートを記載するために使用される用語である（Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4th ed., 1996参照）。ある特定の実施形態では、製剤は、約0.1mg/mL～約10mg/mLの間、または約0.5mg/mL～約5mg/mLの間のポリソルベート80を含有し得る。ある特定の実施形態では、約0.1%のポリソルベート80が製剤に添加され得る。

【0302】

実施形態では、本開示のタンパク質産物は液体製剤として製剤化される。液体製剤は、

ゴム栓で閉じられ、アルミニウム圧着シールクロージャーで密封された USP / Ph Eur I 型 50 R バイアル中 10 mg / mL 濃度で提供され得る。栓は、USP および Ph Eur を遵守したエラストマー製であり得る。ある特定の実施形態では、バイアルに、60 mL の抽出可能な体積を可能にするために、61.2 mL のタンパク質産物溶液が充填され得る。ある特定の実施形態では、液体製剤は 0.9 % 食塩溶液で希釈され得る。

【0303】

ある特定の実施形態では、本開示の液体製剤は、安定化レベルの糖と組み合わせた 10 mg / mL 濃度溶液として調製され得る。ある特定の実施形態では、液体製剤は水性担体中で調製され得る。ある特定の実施形態では、安定剤は、静脈内投与に望ましくないまたは不適切な粘度をもたらす得る量以下の量で添加され得る。ある特定の実施形態では、糖は二糖、例えばスクロースであり得る。ある特定の実施形態では、液体製剤は、緩衝剤、界面活性剤および保存剤の 1 つまたは複数も含み得る。

【0304】

ある特定の実施形態では、液体製剤の pH は、薬学的に許容される酸および／または塩基の添加によって調節され得る。ある特定の実施形態では、薬学的に許容される酸は塩酸であり得る。ある特定の実施形態では、塩基は水酸化ナトリウムであり得る。

【0305】

凝集に加えて、脱アミドが、発酵、収集／細胞清澄化、精製、原体／医薬品貯蔵中、および試料分析中に起こり得る、ペプチドおよびタンパク質の一般的な産物バリエーションである。脱アミドは、タンパク質から NH₃ が失われて、加水分解を受け得るスクシンイミド中間体を形成することである。スクシンイミド中間体は、親ペプチドの 17 ダルトンの質量減少をもたらす。その後の加水分解によって、18 ダルトンの質量増加がもたらされる。スクシンイミド中間体の単離は、水性条件下での不安定性のために困難である。よって、脱アミドは、典型的には 1 ダルトンの質量増加として検出可能である。アスパラギンの脱アミドは、アスパラギン酸またはイソアスパラギン酸をもたらす。脱アミドの速度に影響を及ぼすパラメーターには、pH、温度、溶媒の誘電率、イオン強度、一次配列、局所的ポリペプチドコンフォメーションおよび三次構造が含まれる。ペプチド鎖中の Asn に隣接するアミノ酸残基は脱アミド速度に影響を及ぼす。タンパク質配列中の Asn に続く Gly および Ser は脱アミドに対するより高い感受性をもたらす。

【0306】

ある特定の実施形態では、本開示の液体製剤は、タンパク質産物の脱アミドを防ぐための pH および湿度の条件下で保存され得る。

【0307】

本明細書の目的の水性担体は、薬学的に許容され（ヒトへの投与にとって安全で非毒性であり）、液体製剤の調製に有用であるものである。例示的な担体には、注射用滅菌水（SWFI）、注射用静菌水（BWFI）、pH 緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝食塩水）、滅菌食塩溶液、リンゲル液またはデキストロス溶液が含まれる。

【0308】

保存剤を必要に応じて本明細書の製剤に添加して細菌作用を減少させてもよい。保存剤の添加は、例えば、マルチユース（複数回投与）製剤の製造を容易にし得る。

【0309】

静脈内（IV）製剤は、特定の例で、例えば、患者が IV 経路を介して全ての薬物を受けて移植後に入院している場合に、好ましい投与経路であり得る。ある特定の実施形態では、液体製剤は、投与前に 0.9 % 塩化ナトリウム溶液で希釈される。ある特定の実施形態では、注射用希釈医薬品は等張性であり、静脈内注入による投与に適している。

【0310】

ある特定の実施形態では、塩またはバッファー成分は 10 mM ~ 200 mM の量で添加され得る。塩および／またはバッファーは、薬学的に許容され、「塩基形成」金属またはアミンを用いてさまざまな公知の酸（無機および有機）から得られる。ある特定の実施形態では、バッファーはリン酸バッファーであり得る。ある特定の実施形態では、バッファ

ーは、グリシン酸バッファー、炭酸バッファー、クエン酸バッファーであり得、この場合、ナトリウム、カリウムまたはアンモニウムイオンが対イオンとして働き得る。

【0311】

保存剤を必要に応じて本明細書の製剤に添加して、細菌作用を減少させてもよい。保存剤の添加は、例えば、マルチユース（複数回投与）製剤の製造を容易にし得る。

【0312】

本明細書の目的の水性担体は、薬学的に許容され（ヒトへの投与にとって安全で非毒性であり）、液体製剤の調製に有用であるものである。例示的な担体には、注射用滅菌水（SWFI）、注射用静菌水（BWFI）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝食塩水）、滅菌食塩溶液、リンゲル液またはデキストロース溶液が含まれる。

10

【0313】

本開示のタンパク質は、タンパク質およびリオプロテクタント（lyoprotectant）を含む凍結乾燥製剤で存在し得る。リオプロテクタントは糖、例えば二糖であり得る。ある特定の実施形態では、リオプロテクタントはスクロースまたはマルトースであり得る。凍結乾燥製剤はまた、緩衝剤、界面活性剤、増量剤および／または保存剤の1つまたは複数を含み得る。

【0314】

凍結乾燥医薬品の安定化に有用なスクロースまたはマルトースの量は、少なくとも1：2のタンパク質のスクロースまたはマルトースに対する重量比であり得る。ある特定の実施形態では、タンパク質のスクロースまたはマルトースに対する重量比は1：2～1：5

20

【0315】

ある特定の実施形態では、製剤のpHは、凍結乾燥前に、薬学的に許容される酸および／または塩基の添加によって調節され得る。ある特定の実施形態では、薬学的に許容される酸は塩酸であり得る。ある特定の実施形態では、薬学的に許容される塩基は水酸化ナトリウムであり得る。

【0316】

凍結乾燥前に、本開示のタンパク質を含有する溶液のpHは6～8の間に調整され得る。ある特定の実施形態では、凍結乾燥医薬品のためのpH範囲は7～8であり得る。

【0317】

ある特定の実施形態では、塩またはバッファー成分は10mM～200mMの量で添加され得る。塩および／またはバッファーは、薬学的に許容され、「塩基形成」金属またはアミンを用いてさまざまな公知の酸（無機および有機）から得られる。ある特定の実施形態では、バッファーはリン酸バッファーであり得る。ある特定の実施形態では、バッファーは、グリシン酸バッファー、炭酸バッファー、クエン酸バッファーであり得、この場合、ナトリウム、カリウムまたはアンモニウムイオンが対イオンとして働き得る。

30

【0318】

ある特定の実施形態では、「増量剤」が添加され得る。「増量剤」は、凍結乾燥混合物に嵩（mass）を加え、凍結乾燥ケーキの物理構造に寄与する（例えば、開孔構造を維持する本質的に均一な凍結乾燥ケーキの製造を容易にする）化合物である。例示的な増量剤には、マンニトール、グリシン、ポリエチレングリコールおよびソルビトールが含まれる。本発明の凍結乾燥製剤はこのような増量剤を含有し得る。

40

【0319】

保存剤を必要に応じて本明細書の製剤に添加して、細菌作用を減少させてもよい。保存剤の添加は、例えば、マルチユース（複数回投与）製剤の製造を容易にし得る。

【0320】

ある特定の実施形態では、凍結乾燥医薬品は、水性担体で構成され得る。本明細書の目的の水性担体は、薬学的に許容され（例えば、ヒトへの投与にとって安全で非毒性であり）、凍結乾燥後の、液体製剤の調製に有用であるものである。例示的な希釈剤には、注射用滅菌水（SWFI）、注射用静菌水（BWFI）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝

50

食塩水)、滅菌食塩溶液、リンゲル液またはデキストロース溶液が含まれる。

【0321】

ある特定の実施形態では、本開示の凍結乾燥医薬品は、注射用滅菌水、USP (SWFI) または0.9%塩化ナトリウム注射液、USPのいずれかで復元される。復元中、凍結乾燥粉末が溶液に溶解する。

【0322】

ある特定の実施形態では、本開示の凍結乾燥タンパク質産物は、約4.5mLの注射用水に構成され、0.9%食塩溶液(塩化ナトリウム溶液)で希釈される。

【0323】

本発明の医薬組成物中の有効成分の実際の投与量レベルは、患者にとって毒性となることなく、特定の患者、組成物および投与様式によって所望の治療反応を達成するのに有効な有効成分の量を得るように変化させることができる。

【0324】

具体的な用量は、各患者に均一な用量、例えば、50~5000mgのタンパク質であり得る。あるいは、患者の用量を、患者のおおよその体重または表面積に適合させることができる。適切な投与量の決定における他の因子には、処置または予防される疾患または状態、疾患の重症度、投与経路、ならびに患者の年齢、性別および健康状態が含まれ得る。処置のための適切な投与量を決定するのに必要な計算のさらなる改良は、特に投与量情報および本明細書に開示されるアッセイに照らして、当業者によって日常的に行われる。投与量はまた、適切な用量-反応データと合わせて使用される投与量を決定するための公知のアッセイの使用を通して決定することもできる。個々の患者の投与量は、疾患の進行を監視しながら調整することができる。患者における標的化可能な構築物または複合体の血中レベルを測定して、有効濃度に達するまたはこれを維持するために投与量を調整する必要があるかどうかを確かめることができる。薬理ゲノミクスを使用して、どの標的化可能な構築物および/または複合体、ならびにその投与量が所与の個体にとって十中八九有効であるかを決定することができる(Schmitz et al., Clinica Chimica Acta 308: 43-53, 2001; Steimer et al., Clinica Chimica Acta 308: 33-41, 2001)。

【0325】

一般に、体重に基づく投与量は、体重1kg当たり約0.01μg~約100mg、例えば約0.01μg~約100mg/kg体重、約0.01μg~約50mg/kg体重、約0.01μg~約10mg/kg体重、約0.01μg~約1mg/kg体重、約0.01μg~約100μg/kg体重、約0.01μg~約50μg/kg体重、約0.01μg~約10μg/kg体重、約0.01μg~約1μg/kg体重、約0.01μg~約0.1μg/kg体重、約0.1μg~約100mg/kg体重、約0.1μg~約50mg/kg体重、約0.1μg~約10mg/kg体重、約0.1μg~約1mg/kg体重、約0.1μg~約100μg/kg体重、約0.1μg~約10μg/kg体重、約0.1μg~約1μg/kg体重、約1μg~約100mg/kg体重、約1μg~約50mg/kg体重、約1μg~約10mg/kg体重、約1μg~約1mg/kg体重、約1μg~約100μg/kg体重、約1μg~約50μg/kg体重、約1μg~約10μg/kg体重、約10μg~約100mg/kg体重、約10μg~約50mg/kg体重、約10μg~約1mg/kg体重、約10μg~約100μg/kg体重、約10μg~約50μg/kg体重、約50μg~約100mg/kg体重、約50μg~約50mg/kg体重、約50μg~約10mg/kg体重、約50μg~約100μg/kg体重、約100μg~約100mg/kg体重、約100μg~約50mg/kg体重、約100μg~約10mg/kg体重、約100μg~約1mg/kg体重、約1mg~約100mg/kg体重、約1mg~約50mg/kg体重、約1mg~約10mg/kg体重、約10mg~約100mg/kg体重、約10mg~約50mg/kg体重、約5

0 mg～約100 mg/kg体重である。

【0326】

用量は、毎日、毎週、毎月もしくは毎年1回もしくは複数回、またはさらには2～20年毎に1回で与えられ得る。当業者であれば、測定された滞留時間および体液または組織中の標的化可能な構築物または複合体の濃度に基づいて、投与の反復率を容易に推定することができる。本発明の投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、髄腔内、腔内、カテーテルを通した灌流によるまたは直接病巣内注射によることができる。これは、毎日1回または複数回、毎週1回または複数回、毎月1回または複数回、および毎年1回または複数回投与され得る。

【0327】

上記の説明は、本発明の複数の態様および実施形態を説明している。本出願は、態様および実施形態の全ての組合せおよび並べ替えを具体的に企図する。

【実施例】

【0328】

ここで一般的に説明されている本発明は、本発明のある特定の態様および実施形態の例示目的でのみ含まれ、本発明を限定することを意図しない以下の実施例を参照することによってより容易に理解される。

(実施例1)

NKG2D結合ドメインはNKG2Dに結合する

NKG2D結合ドメインは精製組換えNKG2Dに結合する

【0329】

ヒト、マウスまたはカニクイザルNKG2D外部ドメインの核酸配列を、ヒトIgG1Fcドメインをコードする核酸配列と融合し、哺乳動物細胞に導入して発現させた。精製後、NKG2D-Fc融合タンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させた。非特異的結合を防止するためにウェルをウシ血清アルブミンでブロッキングした後、NKG2D結合ドメインを用量設定し、NKG2D-Fc融合タンパク質を予め吸着させたウェルに添加した。西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされた、ヒトカップ軽鎖を特異的に認識してFc交差反応性を回避する二次抗体を使用して、一次抗体結合を検出した。西洋ワサビペルオキシダーゼの基質である、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)をウェルに添加して結合シグナルを可視化し、その吸光度を450nmで測定し、540nmで補正した。NKG2D結合ドメインクローン、アイソタイプ対照または陽性対照(配列番号101～104から選択される重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、またはeBioScienceで入手可能な抗マウスNKG2DクローンMI-6およびCX-5)を各ウェルに添加した。

【0330】

アイソタイプ対照は組換えNKG2D-Fcタンパク質への最小の結合を示した一方、陽性対照は組換え抗原に最も強力に結合した。全てのクローンによって産生されたNKG2D結合ドメインは、クローン間で異なる親和性であるが、ヒト、マウスおよびカニクイザル組換えNKG2D-Fcタンパク質にわたって結合を示した。概して、各抗NKG2Dクローンは、類似の親和性でヒト(図3)およびカニクイザル(図4)組換えNKG2D-Fcに結合したが、マウス(図5)組換えNKG2D-Fcには低い親和性で結合した。

NKG2D結合ドメインはNKG2Dを発現している細胞に結合する

【0331】

EL4マウスリンパ腫細胞系を操作して、ヒトまたはマウスNKG2D-CD3ゼータシグナル伝達ドメインキメラ抗原受容体を発現させた。NKG2D結合クローン、アイソタイプ対照または陽性対照を100nM濃度で使用して、EL4細胞上で発現された細胞外NKG2Dを染色した。フルオロフォアコンジュゲート抗ヒトIgG二次抗体を使用して抗体結合を検出した。細胞をフローサイトメトリーによって分析し、親EL4細胞と比較したNKG2D発現細胞の平均蛍光強度(MFI)を使用して、バックグラウンドに対

する倍率（F O B）を計算した。

【0332】

全てのクローンによって産生されたNKG2D結合ドメインが、ヒトおよびマウスNKG2Dを発現しているEL4細胞に結合した。陽性対照抗体（配列番号101～104から選択される重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、またはeBioscienceで入手可能な抗マウスNKG2DクローンMI-6およびCX-5）が最良のFOB結合シグナルを与えた。ヒトNKG2D（図6）を発現している細胞とマウス（図7）NKG2Dを発現している細胞との間では、各クローンについてのNKG2D結合親和性が類似であった。

（実施例2）

NKG2D結合ドメインはNKG2Dへの天然リガンドの結合を遮断するULBP-6との競合

【0333】

組換えヒトNKG2D-Fcタンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異的結合を減少させるためにウェルをウシ血清アルブミンでブロッキングした。飽和濃度のULBP-6-His-ビオチンをウェルに添加し、引き続いてNKG2D結合ドメインクローンを添加した。2時間のインキュベーション後、ウェルを洗浄し、NKG2D-Fcコーティングウェルに結合したままであるULBP-6-His-ビオチンを、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートしたストレプトアビジンおよびTMB基質によって検出した。吸光度を450nmで測定し、540nmで補正した。バックグラウンドを減算した後、ウェル中のNKG2D-Fcタンパク質への結合を遮断されたULBP-6-His-ビオチンのパーセンテージから、NKG2D-Fcタンパク質へのNKG2D結合ドメインの特異的結合を計算した。陽性対照抗体（配列番号101～104から選択される重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む）およびさまざまなNKG2D結合ドメインがNKG2DへのULBP-6の結合を遮断した一方、アイソタイプ対照はULBP-6との競合を殆ど示さなかった（図8）。

【0334】

ULBP-6配列は配列番号108によって表される。

【化17】

MAAAAI PALLLCLPLLFL LF GWSRARRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVD
EKTF LHYDCGNKTVTPVSPLGKKLNVTMAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENY
TPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSIDGQTFLFDSEKRMWTTVHPGARKMK
EKWENDKDVAMSFHYISMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSGTTQLRA
TATTLILCCLLIILPCFILPGI

（配列番号：108）

MICAとの競合

【0335】

組換えヒトMICA-Fcタンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異的結合を減少させるためにウェルをウシ血清アルブミンでブロッキングした。NKG2D-Fc-ビオチンをウェルに添加し、引き続いてNKG2D結合ドメインを添加した。インキュベーションおよび洗浄後、MICA-Fcコーティングウェルに結合したままであるNKG2D-Fc-ビオチンを、ストレプトアビジン-HRPおよびTMB基質を使用して検出した。吸光度を450nmで測定し、540nmで補正した。バックグラウンドを減算した後、MICA-Fcコーティングウェルへの結合を遮断されたNKG2D-Fc-ビオチンのパーセンテージから、NKG2D-Fcタンパク質へのNKG2D結合ドメインの特異的結合を計算した。陽性対照抗体（配列番号101～104から選択される重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む）およびさまざまなNKG2D結合ドメ

インがNK G 2 DへのM I C Aの結合を遮断した一方、アイソタイプ対照はM I C Aとの競合を殆ど示さなかった（図9）。

R a e - 1 デルタとの競合

【0336】

組換えマウスR a e - 1 デルターF c（R & D S y s t e m sから購入）をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異的結合を減少させるためにウェルをウシ血清アルブミンでブロッキングした。マウスNK G 2 D - F c - ビオチンをウェルに添加し、引き続いてNK G 2 D結合ドメインを添加した。インキュベーションおよび洗浄後、R a e - 1 デルターF cコーティングウェルに結合したままであるNK G 2 D - F c - ビオチンを、ストレプトアビジン - H R PおよびT M B基質を使用して検出した。吸光度を450nmで測定し、540nmで補正した。バックグラウンドを減算した後、R a e - 1 デルターF cコーティングウェルへの結合を遮断されたNK G 2 D - F c - ビオチンのパーセンテージから、NK G 2 D - F cタンパク質へのNK G 2 D結合ドメインの特異的結合を計算した。陽性対照（配列番号101～104から選択される重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、またはe B i o s c i e n c eで入手可能な抗マウスNK G 2 DクローンM I - 6およびC X - 5）およびさまざまなNK G 2 D結合ドメインクローンがマウスNK G 2 DへのR a e - 1 デルタの結合を遮断した一方、アイソタイプ対照抗体はR a e - 1 デルタとの競合を殆ど示さなかった（図10）。

（実施例3）

NK G 2 D結合ドメインクローンはNK G 2 Dを活性化する

【0337】

ヒトおよびマウスNK G 2 Dの核酸配列を、C D 3ゼータシグナル伝達ドメインをコードする核酸配列に融合して、キメラ抗原受容体（C A R）構築物を得た。次いで、NK G 2 D - C A R構築物を、ギブソン・アセンブリを使用してレトロウイルスベクターにクローニングし、レトロウイルス産生のためにe x p i 2 9 3細胞にトランスフェクトした。E L 4細胞に、8 μ g / m L ポリブレンと共にNK G 2 D - C A Rを含有するウイルスを感染させた。感染24時間後、E L 4細胞におけるNK G 2 D - C A Rの発現レベルをフローサイトメトリーによって分析し、細胞表面上で高レベルのNK G 2 D - C A Rを発現するクローンを選択した。

【0338】

NK G 2 D結合ドメインがNK G 2 Dを活性化するかどうかを決定するために、これらをマイクロプレートのウェルに吸着させ、NK G 2 D - C A R E L 4細胞を、ブレフェルジン - Aおよびモネンシンの存在下で4時間、抗体断片コーティングウェル上で培養した。NK G 2 D活性化の指標である細胞内T N F - α産生をフローサイトメトリーによってアッセイした。T N F - α陽性細胞のパーセンテージを、陽性対照で処理した細胞に正規化した。全てのNK G 2 D結合ドメインが、ヒトNK G 2 D（図11）とマウスNK G 2 D（図12）の両方を活性化した。

（実施例4）

NK G 2 D結合ドメインはNK細胞を活性化する

初代ヒトNK細胞

【0339】

末梢血単核細胞（P B M C）を、密度勾配遠心法を使用してヒト末梢血バフィーコートから単離した。NK細胞（C D 3 - C D 5 6 +）を、磁気ビーズによる負の選択を使用して、P B M Cから単離し、単離NK細胞の純度は典型的には95%より高かった。次いで、単離NK細胞を、100ng / mL I L - 2を含有する培地で24～48時間培養した後、NK G 2 D結合ドメインを吸着させたマイクロプレートのウェルに移し、フルオロフォアコンジュゲート抗C D 1 0 7 a抗体、ブレフェルジン - Aおよびモネンシンを含有する培地で培養した。培養後、NK細胞を、C D 3、C D 5 6およびI F N - γに対するフルオロフォアコンジュゲート抗体を使用してフローサイトメトリーによってアッセイした。C D 1 0 7 aおよびI F N - γ染色をC D 3 - C D 5 6 +細胞で分析してNK細胞活

性化を評価した。CD107a/IFN- γ ダブルポジティブ細胞の増加は、1つの受容体ではなく2つの活性化受容体の結合を介した良好なNK細胞活性化を示す。NK G2D結合ドメインおよび陽性対照（例えば、配列番号101または配列番号103によって表される重鎖可変ドメイン、および配列番号102または配列番号104によって表される軽鎖可変ドメイン）は、アイソタイプ対照よりも高いCD107a⁺およびIFN- γ ⁺になるNK細胞のパーセンテージを示した（図13および図14は、それぞれNK細胞調製のために異なるドナーのPBMCを使用した、2つの独立した実験からのデータを表す）。

初代マウスNK細胞

【0340】

脾臓をC57BL/6マウスから得て、70 μ mセルストレーナーを通して粉碎して単一細胞懸濁液を得た。細胞をペレット化し、ACK溶解緩衝液（Thermo Fisher Scientificから購入 番号A1049201；155mM塩化アンモニウム、10mM重炭酸カリウム、0.01mM EDTA）に再懸濁して赤血球を除去した。残りの細胞を100ng/mL hIL-2と共に72時間培養した後、収集し、NK細胞単離の準備をした。次いで、NK細胞（CD3⁻NK1.1⁺）を、典型的には純度90%より高く、磁気ビーズを用いた負の枯渇技術を使用して脾細胞から単離した。精製NK細胞を、100ng/mL mIL-15を含有する培地で48時間培養した後、NK G2D結合ドメインを吸着させたマイクロプレートのウェルに移し、フルオロフォアコンジュゲート抗CD107a抗体、プレフェルジン-Aおよびモネンシンを含有する培地で培養した。NK G2D結合ドメインコーティングウェルでの培養後、NK細胞を、CD3、NK1.1およびIFN- γ に対するフルオロフォアコンジュゲート抗体を使用してフローサイトメトリーによってアッセイした。CD107aおよびIFN- γ 染色をCD3⁻NK1.1⁺細胞で分析してNK細胞活性化を評価した。CD107a/IFN- γ ダブルポジティブ細胞の増加は、1つの受容体ではなく2つの活性化受容体の結合を介した良好なNK細胞活性化を示す。NK G2D結合ドメインおよび陽性対照（eBioscienceで入手可能な抗マウスNK G2DクローンMI-6およびCX-5から選択される）は、アイソタイプ対照よりも高いCD107a⁺およびIFN- γ ⁺になるNK細胞のパーセンテージを示した（図15および図16は、それぞれNK細胞調製のために異なるマウスを使用した、2つの独立した実験からのデータを表す）。

（実施例5）

NK G2D結合ドメインは標的腫瘍細胞の細胞傷害性を可能にする

【0341】

ヒトおよびマウス初代NK細胞活性化アッセイは、NK G2D結合ドメインとのインキュベーション後のNK細胞上の細胞傷害性マーカーの増加を示した。これが腫瘍細胞溶解の増加につながるかどうかに対処するために、各NK G2D結合ドメインを単一特異性抗体に発達させる細胞ベースアッセイを利用した。Fc領域を一方の標的化アームとして使用し、Fab断片（NK G2D結合ドメイン）がNK細胞を活性化させるための別の標的化アームとして作用した。ヒト由来で、高レベルのFc受容体を発現するTHP-1細胞を腫瘍標的として使用し、Perkin Elmer DELFIA細胞傷害性キットを使用した。THP-1細胞をBATDA試薬で標識し、培養培地に10⁵/mLで再懸濁した。次いで、標識THP-1細胞を、37℃で3時間、マイクロタイタープレートのウェルでNK G2D抗体および単離マウスNK細胞と合わせた。インキュベーション後、20 μ Lの培養物上清を取り出し、200 μ Lのユーロピウム溶液と混合し、暗所で15分間、振盪しながらインキュベートした。時間分解蛍光測定モジュール（励起337nm、発光620nm）を備えたPheraStarプレートリーダーによって蛍光を経時的に測定し、キットの指示に従って、特異的溶解を計算した。

【0342】

陽性対照である、NK G2Dの天然リガンドのULBP-6は、マウスNK細胞によるTHP-1標的細胞の特異的溶解の増加を示した。NK G2D抗体もTHP-1標的細胞

の特異的溶解を増加させたが、アイソタイプ対照抗体は特異的溶解の減少を示した。点線は、抗体を添加していない、マウスNK細胞によるTHP-1細胞の特異的溶解を示している（図17）。

（実施例6）

NKG2D抗体は高い熱安定性を示す

【0343】

示差走査蛍光定量法を使用してNKG2D結合ドメインの融解温度をアッセイした。外挿された見かけの融解温度は典型的なIgG1抗体と比較して高い（図18）。

（実施例7）

NKG2DとCD16を架橋することによるヒトNK細胞の相乗的活性化

初代ヒトNK細胞活性化アッセイ

【0344】

末梢血単核細胞（PBMC）を、密度勾配遠心法を使用してヒト末梢血パフィーコートから単離した。NK細胞を、負の磁気ビーズ（StemCell番号17955）を使用してPBMCから精製した。フローサイトメトリーによって決定すると、NK細胞は90%より多くがCD3⁺CD56⁺であった。次いで、細胞を、活性化アッセイに使用する前に、100 ng/mL hIL-2（PeproTech番号200-02）を含有する培地で48時間増やした。抗体を、100 μL滅菌PBS中、4℃で一晩、2 μg/mL（抗CD16、Biolegend番号302013）および5 μg/mL（抗NKG2D、R&D番号MAB139）の濃度で96ウェル平底プレートにコーティングし、引き続きウェルを徹底的に洗浄して過剰な抗体を除去した。脱顆粒を評価するために、IL-2 活性化NK細胞を、100 ng/mLヒトIL-2（hIL2）および1 μg/mL APCコンジュゲート抗CD107a mAb（Biolegend番号328619）を補充した培養培地に5×10⁵細胞/mLで再懸濁した。次いで、1×10⁵細胞/ウェルを抗体コーティングプレートに添加した。タンパク質輸送阻害剤ブレフェルジンA（BFA、Biolegend番号420601）およびモネンシン（Biolegend番号420701）を、それぞれ最終希釈1：1000および1：270で添加した。プレートに添加された細胞を5%CO₂中37℃で4時間インキュベートした。IFN-γの細胞内染色のために、NK細胞を抗CD3（Biolegend番号300452）および抗CD56 mAb（Biolegend番号318328）で標識し、その後、固定し、透過処理し、抗IFN-γ mAb（Biolegend番号506507）で標識した。NK細胞を、生CD56⁺CD3⁺細胞でゲーティングした後、フローサイトメトリーによってCD107aおよびIFN-γの発現について分析した。

【0345】

受容体組合せの相対的効力を調査するために、プレート結合刺激による、NKG2DまたはCD16の架橋、および両受容体の共架橋を実施した。図19（図19A～19C）に示されるように、CD16とNKG2Dの組合せ刺激は、高度に上昇したレベルのCD107a（脱顆粒）（図19A）および/またはIFN-γ産生（図19B）をもたらした。点線は、各受容体の個々の刺激の相加的效果を表す。

【0346】

抗CD16、抗NKG2Dまたは両モノクローナル抗体の組合せによる4時間のプレート結合刺激後、CD107aレベルおよびIL-2 活性化NK細胞の細胞内IFN-γ産生を分析した。グラフは平均（n=2）±SDを示している。図19AはCD107aのレベルを示し；図19BはIFN-γのレベルを示し；図19CはCD107aとIFN-γのレベルを示している。図19A～19Cに示されるデータは、5人の異なる健康なドナーを使用した5つの独立した実験を表す。

（実施例8）

ヒトがん抗原を発現している細胞へのTriNKETまたはmAbの結合の評価

【0347】

B7-H3を発現しているヒトがん細胞系を使用して、B7-H3標的化クローンに由

10

20

30

40

50

来する T r i N K E T の腫瘍抗原結合を評価した。ヒト乳がん細胞系 B T - 4 7 4 および H C C 1 9 5 4 ならびに腎がん細胞系 7 8 6 - O を使用して、B 7 - H 3 を発現している細胞への T r i N K E T の結合を評価した。さまざまな濃度の T r i N K E T またはモノクローナル抗体を氷上で 2 0 分間細胞に結合させ、その後、細胞を洗浄し、フルオロフォアコンジュゲート抗ヒト I g G 二次抗体を使用して、結合した T r i N K E T / モノクローナル抗体の量を測定した。次いで、細胞をフローサイトメトリーによって分析し、B 7 - H 3 を発現している細胞への M F I の結合をさまざまな濃度に対してプロットした。

【0348】

図 3 5 は、B 7 - H 3 発現ヒトがん細胞系 (A) 7 8 6 - O、(B) B T - 4 7 4 および (C) H C C 1 9 5 4 への B 7 - H 3 標的化 T r i N K E T およびその親モノクローナル抗体の結合を示している。3 つの異なる B 7 - H 3 結合ドメインを一本鎖可変断片に変換し、同じ N K G 2 D 結合ドメインを有する T r i N K E T として発現させた。1 3 v 1、M 3 0 およびエノブリツズマブ B 7 - H 3 標的化ドメインを有する T r i N K E T は、B 7 - H 3 発現ヒトがん細胞系に対する結合が陽性を示した。しかしながら、3 つの系全てで、B 7 - H 3 T r i N K E T が、親モノクローナル抗体と比較して弱く結合する。結合親和性の減少は、F a b から s c F v への変換および / または 1 分子当たり 2 つの B 7 - H 3 結合ドメインを有する親 m A b と比較した F 3 ' T r i N K E T の B 7 - H 3 への一価結合に起因し得る。

(実施例 9)

初代ヒト N K 細胞の細胞傷害性アッセイ

【0349】

P B M C を、密度勾配遠心法を使用してヒト末梢血バフィーコートから単離し、洗浄し、N K 細胞単離の準備をした。磁気ビーズによる負の選択技術を使用して N K 細胞を単離した。単離 N K 細胞の純度は典型的には 9 0 % より高い C D 3 - C D 5 6 + であった。単離 N K 細胞を一晩静置し、翌日、細胞傷害性アッセイに使用した。

D E L F I A 細胞傷害性アッセイ

【0350】

目的の標的である B 7 - H 3 を発現しているヒトがん細胞系を培養物から収集し、細胞を H B S で洗浄し、B A T D A 試薬 (P e r k i n E l m e r C 1 3 6 - 1 0 0) で標識するために成長培地に 10^6 / m L で再懸濁した。標的細胞の標識については製造業者の指示に従った。標識後、細胞を H B S で 3 回洗浄し、培養培地に $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$ / m L で再懸濁した。バックグラウンドウェルを調製するために、標識細胞のアリコートを取っておき、遠心して細胞から培地を除いた。 $100 \mu l$ の培地を 3 連でウェルに慎重に添加して、ペレット化細胞を乱さないようにした。 $100 \mu l$ の B A T D A 標識細胞を 9 6 ウェルプレートの各ウェルに添加した。複数のウェルを、標的細胞からの自発的放出のために保全し、標的細胞の最大溶解のために 1 % T r i t o n (登録商標) - X を添加して調製した。B 7 - H 3 に対するモノクローナル抗体または T r i N K E T を培養培地に希釈し、 $50 \mu l$ の希釈 m A b または T r i N K E T を各ウェルに添加した。静止および / または活性化 N K 細胞を培養物から収集し；次いで、細胞を洗浄し、E : T 比 5 : 1 となるよう培養培地に $10^5 \sim 2.0 \times 10^6$ / m L の濃度で再懸濁した。 $50 \mu l$ の N K 細胞を合計 $200 \mu l$ の培養体積となるようプレートの各ウェルに添加した。プレートを 5 % C O ₂ で、3 7 ° C で 2 ~ 3 時間インキュベートした後、アッセイを行った。

【0351】

2 ~ 3 時間培養した後、プレートをインキュベーターから取り出し、 $200 \times g$ で 5 分間遠心分離することにより、細胞をペレット化した。 $20 \mu l$ の培養物上清を新しいマイクロプレートに移し、 $200 \mu l$ の室温ユーロピウム溶液 (P e r k i n E l m e r C 1 3 5 - 1 0 0) を各ウェルに添加した。プレートを光から保護し、 $250 r p m$ で 1 5 分間、プレートシェーカー上でインキュベートし、次いで、S p e c t r a M a x i 3 X 機器を使用して読み取った。特異的溶解 % を以下の通り計算した：

特異的溶解 % = ((実験放出 - 自発的放出) / (最大放出 - 自発的放出)) × 1 0 0 % 。

【0352】

図36は、786-O（図36A）およびHCC1954（図36B）がん細胞系の初代NK細胞媒介殺滅の増強における20nM B7-H3標的化Tr iNK E Tまたは親mAbの活性を示している。Tr iNK E Tは、親モノクローナル抗体と比較して、弱められたB7-H3発現がん細胞への結合を有するにもかかわらず、親mAbよりも786-OおよびHCC1954がん細胞のNK細胞媒介溶解を増強する。

（実施例10）

KHYG-1 CD16V細胞の細胞傷害性アッセイ

【0353】

KHYG-1細胞は、DSMZから得られる高度細胞傷害性NK白血病細胞系（DSMZ番号ACC725）である。親KHYG-1細胞は、細胞表面上でNKGD2を発現するが、CD16は発現しない。高親和性ヒトCD16を形質導入されたKHYG-1細胞を細胞の細胞傷害性アッセイに使用した。KHYG-1 CD16V細胞を一晩静置し、翌日、エフェクター細胞として細胞傷害性アッセイに使用した。

DELFIA細胞傷害性アッセイ

【0354】

B7-H3を発現しているヒトがん細胞系を培養物から収集し、HBSで洗浄し、製造業者の指示に従って、BATDA試薬（Perkin Elmer C136-100）で標識するために成長培地に 10^6 /mLで再懸濁した。標識後、細胞をHBSで3回洗浄し、培養培地に $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$ /mLで再懸濁した。バックグラウンドウェルを調製するために、標識細胞のアリコートを取っておき、遠心して細胞から培地を除いた。100μlの培地を3連でウェルに慎重に添加して、ペレット化細胞を乱さないようにした。100μlのBATDA標識細胞を96ウェルプレートの各ウェルに添加した。複数のウェルを、標的細胞からの自発的放出のために保全し、標的細胞の最大溶解のために1% Triton（登録商標）-Xを添加して調製した。B7-H3に対するモノクローナル抗体またはTr iNK E Tを培養培地に希釈し、50μlの希釈mAbまたはTr iNK E Tを各ウェルに添加した。静止KHYG-1 CD16V細胞を培養物から収集し、洗浄し、E:T比10:1となるよう培養培地に $10^5 \sim 2.0 \times 10^6$ /mLで再懸濁した。50μlのKHYG-1 CD16V細胞を合計200μlの培養体積となるようプレートの各ウェルに添加した。プレートを5%CO₂で、37℃で2～3時間インキュベートした後、アッセイを行った。

【0355】

2～3時間培養した後、プレートをインキュベーターから取り出し、200×gで5分間遠心分離することにより、細胞をペレット化した。20μlの培養物上清を新しいマイクロプレートに移し、200μlの室温ユーロピウム溶液（Perkin Elmer C135-100）を各ウェルに添加した。プレートを光から保護し、250rpmで15分間、プレートシェーカー上でインキュベートし、次いで、SpectraMax i3X機器を使用して読み取った。特異的溶解を以下の通り計算した：

特異的溶解% = $\left(\frac{\text{実験放出} - \text{自発的放出}}{\text{最大放出} - \text{自発的放出}} \right) \times 100\%$ 。

【0356】

図37Aおよび図37Bは、それぞれ、B7-H3標的化Tr iNK E Tが、BT-474およびHCC1954がん細胞系のKHYG-1-CD16V細胞殺滅を有意に増強することを示している。Tr iNK E Tは、親mAbよりも、低いEC₅₀値を有し強力で、高い最大溶解に到達する。

（実施例11）

共培養活性化アッセイ

【0357】

PBMCを、密度勾配遠心法を使用してヒト末梢血バフィーコートから単離した。単離PBMCを洗浄し、初代培養培地中 1×10^6 /mLで一晩静置した。B7-H3を発現しているヒトがん細胞系を培養物から収集し、細胞を 2×10^6 /mLに調整した。B7

10

20

30

40

50

－H3 Tr iNKET、B7－H3 親モノクローナル抗体またはh I g G 1 アイソタイプ対照を培養培地に希釈した。静止P B M Cを培養物から収集し、洗浄し、培養培地に $4 \times 10^6 / \text{mL}$ で再懸濁した。I L－2およびフルオロフォアコンジュゲート抗C D 1 0 7 aを、活性化培養のためにP B M Cに添加した。プレフェルジン－Aおよびモネンシンを培養培地に希釈して、細胞内サイトカイン染色のために細胞外へのタンパク質輸送を遮断した。50 μl の腫瘍標的、m A b / T r iNKET、B F A / モネンシンおよびP B M Cを、総培養体積200 μl になるように96ウェルプレートに添加した。プレートを4時間培養した後、F A C S分析のために試料を調製した。

【0358】

4時間の活性化培養後、C D 3、C D 5 6およびI F N γ に対するフルオロフォアコンジュゲート抗体を使用したフローサイトメトリーによる分析のために細胞を調製した（表13）。C D 1 0 7 aおよびI F N γ 染色をC D 3－C D 5 6＋集団で分析してNK細胞活性化を評価した。

表13

【表13】

チャンネル	FITC	PE	PerCP	APC	APC-Cy7	421
マーカー	CD3	IFN γ	CD45	CD107a	L/D	CD56

【0359】

F S C対S S Cプロットを使用して目的の細胞を同定し、適切に形作られたゲートを細胞の周りに描いた。ゲーティングされた細胞内では、F S C－H対F S C－Aプロットを表示することにより、ダブレット細胞を取り除いた。単一細胞集団内では、生細胞をゲーティングした。生細胞内では、NK細胞をC D 5 6＋C D 3－として同定した。C D 1 0 7 a脱顆粒およびI C I F N γ をNK細胞集団内で分析した。

【0360】

P B M Cを、B7－H3 Tr iNKET、モノクローナル抗体またはアイソタイプh I g G 1 アイソタイプ対照の存在下で、B T－474および786－O細胞と共培養した。図38Aおよび図38Bは、それぞれ、B7－H3発現がん細胞B T－474および786－Oとの共培養後のI F N γ とC D 1 0 7 aの両方を発現しているNK細胞のパーセンテージを示している。全てのB7－H3 Tr iNKETおよび親モノクローナル抗体が、ヒトNK細胞で細胞内I F N γ およびC D 1 0 7 a脱顆粒を誘導した。アイソタイプ対照処理はNK細胞を全く活性化しなかったが、それぞれの親m A bと比較して、10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ のB7－H3 Tr iNKETで処理した共培養物で、I F N γ およびC D 1 0 7 aダブルポジティブNK細胞のパーセンテージが高く、Tr iNKETが親m A bよりもNK細胞を刺激することを示している。

参照による組み込み

【0361】

本明細書で参照される特許文献および科学論文の各々の開示全体は、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

均等物

【0362】

本発明は、その精神からも本質的な特徴からも逸脱することなく、他の具体的な形態で具体化され得る。そのため、前記実施形態は、あらゆる点で、本明細書に記載される本発明を限定するのではなく、例示的なものとみなされるべきである。よって、本発明の範囲は、前記説明ではなく添付の特許請求の範囲によって示され、特許請求の範囲の等価性の意味および範囲に入る全ての変更がそこに包含されることが意図される。

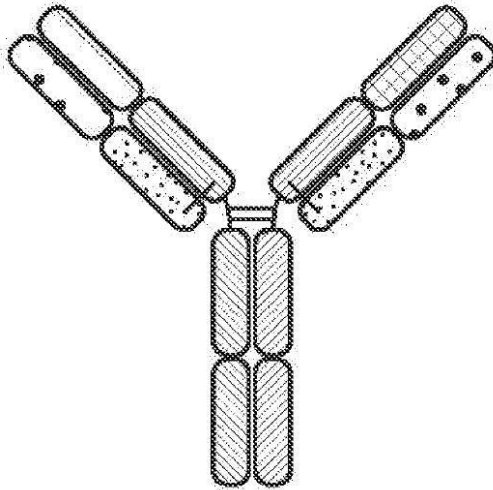
10

20

30

40

【図 1】
FIG. 1



【図 2 - 1】
FIG. 2A

NKG2D-標的化
scFv

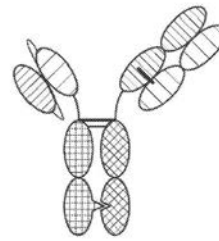
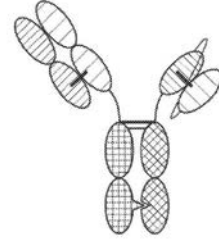


FIG. 2B

B7-H3-標的化
Fab 断片

NKG2D-標的化
Fab 断片

B7-H3-標的化
scFv



【図 2 - 2】
FIG. 2C

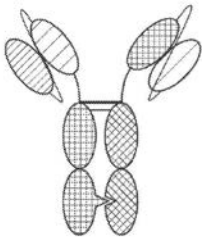


FIG. 2D

B7-H3 アーム

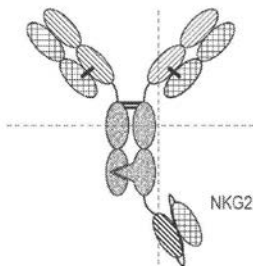
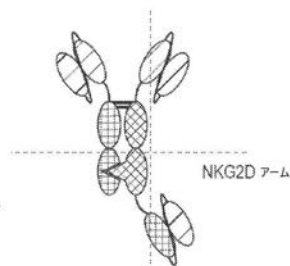
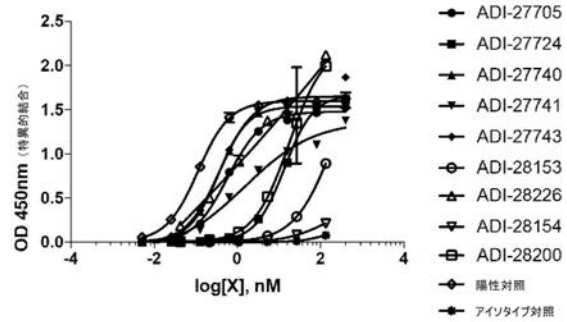


FIG. 2E

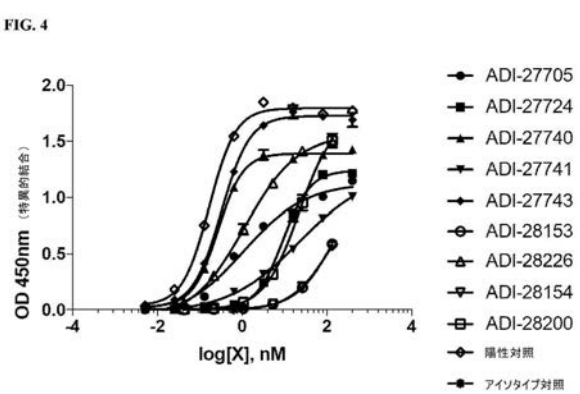
B7-H3 アーム



【図 3】
FIG. 3

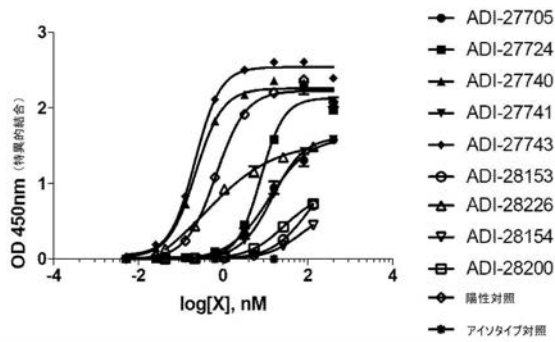


【図 4】
FIG. 4



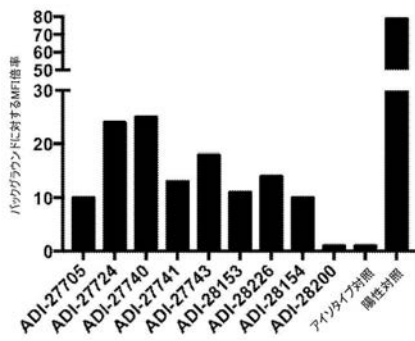
【図 5】

FIG. 5



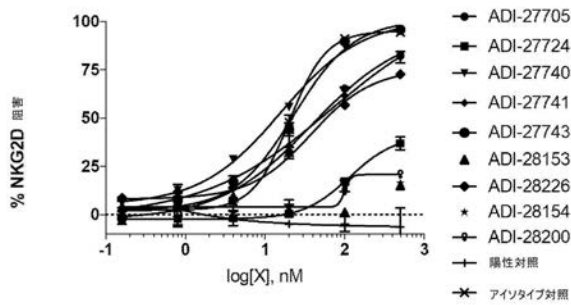
【図 6】

FIG. 6



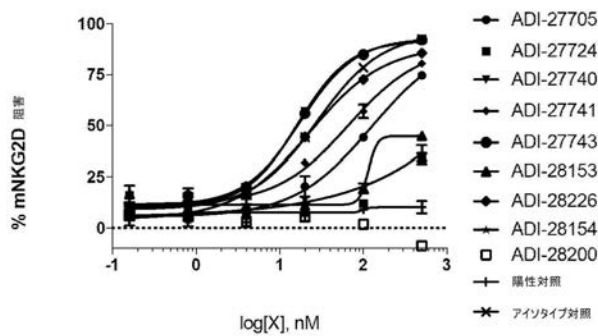
【図 9】

FIG. 9



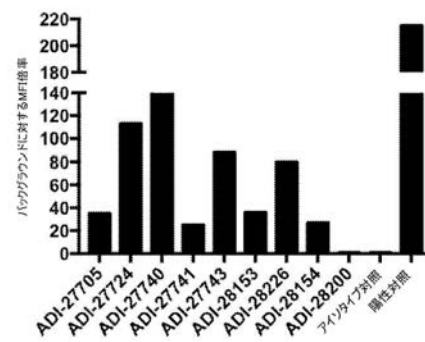
【図 10】

FIG. 10



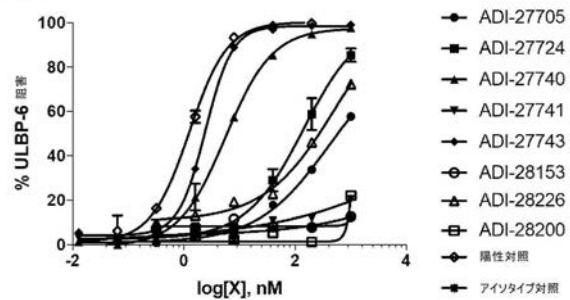
【図 7】

FIG. 7



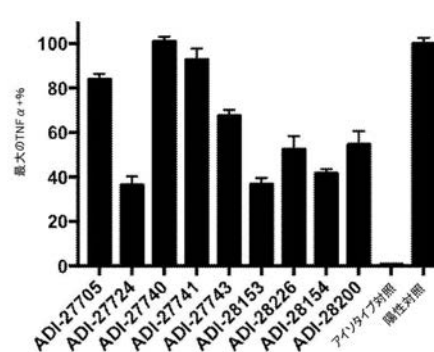
【図 8】

FIG. 8



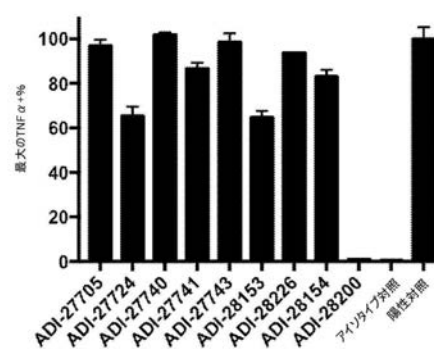
【図 11】

FIG. 11



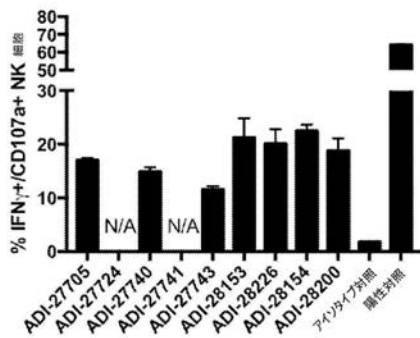
【図 12】

FIG. 12



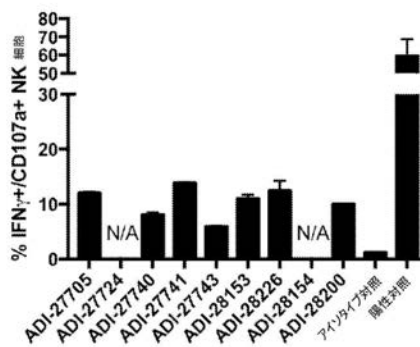
【図 13】

FIG. 13



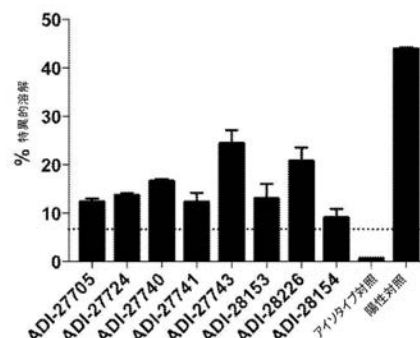
【図 14】

FIG. 14



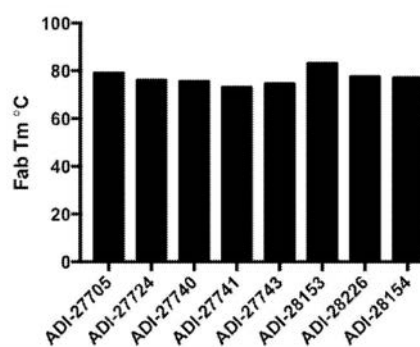
【図 17】

FIG. 17



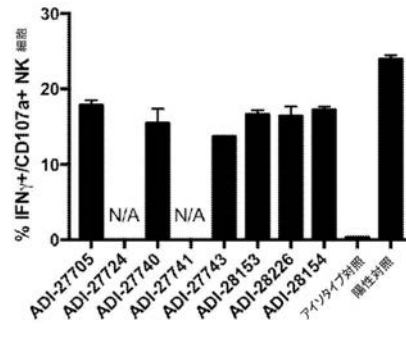
【図 18】

FIG. 18



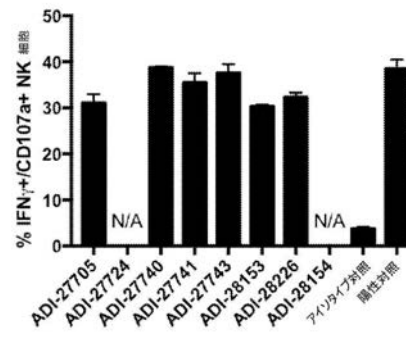
【図 15】

FIG. 15



【図 16】

FIG. 16



【図 19】

FIG. 19C

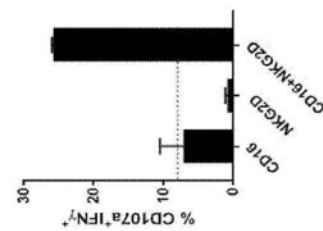


FIG. 19B

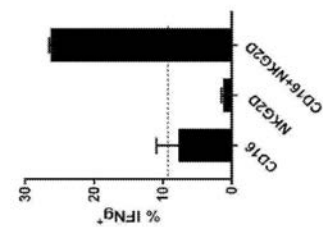
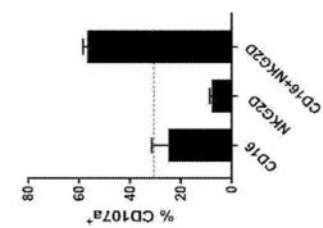
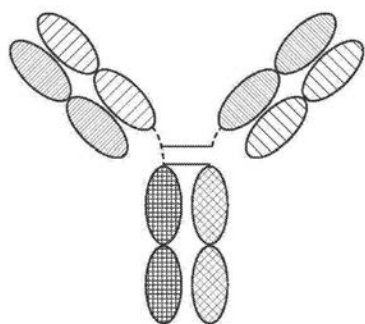


FIG. 19A



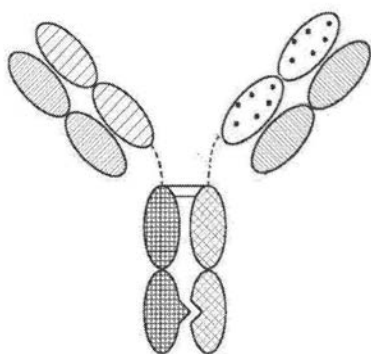
【図 20】

FIG. 20



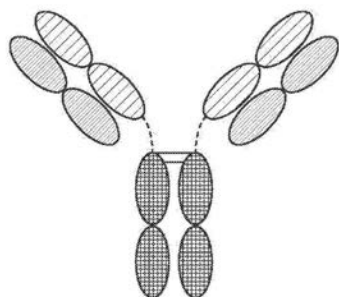
【図 21】

FIG. 21



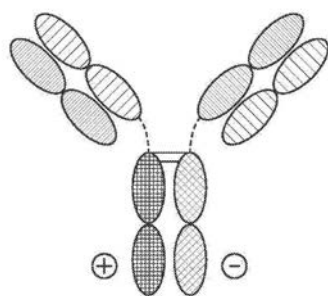
【図 24】

FIG. 24



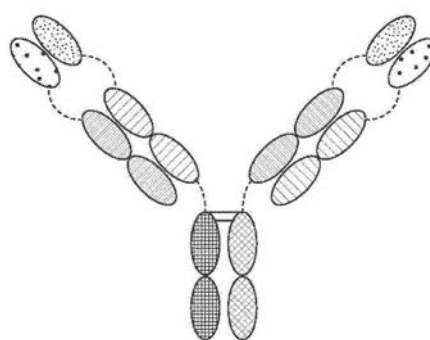
【図 25】

FIG. 25



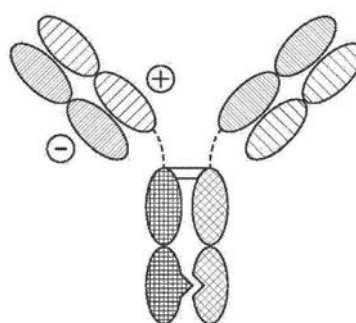
【図 22】

FIG. 22



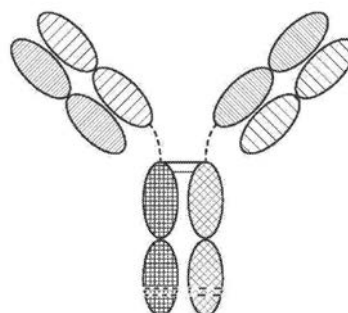
【図 23】

FIG. 23



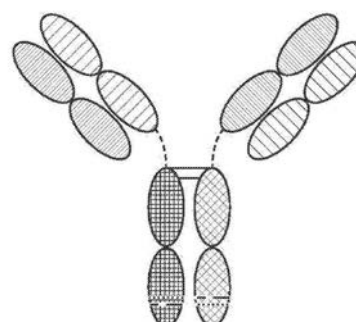
【図 26】

FIG. 26



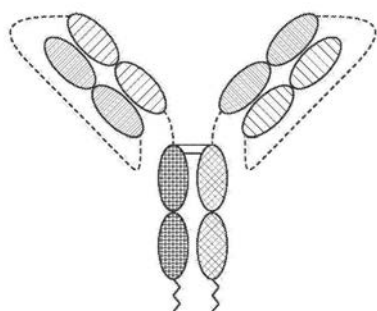
【図 27】

FIG. 27



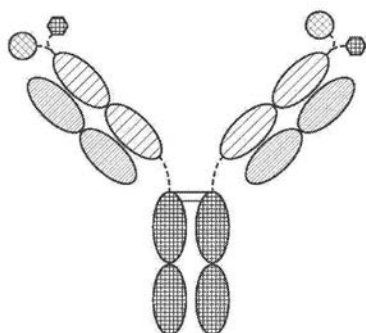
【図 28】

FIG. 28



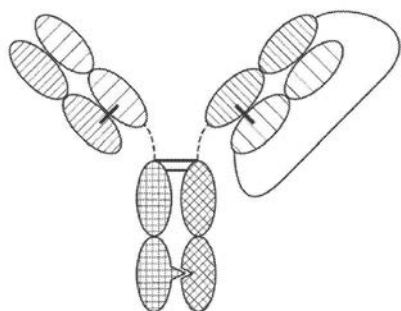
【図 29】

FIG. 29



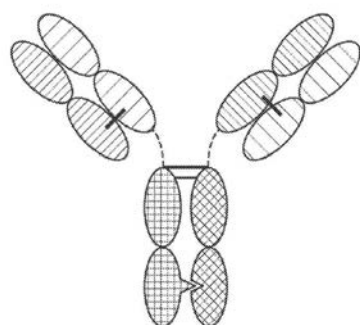
【図 31】

FIG. 31



【図 32】

FIG. 32



【図 30】

FIG. 30A

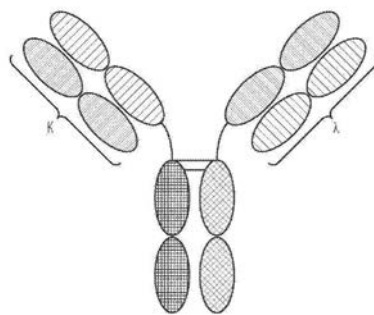
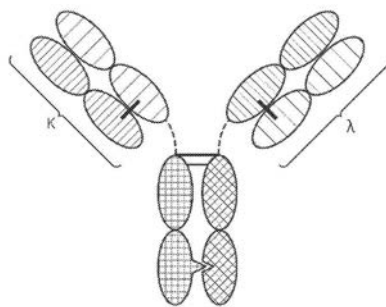
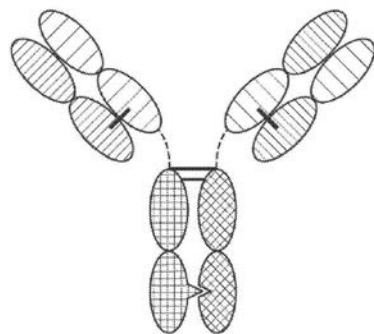


FIG. 30B



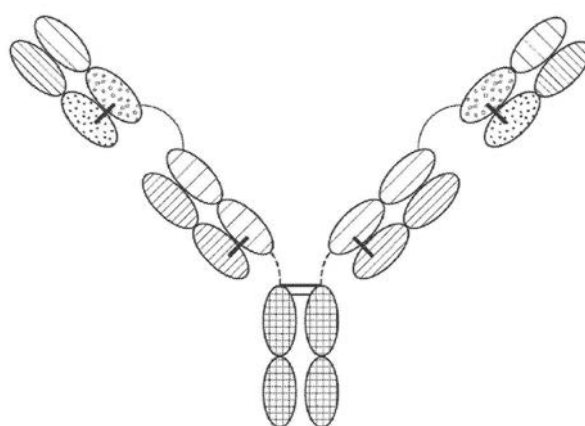
【図 33】

FIG. 33



【図 34】

FIG. 34



【図 35】

FIG. 35A

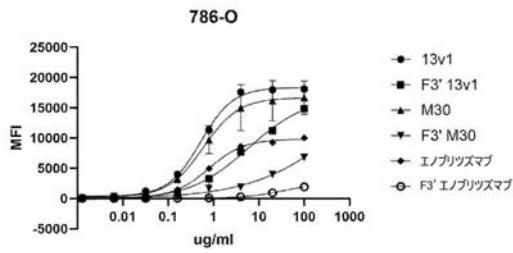


FIG. 35B

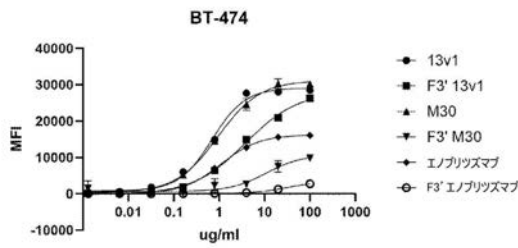
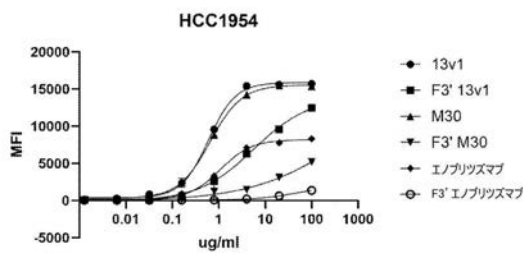


FIG. 35C



【図 37】

FIG. 37A

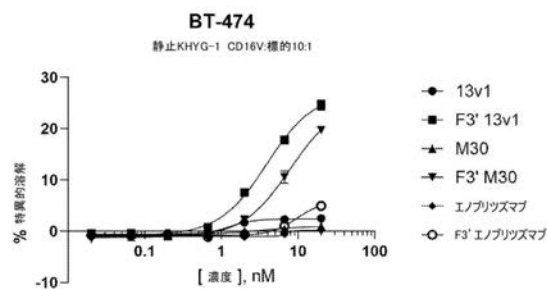
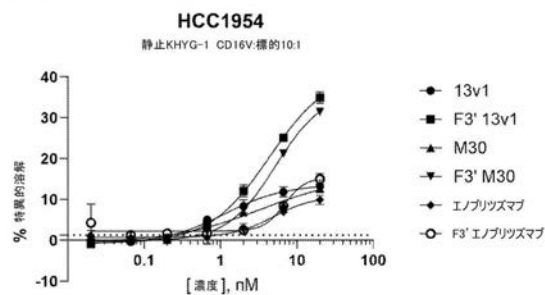


FIG. 37B



【図 36】

FIG. 36A

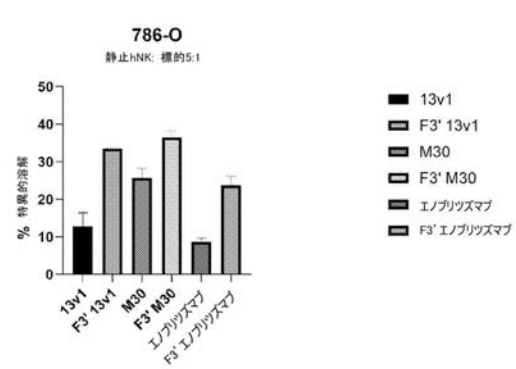
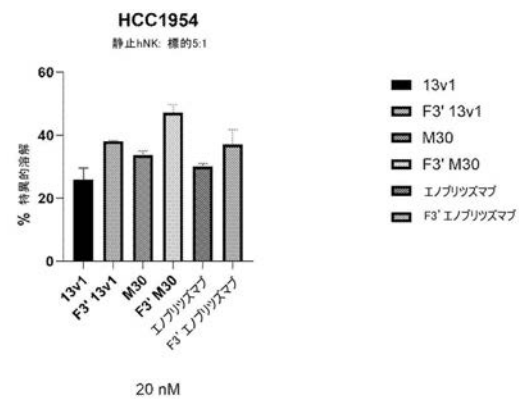


FIG. 36B



【図 38】

FIG. 38A

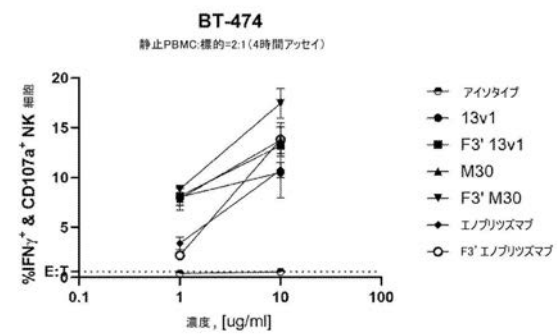
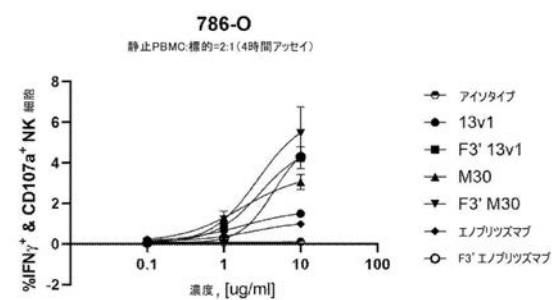


FIG. 38B



【配列表】

2021534096000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/45723

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/45723

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 7-13, 15-21, 31-32, 35-131
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

-----please see continuation in extra sheet-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-6, 14, 22-27, (30, 33-34)(in part), limited to the B7-H3-binding scFv SEQ ID NO: 329, and the scFv-Fc SEQ ID NO: 330

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/45723

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C07K 16/18, C07K 16/28, C07K 16/30 (2019.01)

CPC - C07K 16/2851, C07K 16/2878, C07K 16/32, A61K 2039/505, A61K 2039/507, C07K 2317/622

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)

See Search History document

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

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y --- A	US 2012/0294796 A1 (JOHNSON et al.) 22 November 2012 (22.11.2012) Especially Abstract, para [0113], [0231], [0315], [0320], [0439], [0445], [0448], SEQ ID NO. 115	14, 30 ----- 33-34 ----- 22-24
Y	US 2016/0369002 A1 (INNATE PHARMA) 22 December 2016 (22.12.2016) Especially Abstract, [0003], [0013], [0047], [0018], [0150], [0181], [0247], [0283], [0297]	1-6
Y	US 2017/0368169 A1 (ELSTAR THERAPEUTICS, INC) 28 December 2017 (28.12.2017) Especially Abstract, [0143], [0671]	1-6, 33-34
Y	US 2018/0118851 A1 (DYAX CORP) 03 May 2018 (03.05.2018) Especially Abstract, [0006]	4-6
A	CN 105906722 A (SINOBIOWAY CELL THERAPY CO LTD) 31 August 2016 (31.08.2016) Especially Abstract, para [0010], SEQ ID NO. 1	25-27

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 2019

Date of mailing of the international search report

13 DEC 2019

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 19/45723

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

Group I+: Claims 1-6, 14, 22-27, (30, 33-34)(in part), drawn to a protein comprising a second antigen-binding site comprising a scFv that binds B7-H3. The protein will be searched to the extent that the B7-H3-binding scFv encompasses SEQ ID NO: 329, and the scFv-Fc sequence encompasses SEQ ID NO: 330. It is believed that claims 1-6, 14, 22-27, (30, 33-34)(in part) encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass the B7-H3-binding scFv sequence of SEQ ID NO: 329, and the scFv-Fc sequence of SEQ ID NO: 330. Additional B7-H3-binding scFv sequence(s) and scFv-Fc sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected B7-H3-binding scFv sequence(s) and scFv-Fc sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a protein comprising the B7-H3-binding scFv sequence of SEQ ID NO: 333, and the scFv-Fc sequence of SEQ ID NO: 334.

Group II: Claims 28, (30, 33-34)(in part), drawn to a protein comprising a second antigen-binding site that binds a tumor-associated antigen L1CAM.

Group III: Claims 29, (30, 33-34)(in part), drawn to a protein comprising a second antigen-binding site that binds a tumor-associated antigen selected from the group consisting of FLT1, KDR, TNC, TNN, CSPG4, BST1, SELP, CD200, INSR (HHFS), ITGA6, MELTF, PECAM1, and SLC1A5.

The inventions listed as Groups I+, II, and III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I+ requires a second antigen-binding site comprising a scFv that binds B7-H3, not required by Groups II and III.

Group II requires a protein comprising a second antigen-binding site that binds a tumor-associated antigen L1CAM, not required by Groups I+ and III.

Group III requires a protein comprising a second antigen-binding site that binds a tumor-associated antigen selected from the group consisting of FLT1, KDR, TNC, TNN, CSPG4, BST1, SELP, CD200, INSR (HHFS), ITGA6, MELTF, PECAM1, and SLC1A5, not required by Groups I+ and II.

The technical feature of each of the inventions listed as Group I+ is the specific scFv and scFv-Fc sequences recited therein. Each invention requires a scFv sequence and corresponding scFv-Fc sequence not required by any of the other inventions. No technical features are shared between the scFv and scFv-Fc sequences of each of the inventions of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if the inventions listed as Group I+ were considered to share technical features, these shared technical features are previously disclosed by the prior art, as further discussed below.

Common Technical Features

The feature shared by Groups I+, II, and III is a protein comprising:

- (a) a first antigen-binding site that binds NKG2D;
- (b) a second antigen-binding site that binds a tumor-associated antigen; and
- (c) an antibody Fc domain or a portion thereof sufficient to bind CD16, or a third antigen-binding site that binds CD16.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 2017/0368169 A1 to Elstar Therapeutics, Inc. (hereinafter "Elstar"). Elstar teaches a protein (Abstract - "Multispecific molecules that include i) a tumor-targeting moiety; and one, two or all of: (ii) an immune cell engager (e.g., chosen from an NK cell engager, a T cell engager, a B cell engager, a dendritic cell engager, or a macrophage cell engager)") comprising:

- (a) a first antigen-binding site that binds NKG2D (para [0671] - "multi-specific (e.g., bi-, tri-, quad-specific) proteins, that are engineered to contain one or more NK cell engager that mediate binding to and/or activation of an NK cell...the NK cell engager is selected from an antigen binding domain or ligand that binds to (e.g., activates)...NKG2D");
- (b) a second antigen-binding site that binds a tumor-associated antigen selected from the group consisting of FLT1, KDR, TNC, TNN, CSPG4, BST1, SELP, CD200, INSR (HHFS), ITGA6, MELTF, PECAM1, and SLC1A5 (para [0642] - "the multispecific molecule, e.g., the tumor-targeting moiety, binds to a stromal antigen... the stromal antigen is chosen from one or more of: fibroblast activating protease (FAP), TGF-beta, hyaluronic acid, collagen, e.g., collagen IV, tenascin C"; note tenascin C is a synonym of TNC); and
- (c) an antibody Fc domain or a portion thereof sufficient to bind CD16, or a third antigen-binding site that binds CD16 (para [0671] - "multi-specific (e.g., bi-, tri-, quad-specific) proteins, that are engineered to contain one or more NK cell engager that mediate binding to and/or activation of an NK cell...the NK cell engager is selected from an antigen binding domain or ligand that binds to (e.g., activates)...CD16 (e.g., CD16a, CD16b, or both); para [0681] - "the NK cell engager is a ligand of CD16, which is a CD16a/b ligand, e.g., a CD16a/b ligand further comprising an antibody Fc region").

—please see continuation in next extra sheet—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 19/45723

Continuation of previous extra sheet

The feature shared by Groups I+ is a protein, wherein the second antigen-binding site comprising a single-chain variable fragment (scFv) that binds B7-H3 (applicant's claim 1).

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 2016/0369002 A1 to Innate Pharma (hereinafter "Innate"), in view of Elstar. Innate teaches a protein (Abstract - "Multispecific proteins that bind and specifically redirect NK cells to lyse a target cell of interest are provided without non-specific activation of NK cells in absence of target cells."; para [0018] - "the invention provides a multispecific protein that comprises (i) a first antigen binding domain ("ABD") that binds to a human NKp46 polypeptide, (ii) an Fc domain that binds to human CD16A, and (iii) a second antigen binding domain that binds to an antigen of interest expressed by a target cell") comprising:

(a) a first antigen-binding site comprising an Fc domain that binds a NK receptor (para [0283] - "the invention provides is an antibody ... including a bispecific monomeric polypeptide, or a NKp46-binding multispecific protein that binds essentially the same epitope or determinant as monoclonal antibody NKp46-1, NKp46-2, NKp46-3, NKp46-4, NKp46-6 or NKp46-9; optionally the antibody comprises a hypervariable region of antibody NKp46-1, NKp46-2, NKp46-3, NKp46-4, NKp46-6 or NKp46-9...the antibody comprises the Fab or F(ab')₂ portion of NKp46-1, NKp46-2, NKp46-3, NKp46-4, NKp46-6 or NKp46-9");

(b) a second antigen-binding site comprising a single-chain variable fragment (scFv) that binds B7-H3 (para [0181] - "the antigen of interest is a cancer antigen, e.g. one of the cancer antigens listed above known to internalize (e.g., B7-H3..."); para [0297] - "the invention provides a bispecific antibody comprising an antibody that binds human NKp46...optionally further fused (optionally via intervening amino acid sequences) to a second antigen binding domain (e.g. a scFv...). Optionally the second antigen binding domain will bind a cancer antigen"); and

(c) an antibody Fc domain or a portion thereof of sufficient to bind CD16, or a third antigen-binding site that binds CD16 (para [0018] - "the invention provides a multispecific protein that comprises...(ii) an Fc domain that binds to human CD16A").

Innate does not teach the NK receptor is NKG2D. However, Innate does teach the multispecific protein comprising binding sites against the two NK receptors NKp46 and CD16 to generate a combined effects in the promotion of NK cell-mediated target cell lysis (para [0003] - "Multispecific proteins that bind and specifically redirect effector cells to lyse a target cell of interest via multiple activating receptors are provided"; para [0013] - "The present invention arises in part from the observation that multispecific proteins which bind to an antigen of interest and which are further engineered to bind to NKp46 on NK cells monovalently, and to CD16 or CD16A, exhibit an enhanced capability to promote NK cell-mediated target cell lysis...it was observed that such multispecific proteins elicited the individual and combined effects of these receptors thereby better promoting the lysis of target cells by NK cells.");

Elstar teaches a multispecific protein that comprises a moiety binding a tumor-associated antigen, and one or more NK engager including NKG2D and CD16 (Abstract - "Multispecific molecules that include i) a tumor-targeting moiety; and one, two or all of: (ii) an immune cell engager (e.g., chosen from an NK cell engager, a T cell engager, a B cell engager, a dendritic cell engager, or a macrophage cell engager)"; para [0671] - "multi-specific (e.g., bi-, tri-, quad-specific) proteins, that are engineered to contain one or more NK cell engager that mediate binding to and/or activation of an NK cell ... the NK cell engager is selected from an antigen binding domain or ligand that binds to (e.g., activates): ... NKG2D ... CD16 (e.g., CD16a, CD16b, or both)").

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art the first antigen-binding site can comprise an Fc fragment against NKG2D, in order to engage multiple NK cell receptors to generate a combined effect of NK-cell mediated lysis of B7H3-expressing cells.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+, II, and III therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

NOTE: Claims 22-24 are objected to for lack of clarity. As drafted, the claims recite "A protein according comprising". For the purposes of this application the claims are construed as if they instead state: "A protein comprising".

NOTE: Claims 7-13, 15-21, 31-32, 35-131 are improper multiple dependent claims because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	

(31)優先権主張番号 62/716,106

(32)優先日 平成30年8月8日(2018.8.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 チャン, グレゴリー ピー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 5 5, メドフォード, サンダース ストリート 1 4 3

(72)発明者 チュン, アン エフ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 3, リンカーン, モーニングサイド レーン 2 5

(72)発明者 ドゥ, ジンヤン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 2, ウォルサム, レキシントン ストリート 1 1 0 5, ユニット 4-5

(72)発明者 グリンバーク, アシャ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 1, レキシントン, フォレン ロード 3 7

(72)発明者 ヘイニー, ウィリアム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 8, ウェイランド, リンカーン ロード 6 1

(72)発明者 ランディ, ブラッドリー エム.

アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 0 3 7 6 6, レバノン, ルーセント ドライブ 7

(72)発明者 プリンツ, ビアンカ

アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 0 3 7 6 6, レバノン, ルーセント ドライブ 7

Fターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA25 CA44

4C085 AA14 BB01 CC23 DD62 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 EA28 FA72 FA74