

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-536791
(P2024-536791A)

(43)公表日 令和6年10月8日(2024.10.8)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A	4 H 0 4 5
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全78頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-517107(P2024-517107)				
(86)(22)出願日	令和4年9月15日(2022.9.15)				
(85)翻訳文提出日	令和6年5月10日(2024.5.10)				
(86)国際出願番号	PCT/US2022/043708				
(87)国際公開番号	WO2023/043955				
(87)国際公開日	令和5年3月23日(2023.3.23)				
(31)優先権主張番号	63/245,132				
(32)優先日	令和3年9月16日(2021.9.16)				
(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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く				
(71)出願人	524100965 ジーティー バイオファーマ インコーポ レイテッド アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォル ニア州 プリスベン マリーナ ブールバ ード 8 0 0 0 スイート 1 0 0				
(74)代理人	100102978 弁理士 清水 初志				
(74)代理人	100205707 弁理士 小寺 秀紀				
(74)代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝				
(74)代理人	100119507 弁理士 刑部 俊				
(74)代理人	100142929				
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 B 7 - H 3 標的指向融合タンパク質及びそれを使用する方法

(57)【要約】

本発明は、B 7 - H 3 標的指向融合タンパク質及びその使用方法を提供する。本標的指向融合タンパク質は、B 7 - H 3 標的指向結合タンパク質と、C D 1 6 標的指向結合タンパク質と、インターロイキン-1 5 タンパク質とを含む、B 7 - H 3 標的指向三重特異性キラーエンゲージャー分子を含む。その使用方法には、がんを処置する方法、がん細胞に対するナチュラルキラー (N K) 細胞活性を誘導する方法、腫瘍増殖を阻害する方法、がんを有する対象の生存を増加させる方法、及び対象におけるがん細胞に対するN K媒介抗体依存性細胞傷害を誘導する方法が含まれる。

【選択図】 図 1 A



FIGURE 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 3 若しくは 1 4 で示される単離された核酸配列、又はそれに対して 9 0 % の同一性を有する配列。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の核酸配列によりコードされた、タンパク質。

【請求項 3】

アミノ酸配列が、配列番号 6 又は 7 から選択される、請求項 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

いずれかの向きで互いに、作動可能に連結されている、配列番号 6 及び 7 で示されるアミノ酸配列を含む、融合タンパク質。

【請求項 5】

前記タンパク質が、配列番号 6 の C 末端と配列番号 7 の N 末端との間で直接連結した配列番号 6 及び 7 を含む、請求項 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

前記タンパク質が、配列番号 7 の C 末端と配列番号 6 の N 末端との間で直接連結した配列番号 7 及び 6 を含む、請求項 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7】

配列番号 1 で示される配列、及び配列番号 1 に対して 9 0 % 以上の同一性を有する配列を含む、融合タンパク質。

【請求項 8】

作動可能に連結して、配列番号 2 又は 1 9 ; 配列番号 4 、 1 7 又は 1 8 ; 配列番号 6 及び 7 、 又は 7 及び 6 を含む、融合タンパク質。

【請求項 9】

配列番号 2 又は 1 9 と、配列番号 4 、 1 7 又は 1 8 とが、配列番号 3 又は配列番号 1 5 によって連結されている、請求項 8 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 0】

配列番号 4 、 1 7 又は 1 8 と、配列番号 6 又は 7 とが、配列番号 5 又は配列番号 1 6 によって連結されている、請求項 8 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 1】

配列番号 6 及び 7 が、いずれかの向きで、作動可能に連結している、請求項 8 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 2】

半減期延長 (H L E) 分子を更に含む、請求項 8 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 3】

前記 H L E 分子が、配列番号 2 1 ~ 2 5 のうちのいずれか 1 つを含む、F c 又は s c F c 抗体断片である、請求項 1 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 4】

配列番号 4 が、N 7 2 置換を有する、請求項 8 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 5】

前記 N 7 2 変異が、N 7 2 A 又は N 7 2 D である、請求項 1 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 6】

前記タンパク質が、配列番号 1 7 又は 1 8 で示される、請求項 1 5 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 7】

請求項 7 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする、単離された核酸配列。

【請求項 1 8】

配列番号 8 である、請求項 17 に記載の単離された核酸配列。

【請求項 19】

対象におけるがんを処置する方法であって、前記対象に、請求項 7～16 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を投与し、それによって前記がんを処置することを含む、方法。

【請求項 20】

前記がんが、非小細胞性肺がん、皮膚扁平上皮細胞癌、膵臓がん、原発性肝細胞癌、結腸直腸癌、淡明細胞型腎細胞癌、又は乳がんから選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

配列番号 19 と、配列番号 17 又は 18 と、いずれかの向きでの配列番号 6 及び 7 とを含む、融合タンパク質。

【請求項 22】

配列番号 19 が、配列番号 3 又は 15 のリンカーによって、配列番号 17 又は 18 に作動可能に連結されている、請求項 21 に記載の融合タンパク質。

【請求項 23】

配列番号 17 又は 18 が、配列番号 5 又は 16 のリンカーによって、いずれかの向きでの配列番号 6 及び 7 に作動可能に連結されている、請求項 21 に記載の融合タンパク質。

【請求項 24】

半減期延長（HLE）分子を更に含む、請求項 21 に記載の融合タンパク質。

【請求項 25】

前記 HLE 分子が、配列番号 21～25 のうちのいずれか 1 つを含む、Fc 又は scFc 抗体断片である、請求項 24 に記載の融合タンパク質。

【請求項 26】

配列番号 1 のアミノ酸配列、又は配列番号 1 に対して 90% 以上の同一性を有する配列を含む、治療上有効な量の融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 27】

対象におけるがんを処置する方法であって、前記対象に、請求項 26 に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 28】

対象におけるがん細胞に対するナチュラルキラー（NK）細胞活性を誘導する方法であって、前記対象に、配列番号 1 で示される配列、及び配列番号 1 に対して 90% 以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与し、それによって前記対象におけるがん細胞に対する NK 細胞活性を誘導することを含む、方法。

【請求項 29】

NK 細胞活性を誘導することが、NK 細胞脱顆粒を誘導すること、インターフェロン γ の NK 細胞産生を誘導すること、前記対象における腫瘍浸潤 NK 細胞の数を増加させること、及び／又は NK 細胞増殖を誘導する若しくは増加させることを含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

対象における腫瘍増殖を阻害する方法であって、前記対象に、配列番号 1 で示される配列、及び配列番号 1 に対して 90% 以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与し、それによって前記対象における腫瘍増殖を阻害することを含む、方法。

【請求項 31】

腫瘍増殖を阻害することが、腫瘍細胞の生存を減少させることを含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

がんを有する対象の生存を増加させる方法であって、前記対象に、配列番号 1 で示される配列、及び配列番号 1 に対して 90% 以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与し、それによって前記対象の生存を増加させることを含む、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 33】

対象におけるがん細胞に対するナチュラルキラー（NK）媒介抗体依存性細胞傷害性を誘導する方法であって、前記対象に、配列番号 1 で示される配列、及び配列番号 1 に対して 90% 以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与し、それによって前記対象の生存を増加させることを含む、方法。

【請求項 34】

前記対象に抗がん処置を施すことを更に含む、請求項 27、28、30、32、又は 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記対象が、がんを有する、請求項 27、28、30、32、又は 33 に記載の方法。

10

【請求項 36】

前記がんが、肺がん、前立腺がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、及び頭頸部がんからなる群から選択される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

がん細胞が、B7-H3 発現がん細胞である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

前記がんが、処置耐性がんである、請求項 35 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

関連出願の相互参照

本出願は、2021 年 9 月 16 日に提出された米国仮出願第 63/245,132 号の米国特許法第 119 条（e）に基づく優先権の利益を主張する。先行出願の開示は、本明細書の一部とみなされ、参照によりその全体が本出願の開示に組み込まれる。

【0002】

配列表の組み込み

添付の配列表内の材料は、参照により本出願に組み込まれる。添付の配列表 xml ファイル G1421US00__GTBIO2180-1WO.xml は、2022 年 9 月 13 日に作成され、サイズは 55 kb である。

【0003】

30

発明の分野

本発明は、概して、融合タンパク質に関し、より具体的には、B7-H3 標的指向三重特異性キラーエンゲージャー分子、及びがんを処置するためのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0004】

背景情報

免疫療法は、免疫系を活性化又は抑制して免疫応答を増幅又は減少させる個別化処置であり、様々な種類のがんを処置するために急速に開発が行われている。がんに対する免疫療法、例えば、キメラ抗原受容体（CAR）-T 細胞、CAR-ナチュラルキラー（NK）細胞、PD-1 及び PD-L1 阻害剤は、患者の免疫系ががんと闘うのを助けることを目的とする。T 細胞の活性化は、T 細胞受容体（TCR）とペプチド結合主要組織適合性複合体（MHC）との特異的組み合わせ、並びに T 細胞の共刺激分子と抗原提示細胞（APC）におけるリガンドとの相互作用の両方に依存する。活性化 APC における表在性膜タンパク質である B7 ファミリーは、T 細胞応答の調節に関与することが示されている。最近の研究は、がん微小環境における阻害性 B7 分子の上方制御が、腫瘍の免疫逃避に高度に関連していることを示している。B7 ファミリーの新たに同定されたメンバーとして、B7-H3 は、T 細胞の活性化及び IFN- γ の産生を促進することができる。

40

【0005】

異なる B7 分子は、免疫細胞応答を調節しながら、正の共刺激シグナル又は負の共刺激シグナルのいずれかを有する。PD-1、PD-L1、PD-L2、及び CTLA4 など

50

の免疫チェックポイントは、免疫系を逃避し、増殖を促進するために多くの受容体ーリガンド相互作用を有する分子である。これらのタンパク質を遮断するいくつかのモノクローナル抗体 (mAb) が、阻害性免疫応答を下方制御し、腫瘍細胞を排除するT細胞の細胞傷害性を促進するために開発されている。免疫チェックポイント遮断薬の中で、PD-1又はCTLA4を標的指向する阻害剤は、転移性メラノーマを有する患者の処置に功を奏して使用され、応答を改善し、寿命を延ばした。この成功は、腎細胞癌 (RCC)、NSCLC、及び急性骨髄性白血病 (AML) を含む広範囲の悪性腫瘍を処置するためのそうした薬剤の開発につながり、これは、従来の処置と比較して応答率を更に向上させ、患者の生存期間を延長した (Yang et al., Int J Biol Sci 2020; 16 (11): 1767-1773 (非特許文献1))。

10

【0006】

B7-H3は、いくつかの種類のヒトがん細胞において過剰発現し、疾患の悪化と相関していることが見出された。B7-H3は、T細胞活性化及びIFN- γ 産生などの免疫反応のための共刺激分子として認識された。TCRシグナルを模倣する抗CD3抗体の存在下で、ヒトB7-H3-Ig融合タンパク質は、CD4+及びCD8+T細胞の両方の増殖を増加させ、インビトロで細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 活性を増強する。B7-H3はまた、結腸の腺癌に対して抗腫瘍効果を有し、これはまた、結腸がんの処置のための有望な療法とみなされ得る。ヒト膵臓がん患者を対象とした研究では、B7-H3は、膵臓がんで大量発現しただけでなく、処置有効性の増大にも関連する共刺激分子として認識された。B7-H3発現は、ほとんどの検査された膵臓がん試料において検出可能であり、正常な膵臓と比較して、膵臓がんにおいて有意に上方制御されたが、高い腫瘍B7-H3レベルを有する患者は、低い腫瘍B7-H3レベルを有する患者よりも有意に良好な術後予後を有した (Yang et al., ibid)。

20

【0007】

一定の成功にもかかわらず、mAb療法の全体的な効率を低下させる制限が存在する。CD16指向性二重特異性及び三重特異性単鎖可変領域フラグメント (BiKE及びTriKE) 組換え分子の開発により、それらが全抗体のFc部分を欠き、CD16に対する標的特異性を有するため、高エフェクター機能を誘発しながらも、これらの望ましくない制限の大部分が回避される (Gleason et al., Mol Cancer Ther; 11 (12); 2674-84, 2012 (非特許文献2))。その結果、組換え試薬は、ナチュラルキラー (NK) 細胞免疫療法を増強する際の臨床用途にとって魅力的である。

30

【0008】

標的を認識して殺傷するNK細胞の能力は、阻害性の及び活性化された細胞表面受容体の複雑なレパートリーによって調節される。NK細胞の細胞傷害は、天然細胞傷害性受容体 (NCR) により媒介される天然細胞傷害性によって生じ得、又はリツキシマブなどの抗体によって、NK細胞のCD56^{dim}サブセットによって高度に発現される、免疫グロブリンG (IgG) の活性化低親和性Fc- γ 受容体であるCD16を介して抗体依存性細胞傷害 (ADCC) をトリガーすることによって生じ得る。CD16/CD19 BiKE、及びCD16/CD19/CD22 TriKEは、CD16の直接的シグナル伝達を通じてNK細胞の活性化をトリガーし、溶菌性顆粒の指向性分泌及び標的細胞死を誘導することができる。更に、これらの試薬は、サイトカイン及びケモカイン産生につながるNK細胞活性化を誘導する。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Yang et al., Int J Biol Sci 2020; 16 (11): 1767-1773

【非特許文献2】Gleason et al., Mol Cancer Ther; 11 (12); 2674-84, 2012

50

【発明の概要】

【0010】

本発明は、B3-H7標的指向融合タンパク質、具体的には、B7-H3標的指向三重特異性キラーエンゲージャー分子（TriKE）の開発、及びそれを使用する方法に基づくものである。

【0011】

一実施形態では、本発明は、配列番号13若しくは14で示される単離された核酸配列、又はそれに対して90%の同一性を有する配列を提供する。

【0012】

別の実施形態では、本発明は、配列番号13若しくは14で示される核酸配列、又はそれに対して90%の同一性を有する配列によってコードされた、タンパク質を提供する。

10

【0013】

一態様では、アミノ酸配列は、配列番号6又は7から選択される。

【0014】

追加の実施形態では、本発明は、いずれかの向きで互いに、作動可能に連結されている配列番号6及び7で示されるアミノ酸配列、を含む、融合タンパク質を提供する。

【0015】

一態様では、タンパク質は、配列番号6のC末端と配列番号7のN末端との間で直接連結した配列番号6及び7を含む。別の態様では、タンパク質は、配列番号7のC末端と配列番号6のN末端との間で直接連結した配列番号7及び6を含む。

20

【0016】

更なる実施形態では、本発明は、配列番号1で示される配列、及び配列番号1に対して90%以上の同一性を有する配列を含む、融合タンパク質、を提供する。

【0017】

一実施形態では、本発明は、作動可能に連結して、配列番号2又は19；配列番号4、17又は18；配列番号6及び7、又は7及び6を含む、融合タンパク質を提供する。

【0018】

一態様では、配列番号2又は19と、配列番号4、17又は18とが、配列番号3又は配列番号15によって連結される。別の態様では、配列番号4、17又は18と、配列番号6又は7とが、配列番号5又は配列番号16によって連結される。他の態様では、配列番号6及び7は、いずれかの向きで作動可能に連結している。いくつかの態様では、融合タンパク質は、半減期延長（HLE）分子を更に含む。一態様では、HLE分子は、配列番号21～25のうちのいずれか1つを含むFc又はscFc抗体断片である。いくつかの態様では、配列番号4は、N72置換を有する。様々な態様では、N72変異は、それぞれ配列番号17及び18で示されるN72A又はN72Dである。

30

【0019】

追加の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される融合タンパク質のいずれかをコードする、単離された核酸配列を提供する。

【0020】

一態様では、前記配列は、配列番号8である。

40

【0021】

別の実施形態では、本発明は、対象に、本明細書に記載の融合タンパク質のいずれかを投与し、それによってがんを処置することを含む、対象におけるがんを処置する方法を提供する。

【0022】

一態様では、がんは、非小細胞性がん、皮膚扁平上皮細胞癌、膵臓がん、原発性肝細胞癌、結腸直腸癌、淡明細胞型腎細胞癌、又は乳がんから選択される。

【0023】

追加の実施形態では、本発明は、作動可能に連結して、配列番号2と、配列番号4と、いずれかの向きでの配列番号6及び7とを含む、融合タンパク質、又は配列番号19と、

50

配列番号 17 又は 18 と、いずれかの向きでの配列番号 6 及び 7 とを含む、融合タンパク質、並びに、そうしたタンパク質をコードする核酸配列を提供する。

【0024】

一態様では、配列番号 19 は、配列番号 3 又は 15 のリンカーによって、配列番号 17 又は 18 に作動可能に連結される。別の態様では、配列番号 17 又は 18 は、配列番号 5 又は 16 のリンカーによって、いずれかの向きでの配列番号 6 及び 7 に作動可能に連結される。いくつかの態様では、融合タンパク質は、半減期延長（HLE）分子を更に含む。一態様では、HLE 分子は、配列番号 21～25 のうちのいずれか 1 つを含む、Fc 又は scFc 抗体断片である。

【0025】

一実施形態では、本発明は、配列番号 1 のアミノ酸配列、又は配列番号 1 に対して 90 % 以上の同一性を有する配列を含む、治療上有効な量の融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物を提供する。

【0026】

別の実施形態では、本発明は、対象に、本明細書に記載される医薬組成物を投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法を提供する。

【0027】

追加の実施形態では、本発明は、対象におけるがん細胞に対するナチュラルキラー（NK）細胞活性を誘導する方法であって、対象に、配列番号 1 で示される配列、及び配列番号 1 に対して 90 % 以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与し、それによって対象におけるがん細胞に対する NK 細胞活性を誘導することを含む、方法を提供する。

【0028】

一態様では、NK 細胞活性を誘導することは、NK 細胞脱顆粒を誘導すること、インターフェロン γ の NK 細胞産生を誘導すること、対象における腫瘍浸潤 NK 細胞の数を増加させること、及び／又は NK 細胞増殖を誘導する若しくは増加させることを含む。

【0029】

一実施形態では、本発明は、対象における腫瘍増殖を阻害する方法であって、対象に、配列番号 1 で示される配列、及び配列番号 1 に対して 90 % 以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与し、それによって対象における腫瘍増殖を阻害する、方法を提供する。

【0030】

一態様では、腫瘍増殖を阻害することは、腫瘍細胞生存を減少させることを含む。

【0031】

別の実施形態では、本発明は、がんを有する対象の生存を増加させる方法であって、対象に、配列番号 1 で示される配列、及び配列番号 1 に対して 90 % 以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与し、それによって対象の生存を増加させることを含む、方法を提供する。

【0032】

追加の実施形態では、本発明は、対象におけるがん細胞に対するナチュラルキラー（NK）媒介抗体依存性細胞傷害を誘導する方法であって、対象に、配列番号 1 で示される配列、及び配列番号 1 に対して 90 % 以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与し、それによって対象の生存を増加させることを含む、方法を提供する。

【0033】

一態様では、対象に、配列番号 1 で示される配列、及び配列番号 1 に対して 90 % 以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与することは、対象に抗がん処置を施すことを更に含む。

【0034】

別の態様では、対象は、がんを有する。いくつかの態様では、がんは、肺がん、前立腺がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、及び頭頸部がんからなる群から選択される。他の態様で

10

20

30

40

50

は、がん細胞は、B7-H3発現がん細胞である。いくつかの態様では、がんは、処置耐性がんである。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1A】図1A～1Dは、cam1615B7-H3三重特異性キラーエンゲージャー (TriKE) の構築及び単離を示す。図1Aは、(左から右に) ラクダ科抗CD16 VHHと、ヒトIL-15と、抗B7-H3のscFvと、からなる、TriKE構築物の概略表現である。図1Bは、イオン交換 (FFQ) カラムでのcam1615B7-H3の第一段階精製からのクロマトグラフィートレースを例示するグラフである。収集ピークは、両方向矢印で示される。図1Cは、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) カラムでのcam1615B7-H3の第二段階精製からのクロマトグラフィートレースを例示するグラフである。収集ピークは、両方向矢印で示される。図1Dは、2つの直交するカラムステップ後の最終生成物の純度を示す、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) ゲルの写真である。ゲルのレーンは、分子マーカー、非還元 (NR) 生成物、及び還元 (R) 生成物を表す。

10

【図1B】図1Aの説明を参照。

【図1C】図1Aの説明を参照。

【図1D】図1Aの説明を参照。

【図2A】図2A～2Hは、cam1615B7-H3 TriKEが、強力かつ特異的なナチュラルキラー (NK) 細胞増殖を誘導することを示す。末梢血単核細胞 (PBMC) を、CellTrace Violetで標識し、5nMの等モル濃度のrhIL-15又はcam1615B7-H3 TriKEで7日間インキュベートした。7日目に、細胞を採取し、フローサイトメトリー評価のために染色した。図2Aは、CellTrace Violet色素の希釈として測定した、NK細胞 (CD56+CD3-) 増殖を示す代表的なヒストグラムを示す。図2Bは、増殖したNK細胞の全体的な割合を示す、プールされたデータを例示するグラフである。図2Cは、高度に増殖した (3回を超える分裂の増殖として測定される) NK細胞の割合を示す、プールされたデータを例示するグラフである。図2Dは、培養物 (N=9) 中のNK細胞カウントを示す、プールされたデータを例示するグラフである。図2Eは、T細胞 (CD56-CD3+) 増殖を示す代表的なヒストグラムである。図2Fは、増殖したT細胞の全体的な割合を示す、プールされたデータを例示するグラフである。図2Gは、高度に増殖したT細胞の割合を示す、プールされたデータを例示するグラフである。図2Hは、培養物中のT細胞カウントを示す、プールされたデータを例示するグラフである (N=9)。* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。

20

30

【図2B】図2Aの説明を参照。

【図2C】図2Aの説明を参照。

【図2D】図2Aの説明を参照。

【図2E】図2Aの説明を参照。

【図2F】図2Aの説明を参照。

【図2G】図2Aの説明を参照。

【図2H】図2Aの説明を参照。

40

【図3A】図3A～3Bは、camB7-H3 TriKE結合特異性を例示する。図3Aは、B7-H3陽性がん細胞へのTriKE分子の結合の概略表現である。図3Bは、WT B7-H3に対する結合特異性を例示するものであり、BT-12小児脳腫瘍株はB7-H3 (WT) を高発現し、CRISPRを使用してB7-H3 KO BT-12 (赤) 細胞株を産生した。

【図3B】図3Aの説明を参照。

【図4A】図4A～4Bは、TriKE分子によるADCC誘導を例示する。図4Aは、WT TriKEのADCC誘導を示すグラフである。図4Bは、CD16 TriKEのADCC誘導を示すグラフである。

50

【図 4 B】図 4 A の説明を参照。

【図 5 A】図 5 A ～ 5 B は、無し～非常に高レベルまで、B 7 - H 3 発現のレベルが異なる悪性血液疾患細胞株で行われた機能アッセイを例示する。図 5 A は、フローサイトメトリー (n = 3)、Inc u C y t e、又は x C e l l i g e n c e アッセイによって測定した C D 1 0 7 a を使用して測定された N K 細胞活性化を例示するグラフである。図 5 B は、フローサイトメトリー (n = 3)、Inc u C y t e、又は x C e l l i g e n c e アッセイによって測定した I F N ガンマを使用して測定された N K 細胞活性化を例示するグラフである。

【図 5 B】図 5 A の説明を参照。

【図 6 A】図 6 A ～ 6 B は、フローサイトメトリーによる、4 つの骨髓腫細胞株における B 7 - H 3 M F I を例示する。図 6 A は、フローサイトメトリーによる、骨髓腫株 R P M I - 8 2 2 6、U 2 6 6、M M 1 S、及び H 9 2 9 における B 7 - H 3 の発現を例示するグラフである。図 6 B は、図 6 A のデータを要約するグラフである。

【図 6 B】図 6 A の説明を参照。

【図 7】図 7 A ～ 7 B は、ライブイメージング Inc u C y t e Z o o m アッセイにおいて、B 7 - H 3 - T r i K E の有り又は無しでの、骨髓腫細胞を死滅させるための末梢血 N K 細胞の能力を例示する。図 7 A は、M M 1 S 細胞に対する、2 : 1 及び 4 : 1 のエフェクター : 標的 (E : T) 比による効果を示すグラフである。図 7 B は、U 2 6 6 細胞に対する、2 : 1 及び 4 : 1 のエフェクター : 標的 (E : T) 比による効果を示すグラフである。

【図 8】図 8 A ～ 8 D は、ライブイメージング Inc u C y t e Z o o m アッセイにおいて、B 7 - H 3 - T r i K E の有り又は無しでの、骨髓腫細胞を死滅させるための末梢血 N K 細胞の能力を例示する。図 8 A は、H 9 2 9 細胞に対する、2 : 1 及び 4 : 1 のエフェクター : 標的 (E : T) 比による効果を示すグラフである。図 8 B は、M M 1 S 細胞に対する、2 : 1 及び 4 : 1 のエフェクター : 標的 (E : T) 比による効果を示すグラフである。図 8 C は、R P M I - 8 2 2 6 細胞に対する、2 : 1 及び 4 : 1 のエフェクター : 標的 (E : T) 比による効果を示すグラフである。図 8 D は、U 2 6 6 細胞に対する、2 : 1 及び 4 : 1 のエフェクター : 標的 (E : T) 比による効果を示すグラフである。

【図 9】図 9 A ～ 9 D は、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (1 0 n M) 及び免疫調節薬レナリドミド (5 μ M) を伴う、B 7 - H 3 - T r i K E の有効性を例示する。図 9 A は、4 8 時間後の H 9 2 9 細胞に対する併用療法の効果を示すグラフである。図 9 B は、4 8 時間後の R P M I - 8 2 2 6 細胞に対する併用療法の効果を示すグラフである。図 9 C は、4 8 時間後の M M 1 S 細胞に対する併用療法の効果を示すグラフである。図 9 D は、4 8 時間後の U 2 6 6 細胞に対する併用療法の効果を示すグラフである。

【図 1 0 A】図 1 0 A ～ 1 0 D は、1 : 1 0 0 の比で骨髓腫細胞とインキュベートした場合の、健康なドナー由来の C D 3 3 + 骨髓細胞から発現した M D S C における B 7 - H 3 - T r i K E の効果を例示する。図 1 0 A は、B 7 - H 3 の M D S C (C D 1 4 + C D 1 1 b +) 発現を示すグラフである。図 1 0 B は、フローサイトメトリーによって測定された細胞生存を示すグラフである。図 1 0 C は、生存 C D 1 4 + 細胞のプロットである。図 1 0 D は、生存細胞イメージングによって 4 8 時間にわたって測定された H 9 2 9 増殖を例示するグラフである。

【図 1 0 B】図 1 0 A の説明を参照。

【図 1 0 C】図 1 0 A の説明を参照。

【図 1 0 D】図 1 0 A の説明を参照。

【図 1 1 A】図 1 1 A ～ 1 1 B は、B 7 - H 3 発現 M D S C の N K 媒介殺傷を例示する。図 1 1 A は、M D S C の B 7 - H 3 発現を示すグラフである。図 1 1 B は、1 : 1 の E : T で N K と共培養し、B 7 - H 3 T r i K E の有無に関係なく殺傷を比較した、M D S C の N K 媒介殺傷を例示するグラフである。

【図 1 1 B】図 1 1 A の説明を参照。

【図 1 2 A】図 1 2 A ～ 1 2 D は、c a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 T r i K E が、前立腺腫

10

20

30

40

50

瘍標的に対するNK細胞の機能を増強することを示す。図12Aは、CREB5、22RV1、及びEnza-R標的に対する、CD107a+（脱顆粒）を発現する健康なドナーに由来するNK細胞のプールされた割合を例示するグラフである。図12Bは、CREB5、22RV1、及びEnza-R標的に対するIFN γ サイトカイン産生を発現する健康なドナー由来のNK細胞のプールされた割合を例示するグラフである。図12Cは、CD107a+（脱顆粒）を発現する健康なドナー由来のNK細胞のプールされた割合を例示するグラフである。図12Dは、IFN γ サイトカイン産生を発現する健康なドナーからのNK細胞のプールされた割合を例示するグラフである。

【図12B】図12Aの説明を参照。

【図12C】図12Aの説明を参照。

【図12D】図12Aの説明を参照。

【図13A】図13A～13Bは、camB7-H3が、IL-15単独と比較して、前立腺がん細胞に対するNK細胞の機能及びNK増殖を増加させることを示す。図13Aは、前立腺がん細胞標的に対するIFN γ を発現するNK細胞のパーセントを示すグラフである。図13Bは、3回以上分裂するNK細胞の割合を例示するグラフである。

【図13B】図13Aの説明を参照。

【図14A】図14A～14Lは、TriKEが、前立腺がん細胞株に対するNK細胞の脱顆粒及び炎症性サイトカイン産生を誘導することができることを示す。図14Aは、CA-2標的に対するCD107a+を発現する健康なドナー又は前立腺がん患者由来のNK細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである。図14Bは、PC-3標的に対するCD107a+を発現する健康なドナー又は前立腺がん患者由来のNK細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである。図14Cは、DU-145標的に対するCD107a+を発現する健康なドナー又は前立腺がん患者由来のNK細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである。図14Dは、CA-2標的に対するIFN γ を発現する健康なドナー又は前立腺がん患者由来のNK細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである。図14Eは、PC-3標的に対するIFN γ を発現する健康なドナー又は前立腺がん患者由来のNK細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである。図14Fは、DU-145標的に対するIFN γ を発現する健康なドナー又は前立腺がん患者由来のNK細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである。図14Gは、LnCAP標的に対するCD107a+を発現する健康なドナー又は前立腺がん患者由来のNK細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである。図14Hは、VCAP標的に対するCD107a+を発現する健康なドナー又は前立腺がん患者由来のNK細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである。図14Iは、22RV1標的に対するCD107a+を発現する健康なドナー又は前立腺がん患者由来のNK細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである。図14Jは、LnCAP標的に対するIFN γ を発現する健康なドナー又は前立腺がん患者由来のNK細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである。図14Kは、VCAP標的に対するIFN γ を発現する健康なドナー又は前立腺がん患者由来のNK細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである。図14Lは、22RV1標的に対するIFN γ を発現する健康なドナー又は前立腺がん患者由来のNK細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである。

【図14B】図14Aの説明を参照。

【図14C】図14Aの説明を参照。

【図14D】図14Aの説明を参照。

【図14E】図14Aの説明を参照。

【図14F】図14Aの説明を参照。

【図14G】図14Aの説明を参照。

【図14H】図14Aの説明を参照。

【図14I】図14Aの説明を参照。

【図14J】図14Aの説明を参照。

【図14K】図14Aの説明を参照。

10

20

30

40

50

【図 1 4 L】図 1 4 A の説明を参照。

【図 1 5 A】図 1 5 A ~ 1 5 D は、c a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 T r i K E が、前立腺腫瘍標的に対する健康なドナー（黒色バー）及び前立腺がん患者（白色バー）の N K 細胞の機能を増強することを示す。図 1 5 A は、C 4 - 2 標的に対する C D 1 0 7 a + （上段）又は I F N γ （下段）を発現する健康なドナー若しくは前立腺がん患者由来の N K 細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである（健康なドナーについて N = 9、患者について N = 3）。図 1 5 B は、D U 1 4 5 標的に対する C D 1 0 7 a + （上段）又は I F N γ （下段）を発現する健康なドナー若しくは前立腺がん患者由来の N K 細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである（健康なドナーについて N = 9、患者について N = 3）。図 1 5 C は、L N C a P 標的に対する C D 1 0 7 a + （上段）又は I F N γ （下段）を発現する健康なドナー若しくは前立腺がん患者由来の N K 細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである（健康なドナーについて N = 9、患者について N = 3）。図 1 5 D は、P C 3 標的に対する C D 1 0 7 a + （上段）又は I F N γ （下段）を発現する健康なドナー若しくは前立腺がん患者由来の N K 細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである（健康なドナーについて N = 9、患者について N = 3）。* p < 0.05、** p < 0.01、*** p < 0.001、及び**** p < 0.0001。

10

【図 1 5 B】図 1 5 A の説明を参照。

【図 1 5 C】図 1 5 A の説明を参照。

【図 1 5 D】図 1 5 A の説明を参照。

【図 1 6】P C 3 標準 I n c u C y t e アッセイを例示するグラフである。

20

【図 1 7】様々な処置条件下における P C - 3 スフェロイドを例示する写真である。

【図 1 8】経時的な P C - 3 スフェロイドのサイズを例示するグラフである。

【図 1 9】経時的な P C - 3 スフェロイドのサイズを例示するグラフである。

【図 2 0】P C 3 スフェロイドの効率的な殺傷を媒介するための B 7 - H 3 の T r i K E 及び B i K E の能力を例示する写真を示す。

【図 2 1】経時的なセルインデックスを例示するグラフである。

【図 2 2】図 2 2 A ~ 2 2 F は、B 7 - H 3 の、エンザルタミド耐性前立腺がん細胞株表現型を例示する。図 2 2 A は、C R E B 5 + 細胞における B 7 - H 3 発現を例示するグラフである。図 2 2 B は、C 4 - 2 細胞における B 7 - H 3 発現を例示するグラフである。図 2 2 C は、L N - C a P 細胞における B 7 - H 3 発現を例示するグラフである。図 2 2 D は、エンザルタミド耐性 L N C a p 細胞における B 7 - H 3 発現を例示するグラフである。図 2 2 E は、P C 3 細胞における B 7 - H 3 発現を例示するグラフである。図 2 2 F は、2 2 R V 1 細胞における B 7 - H 3 発現を例示するグラフである。

30

【図 2 3 A】図 2 3 A ~ 2 3 L は、c a m B 7 - H 3 T r i K E が、以前の s c F v バージョンよりも広いダイナミックレンジにわたって、前立腺がん細胞に対する活性をどのように誘導するかを例示する。図 2 3 A は、0.3 nM の T r i K E の存在下での P B M C N K 単独における C D 1 0 7 a + N K 細胞のパーセントを例示するグラフである。図 2 3 B は、3 nM の T r i K E の存在下での P B M C N K 単独における C D 1 0 7 a + N K 細胞のパーセントを例示するグラフである。図 2 3 C は、30 nM の T r i K E の存在下での P B M C N K 単独における C D 1 0 7 a + N K 細胞のパーセントを例示するグラフである。図 2 3 D は、0.3 nM の T r i K E の存在下での P B M C N K 及び C A - 2 細胞における C D 1 0 7 a + N K 細胞のパーセントを例示するグラフである。図 2 3 E は、3 nM の T r i K E の存在下での P B M C N K 及び C A - 2 細胞における C D 1 0 7 a + N K 細胞のパーセントを例示するグラフである。図 2 3 F は、30 nM の T r i K E の存在下での P B M C N K 及び C A - 2 細胞における C D 1 0 7 a + N K 細胞のパーセントを例示するグラフである。図 2 3 G は、0.3 nM の T r i K E の存在下での P B M C N K 単独における I F N γ + N K 細胞のパーセントを例示するグラフである。図 2 3 H は、3 nM の T r i K E の存在下での P B M C N K 単独における I F N γ + N K 細胞のパーセントを例示するグラフである。図 2 3 I は、30 nM の T r i K E の存在下での P B M C N K 単独における I F N γ + N K 細胞のパーセントを例示するグラフである。図 2 3 J は、0

40

50

．3 nMのT r i K Eの存在下でのP B M C N K及びC A－2細胞におけるI F N γ ＋N K細胞のパーセントを例示するグラフである。図23Kは、3 nMのT r i K Eの存在下でのP B M C N K及びC A－2細胞におけるI F N γ ＋N K細胞のパーセントを例示するグラフである。図23Lは、30 nMのT r i K Eの存在下でのP B M C N K及びC A－2細胞におけるI F N γ ＋N K細胞のパーセントを例示するグラフである。

【図23B】図23Aの説明を参照。

【図23C】図23Aの説明を参照。

【図23D】図23Aの説明を参照。

【図23E】図23Aの説明を参照。

【図23F】図23Aの説明を参照。

【図23G】図23Aの説明を参照。

【図23H】図23Aの説明を参照。

【図23I】図23Aの説明を参照。

【図23J】図23Aの説明を参照。

【図23K】図23Aの説明を参照。

【図23L】図23Aの説明を参照。

【図24A】図24A～24Fは、B7－H3 T r i K Eが、肺腫瘍標的に対するN K細胞の機能を増強することを示す。図24Aは、A549腫瘍標的に対するC D107a＋を発現する健康なドナー由来のN K細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである（N＝6）。図24Bは、A549腫瘍標的に対するI F N γ を発現する健康なドナー由来のN K細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである（N＝6）。図24Cは、N C I－H322腫瘍標的に対するC D107a＋を発現する健康なドナー由来のN K細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである（N＝5）。図24Dは、N C I－H322腫瘍標的に対するI F N γ を発現する健康なドナー由来のN K細胞の割合のプールされた分析を示すグラフである（N＝5）。図24Eは、N C I－H460に対するC D107a＋を発現する健康なドナー（黒色バー）又は肺がん患者（白色バー）由来のN K細胞のプールされた割合を示すグラフである（N＝7）。図24Fは、N C I－H460に対するI F N γ を発現する健康なドナー（黒色バー）又は肺がん患者（白色バー）由来のN K細胞のプールされた割合を示すグラフである（N＝7）。**p<0.01、***p<0.001、及び****p<0.0001。

【図24B】図24Aの説明を参照。

【図24C】図24Aの説明を参照。

【図24D】図24Aの説明を参照。

【図24E】図24Aの説明を参照。

【図24F】図24Aの説明を参照。

【図25A】図25A～25Bは、処置なしのH N S C Cに対するN K細胞活性の評価を例示する。図25Aは、（脱顆粒のためのマーカーとしての）C D107a発現のパーセントを例示するグラフである。図25Bは、細胞内I F N－ γ 産生のパーセントを例示するグラフである。

【図25B】図25Aの説明を参照。

【図26A】図26A～26Bは、腫瘍及び免疫細胞におけるB7－H3発現の評価を例示する。図26Aは、フローサイトメトリーによる5つのH N S C C細胞株のB7－H3発現と、B7－H3単ドメインとの結合親和性を例示するグラフである。図26Bは、フローサイトメトリーによる健康なドナー由来のP B M CのB7－H3発現を例示するグラフである。

【図26B】図26Aの説明を参照。

【図27】図27A～27Dは、B7－H3 T r i K Eの機能的検証を例示する。図27Aは、C a l27トリオとともにインキュベートした健康なドナー由来のP B M CにおけるC D107a発現を例示するグラフである。図27Bは、C a l27トリオとともにインキュベートした健康なドナー由来のP B M CにおけるI F N－ γ 産生を例示するグラ

10

20

30

40

50

フである。図 27C は、Ca l 33 トリオとともにインキュベートした健康なドナー由来の P B M C における C D 1 0 7 a 発現を例示するグラフである。図 27D は、Ca l 33 トリオとともにインキュベートした健康なドナー由来の P B M C における I F N - γ 産生を例示するグラフである。

【図 28A】図 28A～図 28F は、リアルタイムイメージングアッセイを例示する。図 28A は、異なる条件：処置なし、又は 3 n M の I L - 1 5、B 7 - H 3 S D、及び B 7 - H 3 T r i K E の場合の、5 : 1 の E : T で N K 細胞と I n c u C y t e Z o o m イメージャー中で 48 時間インキュベーションした後の N u c l i g h t r e d 標識された Ca l 27 の生存を示すグラフである。図 28B は、N u c l i g h t r e d 標識された Ca l 27 のスフェロイドを例示する写真を示す。図 28C は、図 28B のスフェロイドのサイズを例示するグラフである。図 28D は、異なる条件：処置なし、又は 3 n M の I L - 1 5、B 7 - H 3 S D、及び B 7 - H 3 T r i K E の場合の、5 : 1 の E : T で N K 細胞と I n c u C y t e Z o o m イメージャー中で 48 時間インキュベーションした後の N u c l i g h t r e d 標識された Ca l 33 の生存を示すグラフである。図 28E は、N u c l i g h t r e d 標識された Ca l 33 のスフェロイドを例示する写真を示す。図 28F は、図 28E のスフェロイドのサイズを例示するグラフである。

10

【図 28B】図 28A の説明を参照。

【図 28C】図 28A の説明を参照。

【図 28D】図 28A の説明を参照。

20

【図 28E】図 28A の説明を参照。

【図 28F】図 28A の説明を参照。

【図 29A】図 29A～29B は、様々な用量の c a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 T r i K E が、卵巣腫瘍標的に対する N K 細胞の機能を増強することを示す。図 29A は、O V C A R 8 及び M A 1 4 8 標的に対する C D 1 0 7 a + (脱顆粒) を発現する健康なドナー由来の N K 細胞のプールされた割合を示すグラフである。図 29B は、O V C A R 8 及び M A 1 4 8 標的に対する I F N γ サイトカイン産生を発現する健康なドナー由来の N K 細胞のプールされた割合を示すグラフである。

【図 29B】図 29A の説明を参照。

【図 30A】図 30A～30I は、c a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 T r i K E が、卵巣腫瘍標的に対する N K 細胞の機能を増強することを示す。健康なドナー又は卵巣がん P B M C 細胞を、30 n M の T r i K E 又は対照条件で、2 : 1 の E : T 比で、卵巣腫瘍標的とともに 4 時間インキュベートした。図 30A は、O V C A R 8 標的に対する C D 1 0 7 a + (脱顆粒) を発現する健康なドナー由来の N K 細胞のプールされた割合を示すグラフである (N = 8)。図 30B は、O V C A R 8 標的に対する I F N γ サイトカイン産生を発現する健康なドナー由来の N K 細胞のプールされた割合を示すグラフである (N = 8)。図 30C は、O V C A R 3 標的に対する C D 1 0 7 a + (脱顆粒) を発現する健康なドナー由来の N K 細胞のプールされた割合を示すグラフである (N = 4)。図 30D は、O V C A R 3 標的に対する I F N γ サイトカイン産生を発現する健康なドナー由来の N K 細胞のプールされた割合を示すグラフである (N = 4)。図 30E は、O V C A R 5 標的に対する C D 1 0 7 a + (脱顆粒) を発現する健康なドナー由来の N K 細胞のプールされた割合を示すグラフである (N = 7)。図 30F は、O V C A R 5 標的に対する I F N γ サイトカイン産生を発現する健康なドナー由来の N K 細胞のプールされた割合を示すグラフである (N = 7)。図 30G は、M A - 1 4 8 標的に対する C D 1 0 7 a + (脱顆粒) を発現する健康なドナー (黒色バー) 又は卵巣がん患者 (白色バー) 由来の N K 細胞の割合のプールされた分析を例示するグラフである (N = 9)。図 30H は、M A - 1 4 8 標的に対する I F N γ を発現する健康なドナー (黒色バー) 又は卵巣がん患者 (白色バー) 由来の N K 細胞の割合のプールされた分析を例示するグラフである (N = 6)。図 30I は、腫瘍殺傷が I n c u C y t e イメージングアッセイを使用して評価されたことを例示するグラフである。N u c l i g h t R e d 発現 O V C A R 8 標的を、カスパーゼ 3 / 7 生存率

30

40

50

色素を用いて、48時間にわたって濃縮された健康なドナーNKとともにインキュベートした。生存（Nuc l i g h t Red + カスパーゼ3 / 7 -）腫瘍細胞のパーセンテージを48時間にわたって定量化し、腫瘍単独に対して正規化した。15分ごとに読み取り値を得た（4つの別々の実験を表す）。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、及び**** $p < 0.0001$ 。

【図30B】図30Aの説明を参照。

【図30C】図30Aの説明を参照。

【図30D】図30Aの説明を参照。

【図30E】図30Aの説明を参照。

【図30F】図30Aの説明を参照。

【図30G】図30Aの説明を参照。

【図30H】図30Aの説明を参照。

【図30I】図30Aの説明を参照。

【図31-1】cam1615B7-H3活性化NK細胞の高次元分析を示す。単独で、30nMのcam1615B7-H3 TriKEとともに、OVCAR8腫瘍とともに（2:1のE:T）、又は30nMのcam1615B7-H3 TriKE及びOVCAR8腫瘍とともにインキュベートした、3つのドナーのPBMCの連結分析。データをviSNE（CytoBank）で可視化し、CD45+CD56+CD3-細胞にゲーティングした。

【図31-2】図31-1の説明を参照。

【図32A】図32A~32Fは、cam1615B7-H3 TriKEが、インビボで卵巣腫瘍の進行を抑制するのに有効であることを例示する。図32Aは、雌のNSGマウスにおける異種卵巣がんMA-148-Lucモデルを示す図である（N=5/処置群）。図32Bは、濃縮されたNK細胞及び記載された処置で処置したMA148マウスモデルにおける、3週間にわたる総フラックス放射輝度（p/s）として測定される腫瘍進行を示す生体発光イメージングを示すグラフである。図32Cは、21日目のデータポイントにおける生体発光イメージング結果を例示するグラフである。図32Dは、21日目の総フラックス放射輝度（p/s）を例示する写真である。図32Eは、21日目におけるrhIL-15及びcam1615B7-H3 TriKE処置群の腹腔洗浄液からの、CD56+CD3-NK細胞数の散布図である。図32Fは、21日目のrhIL-15及びcam1615B7-H3 TriKE処置群の腹腔洗浄液からのNK細胞におけるCD16の培地蛍光強度の散布図である。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 。

【図32B】図32Aの説明を参照。

【図32C】図32Aの説明を参照。

【図32D】図32Aの説明を参照。

【図32E】図32Aの説明を参照。

【図32F】図32Aの説明を参照。

【発明を実施するための形態】

【0036】

発明の詳細な説明

本発明は、B7-H3標的指向融合タンパク質、及び具体的には、B7-H3標的指向三重特異性キラーエンゲージャー分子（TriKE）の開発、及びそれを使用する方法に基づく。

【0037】

本発明の組成物及び方法を説明する前に、本発明は、記載の特定の組成物、方法、及び実験条件に限定されず、そうした組成物、方法、及び条件は変化し得ることを理解されたい。また、発明の範囲は、添付の特許請求の範囲にのみ限定されるため、本明細書で使用する専門用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、限定することを意図するものではないことも理解されるべきである。

【0038】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、文脈により明らかにそうではないと指示されない限り、複数の参照を含む。したがって、例えば、「方法」への言及は、本開示などを讀んだ後に当業者に明白になるであろう本明細書に記載されるタイプの1つ以上の方法、及び／又はステップを含む。

【0039】

本明細書で言及される全ての刊行物、特許及び特許出願は、各個々の刊行物、特許又は特許出願が、参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されたのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0040】

別段に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者が通常理解するのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様又は等価である任意の方法及び材料が本発明の実施又は試験に使用され得るが、修正及び変形は、本開示の趣旨及び範囲内に包含されることが理解される。好ましい方法及び材料をここで記載する。

【0041】

一実施形態では、本発明は、配列番号13若しくは14で示される単離された核酸配列、又はそれに対して90%の同一性を有する配列を提供する。

【0042】

本明細書で使用される場合、「核酸」又は「オリゴヌクレオチド」という用語は、デオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)などのポリヌクレオチドを指す。核酸は、限定されないが、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、iRNA、miRNA、tRNA、ncRNA、rRNA、並びに、組換え的に産生され、化学的に合成された分子、例えばアプタマー、プラスミド、アンチセンスDNA鎖、shRNA、リボザイム、共役核酸、及びオリゴヌクレオチド、を含む。本発明によれば、核酸は、一本鎖又は二本鎖、及び直鎖状又は共有結合閉環状分子として存在し得る。核酸は、単離することができる。「単離された核酸」という用語は、核酸が、(i)例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、インビトロで増幅されたこと、(ii)クローニングによって組換えで産生されたこと、(iii)例えば切断及びゲル電気泳動による分離によって、精製されたこと、(iv)例えば化学合成によって、合成されたこと、又は(vi)試料から抽出されたこと、を意味する。核酸は、細胞への導入、すなわち、細胞のトランスフェクションのために、特に、DNAテンプレートからのインビトロ転写によって調製され得るRNAの形態で用いられ得る。更に、RNAは、配列の安定化、キャッピング、及びポリアデニル化によって、適用前に修飾することができる。

【0043】

本明細書で使用される場合、「増幅DNA」又は「PCR生成物」は、定義されたサイズのDNAの増幅された断片を指す。PCR生成物を検出するための様々な技術が利用可能であり、当技術分野で周知である。PCR産物の検出方法として、限定はされないが、アガロース若しくはポリアクリルアミドゲルを使用し、エチジウムブロマイド染色(DNAインターカラント)を追加する、ゲル電気泳動、標識プローブ(放射性若しくは非放射性的の標識、サザンブロッティング)、標識デオキシリボヌクレオチド(放射性若しくは非放射性的の標識の、直接組み込みのため)、又は増幅されたPCR産物の直接可視化のための銀染色；アガロース若しくはポリアクリルアミドゲル若しくは高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)に依存する、制限エンドヌクレアーゼ消化；特異的標識プローブ(放射性若しくは非放射性的の標識)に対する増幅DNAのハイブリダイゼーションを使用するドットプロット；紫外線検出を用いる高圧液体クロマトグラフィー；電位で開始する化学反応／光子検出とカップリングされた電気化学発光；及び目的のDNA断片を有するヌクレオチドの正確な順序を決定するための放射性若しくは蛍光標識デオキシリボヌクレオチドを用いる直接配列決定、オリゴライゲーションアッセイ(OLA)、PCR、qPCR、DNA配列決定、蛍光、ゲル電気泳動、磁気ビーズ、対立遺伝子特異的プライマー伸長

10

20

30

40

50

(ASPE) 及び／又は直接ハイブリダイゼーションが挙げられる。

【0044】

一般に、核酸は、Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, NY 2, 028 pages (2012) によって記載される技術；又は米国特許第7, 957, 913号；米国特許第7, 776, 616号、米国特許第5, 234, 809号、米国特許出願公開第2010/0285578号、及び米国特許出願公開第2002/0190663号に記載される技術などの種々の技術によって、抽出、単離、増幅、又は分析され得る。核酸分析の例として、限定はされないが、配列決定及びDNA-タンパク質相互作用が挙げられる。配列決定は、当該技術分野で周知の任意の方法によってもよい。DNA配列決定技術は、標識ターミネーター又はプライマー及びスラブ内又はキャピラリー内のゲル分離を用いる古典的なジデオキシ配列決定反応（サンガー法）、並びに、可逆的に終結される標識ヌクレオチドを用いる合成による配列決定、パイロシークエンシング、454シークエンシング、イルミナ／ソレクサ配列決定、標識オリゴヌクレオチドプローブのライブラリーとの対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション、標識クロンのライブラリーとの対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションとその後のライゲーションを用いる合成による配列決定、重合ステップ中の標識ヌクレオチドの組み込みのリアルタイムモニタリング、ポロニーシークエンシング、及びSOLIDシークエンシングなどの次世代配列決定法を含む。分離された分子は、ポリメラーゼ又はリガーゼを用いる逐次又は単一伸長反応によって、並びにプローブのライブラリーとの単一又は逐次ディファレンシャルハイブリダイゼーションによって配列決定されてもよい。

【0045】

「配列同一性」又は「パーセント同一性」という用語は、本明細書では互換的に使用される。2つのポリペプチド分子又は2つのポリヌクレオチド配列のパーセント同一性を決定するためには、配列が最適な比較目的のためにアライメントされる（例えば、第2のポリペプチド又はポリヌクレオチド配列との最適アラインメントのために、第1のポリペプチド又はポリヌクレオチドの配列に、ギャップが導入され得る）。次いで、対応するアミノ酸又はヌクレオチド位置におけるアミノ酸又はヌクレオチドを比較する。第1の配列における位置が第2の配列における対応する位置と同じアミノ酸又はヌクレオチドによって占有されている場合、それらの分子はその位置で同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、配列が共有する同一の位置の数の関数である（すなわち、%の同一性＝同一の位置の数／位置の総数（すなわち、重複している位置）×100）である。いくつかの実施形態では、比較目的のためにアラインメントされた参照配列（例えば、配列番号13又は14）の長さは、比較配列の長さの少なくとも80%であり、いくつかの実施形態では、少なくとも90%又は100%である。一実施形態では、2つの配列は、同じ長さである。

【0046】

所望の程度の配列同一性の範囲は、約80%～100%、及びその間の整数の値である。開示された配列と特許請求された配列との間のパーセント同一性は、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は少なくとも99.9%であり得る。一般に、完全一致は、参照配列（例えば、配列番号13又は14）の長さにわたって100%の同一性を示す。好ましくは、本明細書に提供される配列に対して100%同一ではない配列は、元の配列の機能（例えば、B7-H3又はCD16に結合する能力）を保持する。

【0047】

本明細書に記載のポリペプチド及びポリヌクレオチドに対して約85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.5%以上同一であるポリペプチド及びポリヌクレオチドが本開示内で具現化されている。例え

ば、ポリペプチドは、配列番号 13 又は 14 に対して 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 以上の同一性を有し得る。

【0048】

開示される配列のバリエーションには、対応する部分にわたり元のタンパク質に対して少なくとも約 70% の同一性を依然として残す、タンパク質骨格中への置換、欠失、又は挿入を含有するペプチド又は全長タンパク質も含まれる。類似のアミノ酸、すなわち、保存的アミノ酸置換が、配列の変化としてカウントされない場合、相同性からの更に大きな逸脱が許容される。保存的置換の例は、同じ又は類似特性を有するアミノ酸を含む。例示的なアミノ酸の保存的置換は、アラニンからセリンへ；アルギニンからリジンへ；アスパラギンからグルタミン又はヒスチジンへ；アスパラギン酸からグルタミン酸へ；システインからセリンへ；グルタミンからアスパラギンへ；グルタミン酸からアスパラギン酸へ；グリシンからプロリンへ；ヒスチジンからアスパラギン又はグルタミンへ；イソロイシンからロイシン又はバリンへ；ロイシンからバリン又はイソロイシンへ；リジンからアルギニン、グルタミン、又はグルタミン酸へ；メチオニンからロイシン又はイソロイシンへ；フェニルアラニンからチロシン、ロイシン又はメチオニンへ；セリンからトレオニンへ；トレオニンからセリンへ；トリプトファンからチロシンへ；チロシンからトリプトファン又はフェニルアラニンへ；バリンからイソロイシン、そしてロイシンへの変化を含む。

【0049】

別の実施形態では、本発明は、配列番号 13 若しくは 14 で示される核酸配列、又はそれに対して 90% の同一性を有する配列によってコードされるタンパク質を提供する。

【0050】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書では互換的に使用され、共有化学結合によって連結された少なくとも 2 つのアミノ酸の任意の鎖を指す。本明細書で使用される場合、ポリペプチドは、タンパク質全体又はその一部をコードする完全なアミノ酸配列を参照し得る。「タンパク質コード配列」又は特定のポリペプチド若しくはペプチドを「コードする」配列は、適切な調節配列の制御下に配置されると、インビトロ又はインビボで転写され（DNA の場合）、ポリペプチドに翻訳される（mRNA の場合）核酸配列である。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドン及び 3'（カルボキシル）末端の翻訳停止コドンによって決定される。コード配列には、原核生物又は真核生物 mRNA に由来する cDNA、原核生物又は真核生物の DNA に由来するゲノム DNA 配列、更には合成 DNA 配列が含まれるが、これらに限定されない。転写終結配列は、通常、コード配列の 3' に位置する。

【0051】

一態様では、アミノ酸配列は、配列番号 6 又は 7 から選択される。

【0052】

本明細書に提供される核酸配列は、例えば、抗体の軽鎖又は重鎖をコードすることができ、コードされたポリペプチドに、結合ドメイン又は特定の標的に対する標的指向ドメインを付与する。そうしたポリペプチドは、標的指向ペプチドと称され得る。

【0053】

「抗体」という用語は、一般に、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子を指す。「ネイティブ抗体」及び「インタクト免疫グロブリン」などは、通常、2 つの同一の軽（L）鎖及び 2 つの同一の重（H）鎖からなる、約 150,000 ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。任意の脊椎動物種からの軽鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）及びラムダ（ λ ）と呼ばれる、2 つの明確に異なるタイプのうちの 1 つに割り当てることができる。それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、異なるクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには、5 つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、及び IgM があり、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2

、I g G 3、I g G 4、I g A、及びI g A 2に更に分けられ得る。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 α 、 δ 、 ε 、 γ 、及び μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元構造は、周知である。

【0054】

典型的な抗体分子では、各軽鎖は、1つのジスルフィド共有結合によって重鎖に連結されている一方、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で変化する。各重鎖及び軽鎖は、規則的に離間した鎖間ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一端に可変ドメイン(VH)を有し、続いていくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一端に可変ドメイン(VL)及びその他端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインとアライメントし、軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインとアライメントする。特定のアミノ酸残基が軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に界面を形成すると考えられている。各可変領域は、相補性決定領域(CDR)又は超可変領域と呼ばれる3つのセグメントを含み、可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。重鎖及び軽鎖の可変ドメインは各々、3つのCDRによって結合された、主に β シート構成をとる4つのFR領域を含み、CDRは、 β シート構造を接続した場合によりその一部を形成するループを形成する。各鎖におけるCDRは、FRによって緊密に一緒に保持され、他方の鎖からのCDRとともに、抗体の抗原結合ドメイン又は標的指向ドメインの形成に寄与する(Kabat et al., NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, pages 647-669 [1991]を参照されたい)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与していないが、抗体の抗体依存性細胞傷害性への関与などの様々なエフェクター機能を呈する。

【0055】

抗体は、タンパク分解酵素パパインで実験的に切断することができ、これにより重鎖の各々が切断され、3つの別個の抗体断片が産生される。軽鎖及び軽鎖とほぼ等しい質量の重鎖の断片からなる2つのユニットは、Fab断片(すなわち、「抗原結合」断片)と呼ばれる。重鎖の2つの等しいセグメントからなる第3のユニットは、Fc断片と呼ばれる。Fc断片は、典型的に、抗原-抗体結合に関与しないが、抗原の身体からの除去に関与する後のプロセスにおいて重要である。本明細書で使用される場合、「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部分、好ましくは、インタクトな抗体の抗原結合領域又は可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'及びF(ab')₂、Fc断片又はFc融合生成物、一本鎖Fv(scFv)、ジスルフィド結合Fv(sdfv)、並びにVL又はVHドメインのいずれかを含む断片、ダイアボディ、トリボディなどが含まれる(Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 [1995])。

【0056】

Fab断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)を含有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端におけるいくつかの残基の付加により、Fab断片とは異なる。Fab'-SHとは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有するFab'の本明細書における呼称である。F(ab')₂抗体断片は、元来、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として産生された。抗体断片の他の化学的カップリングも周知である。

【0057】

抗体のFc領域は、細胞表面受容体及び補体系のいくつかのタンパク質と相互作用する抗体の尾部領域である。この特性は、抗体が免疫系を活性化することを可能にする。IgG、IgA及びIgD抗体アイソタイプにおいて、Fc領域は、抗体の2つの重鎖の第2及び第3の定常ドメインに由来する2つの同一のタンパク質断片からなり、IgM及びIgEのFc領域は、各ポリペプチド鎖に3つの重鎖定常ドメイン(CHドメイン2~4)を含む。IgGのFc領域は、高度に保存されたN-グリコシル化部位を有する。Fc断

片のグリコシル化は、Fc受容体媒介活性に不可欠である。この部位に結合したN-グリカンには、主に、複合型のコア-フコシル化された二分岐構造である。加えて、これらのN-グリカンのうち少量は、バイセクト型GlcNAc及び α -2, 6連結型シアル酸残基も有する。

【0058】

Fc融合タンパク質（Fcキメラ融合タンパク質、Fc-Ig、Igをベースとしたキメラ融合タンパク質及びFc-タグタンパク質としても周知である）は、目的のペプチド又はタンパク質に遺伝学的に連結されたIgGのFcドメインで構成される。Fc融合タンパク質は、インビボ及びインビトロでの研究のための価値ある試薬となっている。Fc融合結合パートナーは、単一のペプチドから、細胞表面受容体との結合時に活性化するリガンド、シグナル伝達分子、二量体化時に活性化される受容体の細胞外ドメイン、又はタンパク質マイクロアレイにおける結合パートナーを同定するために使用されるベイトタンパク質として、の範囲に及び得る。Fcドメインのインビボで最も価値ある特徴のうちの1つは、それが目的のタンパク質の血漿中半減期を劇的に延長することができることであり、それは生物治療薬に、改善された治療的効能をもたらす、Fc融合タンパク質を魅力的な生物治療剤にした属性である。Fc融合タンパク質は、Fc融合タンパク質及び薬学的に許容される担体賦形剤又は担体を含む医薬組成物の一部であり得る。薬学的に許容される担体、賦形剤、又は安定剤は、当該技術分野で周知である（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）。許容される担体、賦形剤、又は安定剤は、使用される用量及び濃度でレシピエントに無毒であり、以下：リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル若しくはベンジルアルコール、メチル若しくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール及びm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン若しくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース若しくはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース若しくはソルビトールなどの糖類；ナトリウムのような塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；及び／又はTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）若しくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤、を含む。

【0059】

「Fv」は、完全な抗原認識部位及び抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。この領域は、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインとが緊密であるが非共有性の結合で会合している二量体で構成される。この構成においては、各可変ドメインの3つのCDRが相互作用して、VH-VL二量体表面上の抗原結合部位を画定する。まとめると、6つのCDRが、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン（又は抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分）であっても、結合部位全体よりも低い親和性であるが、抗原を認識しそれに結合する能力を有する。

【0060】

「単鎖Fv」又は「sFv」抗体断片は、抗体のVH及びVLドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖の状態が存在する。好ましくは、Fvポリペプチドは、VHドメインとVLドメインとの間に、sFvが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーを更に含む。sFvの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (

1994)を参照されたい。

【0061】

抗体断片の産生のための様々な技術が開発されている。従来、これらの断片は、インタクト抗体のタンパク質分解消化を介して得られた(例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)、及びBrennan et al., Science, 229:81 (1985)を参照されたい)。しかしながら、これらの断片は現在、組換え宿主細胞によって直接産生することができる。例えば、抗体断片は、上述の抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Fab'-SH断片は、大腸菌(E. coli)から直接回収され、化学的に結合してF(ab')₂断片を形成してもよい(Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992))。別のアプローチによれば、F(ab')₂断片は、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。抗体断片を産生するための他の技術は、当業者には明らかであろう。他の実施形態では、選択される抗体は、単鎖Fv断片(scFv)である。WO93/16185を参照されたい。

【0062】

様々な態様において、本明細書で提供する核酸配列は、B3-H7タンパク質に特異的に結合する軽鎖及び重鎖をコードする。

【0063】

表面抗原分類276(CD276)としても周知のB7ホモログ3(B7-H3)は、CD276遺伝子によってコードされるヒトタンパク質である。B7-H3タンパク質は、その細胞外ドメインによって決定される2つのアイソフォームの状態で存在する316アミノ酸長のI型膜貫通タンパク質である。マウスでは、細胞外ドメインは、免疫グロブリン可変(IgV)様及び免疫グロブリン定常(IgC)様ドメインの単一の対からなるが、ヒトでは、エクソンの重複による1つの対(2Ig-B7-H3)又は2つの同一の対(4Ig-B7-H3)からなる。B7-H3のmRNAは、ほとんどの正常組織で発現される。対照的に、B7-H3タンパク質は、microRNAによるその転写後調節のため、正常組織において非常に限定的な発現を有する。しかしながら、B7-H3タンパク質は、多くの異なるがんタイプ(全てのがんの60%)において高頻度で発現する。

【0064】

非悪性組織において、B7-H3は、適応免疫において主に阻害的な役割を有し、T細胞活性化及び増殖を抑制する。悪性組織において、B7-H3は、腫瘍抗原特異的免疫応答を阻害する免疫チェックポイント分子である。B7-H3はまた、移動、浸潤、血管新生、化学療法抵抗性、上皮から間葉への移行を促進する、及び腫瘍細胞代謝に影響を与えるなどの非免疫性腫瘍促進機能を有する。固形腫瘍におけるその選択的発現及びその腫瘍促進機能のために、B7-H3は、エノブリツズマブ、オムブルタマブ、MGD009、MGC018、DS-7300a、及びCAR-T細胞を含むいくつかの抗がん剤の標的である。

【0065】

本明細書で使用される場合、「B7-H3標的指向ペプチド」又は「B7-H3標的指向タンパク質」という用語は、B7-H3に特異的に結合することができる任意のペプチド又はポリペプチド(タンパク質及び融合タンパク質を含む)を指すことを意味する。B7-H3標的指向ペプチドは、B7-H3を含む1つ以上の標的ポリペプチドに特異的に結合する抗体、抗体断片などであり得る。いくつかの態様では、ポリペプチドは、B7-H3標的指向ペプチドの軽鎖及び重鎖をコードする。一態様では、配列番号13の核酸配列は、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有するB7-H3標的指向ペプチドの軽鎖をコードすることができる。別の態様では、配列番号14の核酸配列は、配列番号8で示されるアミノ酸配列を有するB7-H3標的指向ペプチドの重鎖をコードすることができる。

【0066】

追加の実施形態では、本発明は、いずれかの向きで互いに、作動可能に連結されている、配列番号 6 及び 7 で示されるアミノ酸配列を含む、融合タンパク質を提供する。

【0067】

「融合分子」及び「融合タンパク質」という用語は、互換的に使用され、更なるエフェクター分子、通常は、組換え、化学的に、又は他の好適な方法によって共有結合（すなわち、融合）されたタンパク質又はペプチド配列の有無にかかわらず、生物学的に活性なポリペプチドを指すことを意味する。必要に応じて、融合分子は、ペプチドリンカー配列を介して 1 つ又は数箇所の部位において融合されることができる。あるいは、ペプチドリンカーを使用して、融合分子の構築を支援してもよい。具体的には、好ましい融合分子は、融合タンパク質である。一般に、融合分子はまた、共役分子を含み得る。

10

【0068】

互いに「作動可能に連結された」とは、融合タンパク質を構成するペプチド間に直接又は間接的な共有結合があることを意味する。したがって、作動可能に連結されている 2 つのドメインは、互いに直接共有結合し得る。逆に、2 つの作動可能に連結されたドメインは、介在部分（例えば、フランキング配列）への相互共有結合によって結合されてもよい。2 つのドメインは、例えば、それらが 1 つ以上の介在するフランキング配列の有無にかかわらず、第 3 のドメインによって隔てられている場合、作動可能に連結されているとみなされ得る。

【0069】

2 つの個々の要素を結合するための方法は、通常、リンカーの使用を必要とする。本明細書で 사용되는場合、「リンカー」という用語は、例えば、コンジュゲートの個々の部分を物理的に連結することによって、基質及び活性剤を同じ領域、組織、又は細胞を標的とすることを可能にする任意の結合、小分子、又は他のビヒクルを指す。リンカーは、化合物、通常は薬物を、安定した共有結合方式で細胞結合剤に結合することができる任意の化学部分であり得る。

20

【0070】

本明細書において提供される融合タンパク質は、例えば、いずれかの向きで互いに、作動可能に連結されている、配列番号 6 及び 7 で示されるアミノ酸配列を含むことができる。例えば、融合タンパク質は、融合タンパク質の C 末端に配列番号 6 で示されるアミノ酸配列、及び融合タンパク質の N 末端に配列番号 7 で示されるアミノ酸配列を含むことができ、又は融合タンパク質は、融合タンパク質の N 末端に配列番号 6 で示されるアミノ酸配列、及び融合タンパク質の C 末端に配列番号 7 で示されるアミノ酸配列を含むことができる。融合タンパク質内のアミノ酸配列の向きは、その標的に対する融合タンパク質（すなわち、B7-H3 標的指向融合タンパク質）の結合特異性を変更しない。

30

【0071】

B7-H3 標的指向ペプチドの軽鎖及び重鎖は、標的指向ペプチドの結合特異性又は感受性に影響を与えることなく、いずれかの向きで互いに、作動可能に連結することができる。一態様では、タンパク質は、配列番号 6 の C 末端と配列番号 7 の N 末端との間で直接連結した配列番号 6 及び 7 を含む。別の態様では、タンパク質は、配列番号 7 の C 末端と配列番号 6 の N 末端との間で直接連結した配列番号 7 及び 6 を含む。

40

【0072】

本明細書で提供される融合タンパク質は、融合タンパク質に 1 つ以上の標的ポリペプチドへの特異的結合を提供するための追加の標的指向ドメインなどの追加のタンパク質ドメインを含むことができる。例えば、融合タンパク質は、標的指向ドメインとして B7-H3 標的指向ペプチドを含む三重特異性キラーエンゲージャー（TriKE）分子であってもよい。

【0073】

NK 細胞は、免疫監視の能力がある先天性免疫系の細胞傷害性リンパ球である。細胞傷害性 T 細胞と同様、NK 細胞は、膜透過性及びアポトーシス誘導性の、貯蔵されたグランザイム及びパーフォリン顆粒を送達する。T 細胞と異なり、NK 細胞は、抗原プライミン

50

グを必要とせず、MHC認識の非存在下で活性化受容体と会合させることによって標的を認識する。NK細胞は、IgG抗体のFc部分に結合し、抗体依存性細胞媒介傷害(ADCC)に関与する活性化受容体であるCD16を発現する。NK細胞は、IL-15によって調節され、IL-15は、増加した抗原依存性細胞傷害性、リンホカイン活性化キラー活性、及び／又はインターフェロン(IFN)、腫瘍壊死因子(TNF)、及び／又は顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)応答を誘導することができる。これらのIL-15活性化機能の全ては、がん防御の改善に寄与する。

【0074】

治療上、NK細胞の養子移植は、例えば、NK細胞の生存及びインビボ拡大を刺激するために、リンバ枯渇化学療法及びIL-2と併用される場合、難治性急性骨髄性白血病(AML)を有する患者における寛解を誘導することができる。この療法は、抗原特異性の欠如、並びにNK細胞の増殖及び機能を抑制する制御性T(Treg)細胞のIL-2媒介性誘導によって制限され得る。Treg阻害の負の効果をバイパスしながら、NK細胞抗原特異性、増殖及び／又は持続性を駆動する試薬を生成することは、NK細胞ベースの免疫療法を増強することができる。

【0075】

三重特異性キラーエンゲージャー分子は、腫瘍細胞(例えば、CD33+腫瘍細胞及び／又はEpCAM+腫瘍細胞)のNK細胞媒介殺傷を駆動することができる2つのドメインを含む標的指向性の融合タンパク質であり、NK細胞自己維持シグナルを生成することができる分子内NK活性化ドメインは、NK細胞増殖を駆動する、及び／又は例えば、HL-60標的、がん細胞、又はがん細胞由来細胞株に対するNK細胞駆動細胞傷害性を増強することができる。

【0076】

NK細胞は、例えば、NK細胞の恒常性、増殖、生存、活性化、及び／又は発生に関与する、IL-15を含む様々なサイトカインに応答性がある。IL-15及びIL-2は、IL-2/IL-15Rβ(CD122)及び共通ガンマ鎖(CD132)を含む、いくつかのシグナル伝達成分を共有する。IL-2と異なり、IL-15は、Tregを刺激せず、NK細胞活性化を可能にする一方で、免疫応答のTreg阻害をバイパスする。NK細胞の恒常性及び増殖を促進する以外に、IL-15は、移植後の状況下で生じ得る、NK細胞の機能的欠陥を救済し得る。IL-15はまた、CD8+T細胞の機能を刺激し、その免疫療法能力を更に増強し得る。加えて、前臨床研究に基づいて、IL-15の毒性プロファイルは、低用量におけるIL-2よりも有利であり得る。IL-15は、NK細胞の発生恒常性、増殖、生存、及び活性化において役割を果たす。IL-15及びIL-2は、IL-2/IL-15Rβ(CD122)及び共通ガンマ鎖(CD132)を含むいくつかのシグナル伝達成分を共有する。IL-15はまた、NK細胞を活性化し、造血幹細胞移植(HSCT)後のNK細胞の生着における機能的欠陥を回復することができる。

【0077】

本明細書に提供される融合タンパク質は、1つ以上のNK細胞エンゲージードメイン(例えば、CD16、CD16+CD2、CD16+DNAM、CD16+NKp46)と、1つ以上の標的指向ドメイン(それは、例えば、腫瘍細胞、又はウイルス感染細胞を標的とし、本明細書に記載のB7-H3標的指向ペプチドなどである)と、1つ以上のサイトカインNK活性化ドメイン(例えば、IL-15、IL-12、IL-18、IL-21、又は他のNK細胞増強サイトカイン、ケモカイン、及び／又は活性化分子)とを含み、各ドメインが他のドメインに作動可能に連結された、TriKE分子であり得る。

【0078】

例えば、本明細書に記載の融合タンパク質は、配列番号2又は19で示されるアミノ酸配列を有するCD16ドメインなどの、CD16 NK細胞エンゲージードメインと、配列番号6及び7で示されるアミノ酸配列を有するB7-H3融合タンパク質などの、B7-H3標的指向融合タンパク質ドメインと、配列番号4、17又は18で示されるアミ

ノ酸配列を有する I L - 1 5 などの、I L - 1 5 サイトカイン N K 活性化ドメインとを含む、T r i K E 分子であり得る。

【0079】

T r i K E 分子の異なるタンパク質ドメインは、互いに、作動可能に連結し得る。例えば、リンカーを使用して、T r i K E 分子のタンパク質ドメインを互いに共有結合することができる。

【0080】

融合タンパク質の要素は、1つ以上のリンカーを使用して、互いに、作動可能に連結して組織化され得る。リンカーは、化合物又は抗体が活性を維持する条件下で、酸誘発性切断、光誘発性切断、ペプチダーゼ誘発性切断、エステラーゼ誘発性切断、及びジスルフィド結合切断に対して感受性であってもよく、又は実質的に耐性であってもよい。リンカーは、ジスルフィド基、ヒドラジン若しくはペプチド（切断可能）、又はチオエーテル基（切断不可能）を含む、当該技術分野で周知の化学モチーフに基づいて分類される。リンカーには、当該技術分野で周知の荷電リンカー、及びその親水性形態も含まれる。

【0081】

2つ以上のタンパク質又はタンパク質ドメインの融合に好適なリンカーには、天然リンカー、及び経験的リンカーが挙げられる。天然リンカーは、タンパク質ドメイン間に天然に存在する、マルチドメインタンパク質に由来する。天然リンカーは、異なる方法で融合タンパク質に影響を与えることができる、その長さ、疎水性、アミノ酸残基、及び二次構造などに応じたいくつかの特性を有することができる。

【0082】

天然マルチドメインタンパク質におけるリンカーの研究は、組換え融合タンパク質の構築のための様々な配列及びコンフォメーションを有する多くの経験的リンカーの作製をもたらした。経験的リンカーは、柔軟性リンカー、剛性リンカー、及び切断可能リンカーの3つのタイプに分類することができる。柔軟性リンカーは、結合されたドメインにある程度の動き又は相互作用を提供することができる。それらは、一般的に、小さい、非極性のアミノ酸（例えば、G l y）又は極性のアミノ酸（例えば、S e r 又は T h r）で構成され、これは、フレキシビリティを提供し、接続される機能性ドメインの可動性をもたらす。リジッドなリンカーは、それらの独立した機能を維持するために、ドメイン間の固定された距離をうまく維持することができ、これは、タンパク質ドメインを効率的に隔てること又はそれらの互いの干渉の十分な低減を提供することができる。切断可能リンカーは、インビボでの機能的ドメインの放出を可能にし得る。固有のインビボプロセスを利用することにより、切断可能リンカーは、還元試薬又はプロテアーゼの存在などの特定の条件下で切断することができる。このタイプのリンカーは、リンカー切断後、立体障害を低減する、生体活性を改善する、又は組換え融合タンパク質の個々のドメインの独立した作用／代謝を達成することができる。

【0083】

リンカーの非限定的な例としては、配列番号3、5、10、12、15、及び16で示されるアミノ酸配列を有するリンカーが挙げられる。

【0084】

一態様では、配列番号2又は19と、配列番号4、17又は18とが、配列番号3又は配列番号15によって連結される。別の態様では、配列番号4、17又は18と、配列番号6又は7とは、配列番号5又は配列番号16によって連結される。他の態様では、配列番号6及び7が、いずれかの向きで作動可能に連結している。

【0085】

更なる実施形態では、本発明は、配列番号1で示される配列、及び配列番号1に対して90%以上の同一性を有する配列を含む、融合タンパク質を提供する。

【0086】

一実施形態では、本発明は、作動可能に連結して、配列番号2又は19；配列番号4、17又は18；配列番号6及び7、又は7及び6を含む、融合タンパク質を提供する。

【0087】

本明細書に記載される融合タンパク質は、野生型 (w t) I L - 1 5 又は変異型 I L - 1 5 サイトカイン N K 活性化ドメインを含み得る。変異型 I L - 1 5 は、例えば、N 7 2 アミノ酸の置換を含む変異型 I L - 1 5 を含み得る。N 7 2 置換の非限定的な例としては、N 7 2 A 及び N 7 2 D 変異が挙げられる。

【0088】

いくつかの態様では、配列番号 4 は、N 7 2 置換を有する。様々な態様では、N 7 2 変異は、N 7 2 A 又は N 7 2 D であり、タンパク質は、それぞれ配列番号 1 7 又は 1 8 で示されている。

【0089】

更に別の実施形態では、本発明は、配列番号 1 9 と、配列番号 1 7 又は 1 8 と、いずれかの向きでの配列番号 6 及び 7 と含む、融合タンパク質を提供する。

【0090】

一態様では、配列番号 1 9 は、配列番号 3 又は 1 5 のリンカーによって、配列番号 1 7 又は 1 8 に作動可能に連結される。別の態様では、配列番号 1 7 又は 1 8 は、配列番号 5 又は 1 6 のリンカーによって、いずれかの向きでの配列番号 6 及び 7 に作動可能に連結される。

【0091】

融合タンパク質は、作動可能な連結で、ラクダ科又はヒトの C D 1 6 N K 細胞エンゲージードメイン (それぞれ配列番号 2 又は 1 9) と、w t 又は変異型 I L - 1 5 サイトカイン N K 活性化ドメイン (配列番号 4、1 7 又は 1 8) と、B 7 - H 3 標的指向ペプチドの軽鎖及び重鎖 (それぞれ配列番号 6 及び 7) とを含むことができる。C D 1 6 N K 細胞エンゲージードメインは、配列番号 3 又は 1 5 で示されるアミノ酸配列を有するリンカーによって、I L - 1 5 サイトカイン N K 活性化ドメインに連結することができる。I L - 1 5 サイトカイン N K 活性化ドメインは、配列番号 5 又は 1 6 で示されるアミノ酸配列を有するリンカーによって、B 7 - H 3 標的指向ペプチドに連結することができる。I L - 1 5 サイトカイン N K 活性化ドメインは、B 7 - H 3 標的指向ペプチドの重鎖 (軽鎖に連結されている)、又は B 7 - H 3 標的指向ペプチドの軽鎖 (重鎖に連結されている) に連結することができる。

【0092】

例えば、融合タンパク質は、作動可能に連結して、N 末端から C 末端へ、
配列番号 2、4、6、及び 7、
配列番号 2、4、7、及び 6、
配列番号 1 9、1 7、6、及び 7、
配列番号 1 9、1 7、7、及び 6、
配列番号 1 9、1 8、6、及び 7、又は
配列番号 1 9、1 8、7、及び 6
を含むことができる。

【0093】

具体的には、融合タンパク質は、作動可能に連結して、N 末端から C 末端へ、
配列番号 2、3、4、5、6、及び 7、
配列番号 2、3、4、1 6、6、及び 7、
配列番号 2、1 5、4、5、6、及び 7、
配列番号 2、1 5、4、1 6、6、及び 7、
配列番号 2、3、4、5、7、及び 6、
配列番号 2、3、4、1 6、7、及び 6、
配列番号 2、1 5、4、5、7、及び 6、又は
配列番号 2、1 5、4、1 6、7、及び 6
を含むことができる。

【0094】

他の態様では、融合タンパク質は、作動可能に連結して、N末端からC末端へ、
配列番号19、3、17、5、6、及び7、
配列番号19、3、17、16、6、及び7、
配列番号19、15、17、5、6、及び7、
配列番号19、15、17、16、6、及び7、
配列番号19、3、17、5、7、及び6、
配列番号19、3、17、16、7、及び6、
配列番号19、15、17、5、7、及び6、
配列番号19、15、17、16、7、及び6、
配列番号19、3、18、5、6、及び7、
配列番号19、3、18、16、6、及び7、
配列番号19、15、18、5、6、及び7、
配列番号19、15、18、16、6、及び7、
配列番号19、3、18、5、7、及び6、
配列番号19、3、18、16、7、及び6、
配列番号19、15、18、5、7、及び6、又は
配列番号19、15、18、16、7、及び6

を含むことができる。

【0095】

いくつかの態様では、融合タンパク質は、半減期延長（HLE）分子を更に含む。

【0096】

IgG免疫グロブリンなどの標的指向タンパク質の循環半減期は、新生児型Fc受容体（FcRn）に対するFc領域の親和性によって調節され得る。エフェクター機能の第2の一般的カテゴリは、免疫グロブリンが抗原に結合した後に機能するものを含む。IgGの場合、これらの機能は、補体カスケード又はFcガンマ受容体（FcγR）を有する細胞の関与を伴う。FcγRへのFc領域の結合は、特定の免疫効果、例えば、免疫複合体のエンドサイトーシス、免疫グロブリンで被覆された粒子又は微生物の貪食及び破壊（抗体依存性食作用、又はADCPとも呼ばれる）、免疫複合体のクリアランス、免疫グロブリンで被覆された標的細胞のキラー細胞による溶解（抗体依存性細胞媒介細胞傷害性、又はADCCと呼ばれる）、炎症性メディエーターの放出、免疫系細胞活性化の調節、及び免疫グロブリン産生の調節を引き起こす。特定の組換えられた結合ポリペプチド（例えば、抗体バリエーション（例えば、scFv）又は抗体断片（例えば、Fab断片））は、それらのより小さい分子サイズ及び／又は一価性から利益を得る一方で、機能的Fc領域の非存在に起因するいくつかの不利益を被る。例えば、Fab断片は、FcRn結合に必要なFc領域を欠き、その小さいサイズのために腎臓によって血液から迅速に濾過されるため、インビボでは短い半減期を有する。

【0097】

本明細書に記載される融合タンパク質などの操作された標的指向ポリペプチドは、天然結合ポリペプチドと比較される場合、FcRnへの減少した結合を呈し、したがって、インビボでの減少した半減期を有し得る。FcRnに対して改善された親和性を有するFcバリエーションは、より長い血清半減期を有することができ、そうした分子は、例えば、慢性疾患又は障害を処置するために、投与されたポリペプチドの長い半減期が望まれる哺乳動物を処置する方法において有用な用途を有する。対照的に、減少したFcRn結合親和性を有するFcバリエーションは、より短い半減期を有し、そうした分子はまた例えば、循環時間の短縮が有利であり得る哺乳動物への投与、例えば、インビボ診断イメージング、又は出発ポリペプチドが長期間循環中に存在すると毒性副作用を有する状況において有益でもある。

【0098】

本明細書に記載される融合タンパク質は、対象への投与時にインビボでその半減期を延長するための半減期延長（HLE）分子を含むことができる。

10

20

30

40

50

【0099】

本明細書で使用される場合、「半減期」という用語は、インビボでの特定の標的指向ポリペプチドの生物学的半減期を指す。半減期は、対象に投与された量の半量が動物における循環及び／又は他の組織から除去されるのに要する時間によって表すことができる。標的指向ポリペプチドのクリアランス曲線が時間の関数として構築される場合、曲線は通常、急速な α 相、及び、より長い β 相を有する二相性である。 α 相は、典型的には、投与された標的指向ポリペプチドの、血管内空間と血管外空間との間での平衡化を表し、部分的には、ポリペプチドのサイズによって決定される。 β 相は、典型的には、血管内空間における標的指向ポリペプチドの異化を表す。したがって、本明細書で使用される半減期という用語は、好ましくは、 β 相における標的指向ポリペプチドの半減期を指す。ヒトにおけるヒト抗体の典型的な β 相半減期は21日である。

10

【0100】

半減期の増加は、一般に、免疫グロブリン、特に抗体、及び最も特に小さいサイズの抗体断片のインビボ用途において有用である。そうした効果を達成するための当該技術分野に記載のアプローチは、小さな二重特異性抗体構築物をより大きなタンパク質に融合することを含み、これは好ましくはタンパク質構築物の治療効果を妨げない。二重特異性T細胞エンゲージャーのそうした更なる開発の例は、標的細胞表面抗原に結合する第1のドメインと、ヒト及び／又はマカクCD3 ϵ 鎖の細胞外エピトープに結合する第2のドメインと、特定のFcモダリティ（HLE分子）である第3のドメインとを含む、二重特異性T細胞エンゲージメント分子の半減期延長フォーマット（HLEフォーマット）を提供する、US2017/0218078A1に記載されている。

20

【0101】

本明細書中で使用される場合、「半減期延長分子」、「HLE配列」などの用語は、インビボでその半減期を増加又は延長するために目的のポリペプチドに連結又は融合され得るタンパク質又はポリペプチドなどの任意の分子を指すことを意味する。具体的には、HLE配列は、概して、免疫グロブリンのFc領域又はscFc領域を含む。

【0102】

本明細書で使用される場合、「Fc領域」という用語は、その2つの重鎖の、それぞれのFcドメイン（又はFc部分）により形成される、天然免疫グロブリンの部分の部分を指す。天然Fc領域は、ホモ二量体である。対照的に、本明細書で使用される「遺伝学的に融合されたFc領域」又は「一本鎖Fc領域」（scFc領域）という用語は、ポリペプチド一本鎖内で遺伝学的に連結された（すなわち、単一の連続した遺伝子配列にコードされた）Fcドメイン（又はFc部分）からなる合成Fc領域を指す。したがって、遺伝学的に融合されたFc領域（すなわち、scFc領域）は、単量体である。

30

【0103】

本明細書において使用される場合、「Fcドメイン」という用語は、パライン切断部位のすぐ上流側のヒンジ領域（すなわち、重鎖定常領域の第1の残基を114とすると、IgG内の残基216）において始まり、抗体のC末端で終了する単一の免疫グロブリン重鎖の部分の部分を指す。したがって、完全なFcドメインは、少なくともヒンジドメイン、CH2ドメイン、及びCH3ドメインを含む。

40

【0104】

本明細書に記載のscFc領域は、上述のFc部分の間に介在するリンカーポリペプチド（例えば、Fc接続ペプチド）を介して遺伝学的に融合された少なくとも2つのFcドメインを含む。scFc領域は、2つの同一のFc部分を含むことができるか、又は2つの非同一のFc部分を含むことができる。

【0105】

本明細書に記載の融合タンパク質のいずれかに組み込むことができるHLE分子の調製に使用することができるFcドメインの非限定的な例（単独で、又はリンカーポリペプチドを介して別のFcドメインと組み合わせる）としては、配列番号26～33のうちのいずれか1つを含むアミノ酸を有するポリペプチドのいずれかが挙げられる。

50

【0106】

HLE分子の調製に使用することができる、scFc領域の調製に使用することができるリンカーポリペプチドの非限定的な例としては、配列番号34～35のうちのいずれか1つを含むアミノ酸を有するポリペプチドのいずれかが挙げられる。

【0107】

本明細書に記載のHLE分子は、配列番号26～33のうちのいずれか1つを含むアミノ酸を有するFcドメイン、又は配列番号34～35のうちのいずれか1つを含むアミノ酸を有するリンカーを介して配列番号26～33のうちのいずれか1つを含むアミノ酸を有する第2のFcドメインに融合された配列番号26～33のうちのいずれか1つを含むアミノ酸を有する第1のFcドメインを含むscFc領域を含むことができる。例えば、HLE分子は、配列番号21～25のうちのいずれか1つを含み得る。

10

【0108】

追加の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される融合タンパク質のいずれかをコードする単離された核酸配列を提供する。

【0109】

本明細書に記載の融合タンパク質、例えば、配列番号2で示されるアミノ酸配列を有するCD16ドメインなどの、CD16 NK細胞エンゲージードメインと、配列番号6及び7で示されるアミノ酸配列を有するB7-H3融合タンパク質などの、B7-H3標的指向融合タンパク質ドメインと、配列番号4で示されるアミノ酸配列を有するIL-15などの、IL-15サイトカインNK活性化ドメインとを、作動可能な連結状態で含み、かつ配列番号1で示されるようなTriKE融合タンパク質を、核酸配列によってコードすることができる。一態様では、配列は、配列番号8、又はそれに対して90%以上の配列同一性を有する配列である。

20

【0110】

別の実施形態では、本発明は、対象に、本明細書に記載の融合タンパク質のいずれかを投与し、それによってがんを処置することを含む、対象におけるがんを処置する方法を提供する。

【0111】

本明細書で使用される「対象」という用語は、本発明の方法が実施される任意の個体又は患者を指す。一般に、対象はヒトであるが、当業者には理解される通り、対象は動物であってもよい。したがって、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、及びモルモットを含む）、ネコ、イヌ、ウサギ、牛、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ニワトリなどの家畜、及び霊長類（サル、チンパンジー、オランウータン、及びゴリラを含む）を含む他の動物が、対象の定義内に含まれる。

30

【0112】

「処置」という用語は、本明細書では「治療法」という用語と互換的に使用され、1) 診断された病理学的状態又は障害の、治療、減速、症状の軽減、及び／又は進行を停止する、治療処置又は治療手段、並びに2) 並びに予防／防止措置の両方を指す。処置を必要とする者には、既に特定の医的障害を有している個体、並びに最終的にその障害に達する可能性がある者（すなわち、防止措置を必要とする者）が含まれ得る。

40

【0113】

「治療上有効な量の」、「有効用量」、「治療上有効な用量の」、「有効量」などの用語は、研究者、獣医師、医師又は他の臨床医によって求められている、組織、系、動物又はヒトの生物学的若しくは医学的応答を誘発する当該化合物の量を指す。一般に、応答は、患者における症状の改善又は所望の生物学的転帰のいずれかである。そうした量は、がんを処置するのに十分であるべきである。有効量は、本明細書に記載されるように決定することができる。

【0114】

「～の投与」及び又は「投与する」という用語は、処置を必要とする対象に治療上有効な量の医薬組成物を提供することを意味すると理解されるべきである。投与経路は、経腸

50

、局所、又は非経口とすることができる。そのため、投与経路としては、皮内、皮下、静脈内、腹腔内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、経皮、経気管、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内及び胸骨内、経口、舌下頬、直腸、膣、鼻の眼内投与、並びに注入、吸入、及び噴霧が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される場合、「非経口投与」及び「非経口で投与される」という語句は、経腸及び局所投与以外の投与様式を意味する。

【0115】

本明細書に記載の融合タンパク質は、融合タンパク質と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物に製剤化することができる。「薬学的に許容される」とは、担体、希釈剤又は賦形剤が、製剤の他の成分と適合性であり、かつそのレシピエントに有害でないことを意味する。担体の例には、リポソーム、ナノ粒子、軟膏、ミセル、小球体、微粒子、クリーム、エマルション、及びゲルが含まれるが、これらに限定されない。賦形剤の例は、これらに限定されないが、ステアリン酸マグネシウムなどの抗接着剤、糖及びそれらの誘導体（スクロース、ラクトース、デンプン、セルロース、糖アルコールなど）タンパク質などの結合剤、ゼラチン及び合成ポリマー、タルク及びシリカなどの潤滑剤、並びに酸化防止剤、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンC、パルミチン酸レチニル、セレン、システイン、メチオニン、クエン酸、硫酸ナトリウム、及びパラベンなどの防腐剤を含む。希釈剤の例には、水、アルコール、食塩水溶液、グリコール、鉱物油、及びジメチルスルホキシド（DMSO）が含まれるが、これらに限定されない。

【0116】

医薬組成物は、投与方法に応じて、様々な単位剤形で投与することができる。好適な単位剤形としては、これらに限定されないが、粉剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、ロゼンジ剤、坐剤、パッチ、鼻内噴霧剤、注射可能物質、移植可能な持続放出製剤、脂質複合体などが挙げられる。

【0117】

本明細書に記載の方法は、がんの処置を対象とする。「がん」という用語は、がん（悪性腫瘍）を良性腫瘍から区別する、他の部位（二次部位、転移）に浸潤及び転移する可能性のある、1つの部位（原発部位）から始まる異常かつ無制御な細胞増殖を特徴とする疾患群を指す。事実上全ての臓器が影響を受ける可能性があり、ヒトに影響を与える可能性のある100種類超のがんにつながり得る。がんは、遺伝的素因、ウイルス感染、電離放射線への曝露、環境汚染物質への曝露、タバコ及び／又はアルコールの使用、肥満、劣った食生活、身体活動の欠如、又はそれらの任意の組み合わせを含む多くの原因に起因し得る。本明細書で使用される場合、「腫瘍」又は「腫瘍」は、その文法的変形を含む、良性又はがん性であり得る組織の新規及び異常な増殖を意味する。関連する態様では、腫瘍は、限定されないが、様々ながんを含む腫瘍性疾患又は障害を示す。例えば、そのようながんには、前立腺がん、膵臓がん、胆道がん、結腸がん、直腸がん、肝臓がん、腎臓がん、肺がん、精巣がん、乳がん、卵巣がん、脳がん、頭頸部がん、黒色腫、肉腫、多発性骨髄腫、白血病、リンパ腫などが含まれ得る。

【0118】

国立がん研究所によって記載される例示的ながんには、急性リンパ芽球性白血病、成人；急性リンパ芽球性白血病、小児；成人の急性骨髄性白血病、成人；副腎皮質癌；副腎皮質癌、小児；AIDS関連のリンパ腫；AIDS関連の悪性腫瘍；肛門がん；星状細胞腫、小児小脳；星状細胞腫、小児大脳；胆管がん、肝外；膀胱がん；膀胱がん、小児；骨がん、骨肉腫／悪性繊維性組織球腫；脳幹膠腫、小児；脳腫瘍、成人；脳腫瘍、脳幹膠腫、小児；脳腫瘍、小脳星状細胞腫、小児；脳腫瘍、大脳星状細胞腫／悪性神経膠腫、小児；脳腫瘍、上衣腫、小児；脳腫瘍、髄芽細胞腫、小児；脳腫瘍、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、小児；脳腫瘍、視経路及び視床下部膠腫、小児；脳腫瘍、小児（他）；乳がん；乳がん及び妊娠；乳がん、小児；乳がん、男性；気管支腺腫／カルチノイド、小児；カルチノイド腫瘍、小児；カルチノイド腫瘍、胃腸；癌腫、副腎皮質；癌腫、膵島細胞；原発不明癌腫；中枢神経系リンパ腫、原発性；小脳星状細胞腫、小児；大脳星状細胞腫／悪性神

10

20

30

40

50

経膠腫、小児；子宮頸管がん；小児がん；慢性リンパ性白血病；慢性骨髄性白血病；慢性骨髄増殖性障害；腱鞘の明細胞肉腫；大腸がん；大腸がん、小児；皮膚T細胞性リンパ腫；子宮体がん；上衣腫、小児；上皮がん、卵巣；食道がん；食道がん、小児；ユーイング腫瘍；頭蓋外胚細胞腫瘍、小児；性腺外胚細胞腫瘍；肝外胆管がん；眼がん、眼内黒色腫；眼がん、網膜胚種細胞腫；胆嚢がん；胃（G a s t r i c）（胃（S t o m a c h））がん；胃がん、小児；胃腸カルチノイド腫瘍；胚細胞腫瘍、頭蓋外、小児；胚細胞腫瘍、性腺外；胚細胞腫瘍、卵巣；妊娠性絨毛腫瘍；膠腫、小児脳幹；膠腫、小児視経路及び視床下部；毛様細胞白血病；頭頸部がん；肝細胞（肝臓）がん、成人（原発性）；肝細胞（肝臓）がん、小児（原発性）；ホジキンリンパ腫、成人；ホジキンリンパ腫、小児；ホジキンリンパ腫、妊娠期間；下咽頭がん；視床下部及び視経路膠腫、小児；眼内黒色腫；脾島細胞癌腫（内分泌脾臓）；カボジ肉腫；腎臓がん；喉頭がん；喉頭がん、小児；白血病、急性リンパ芽球性、成人；白血病、急性リンパ芽球性、小児；白血病、急性骨髄性、成人；白血病、急性骨髄性、小児；白血病、慢性リンパ性；白血病、慢性骨髄性；白血病、毛様細胞；口唇及び口腔がん；肝臓がん、成人（原発性）；肝臓がん、小児（原発性）；肺がん、非小細胞；肺がん、小細胞；リンパ芽球性白血病、成人、急性；リンパ芽球性白血病、小児、急性；リンパ性白血病、慢性；リンパ腫、A I D S 関連；リンパ腫、中枢神経系（原発性）；リンパ腫、皮膚T細胞；リンパ腫、ホジキン、成人；リンパ腫、ホジキン、小児；リンパ腫、ホジキン、妊娠期間；リンパ腫、非ホジキン、成人；リンパ腫、非ホジキン、小児；リンパ腫、非ホジキン、妊娠期間；リンパ腫、原発性中枢神経系；マクログロブリン血症、ヴァルデンストレーム；男性の乳がん；悪性中皮腫、成人；悪性中皮腫、小児；悪性胸腺腫；髄芽細胞腫、小児；黒色腫；黒色腫、眼内；メルケル細胞癌腫；悪性中皮腫；原発不明の転移性頸部扁平上皮がん；多発性内分泌腫瘍症候群、小児；多発性骨髄腫／原形質細胞新生物；菌状息肉腫；骨髄異形成症候群；骨髄性白血病、慢性；骨髄性白血病、小児急性；骨髄腫、多発性；骨髄増殖性障害、慢性；鼻腔及び副鼻腔がん；鼻咽頭がん；鼻咽頭がん、小児；神経芽細胞腫；非ホジキンリンパ腫、成人；非ホジキンリンパ腫、小児；非ホジキンのリンパ腫、妊娠期間；非小細胞肺がん；口頭がん、小児；口腔及び口唇がん；口咽頭がん；骨肉腫／骨の悪性繊維性組織球腫；卵巣がん、小児；卵巣上皮がん；卵巣胚細胞腫瘍；卵巣低悪性度腫瘍；脾臓がん；脾臓がん、小児；脾臓がん、脾島細胞；副鼻腔及び鼻腔がん；副甲状腺がん；陰茎がん；褐色細胞腫；松果体及びテント上原始神経外胚葉性腫瘍、小児；脳下垂体腫瘍；原形質細胞新生物／多発性骨髄腫；胸膜肺芽腫；妊娠及び乳がん；妊娠及びホジキンリンパ腫；妊娠及び非ホジキンリンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；原発性肝臓がん、成人；原発性肝臓がん、小児；前立腺がん；直腸がん；腎細胞（腎臓）がん；腎細胞がん、小児；じん盤及び尿管、移行細胞がん；網膜胚種細胞腫；横紋筋肉腫、小児；唾液腺がん；唾液腺がん、小児；肉腫、ユーイング腫瘍；肉腫、カボジ；肉腫（骨肉腫）／骨の悪性繊維性組織球腫；肉腫、横紋筋肉腫、小児；肉腫、軟部組織、成人；肉腫、軟部組織、小児；セザリー症候群；皮膚がん；皮膚がん、小児；表皮層がん（黒色腫）；皮膚癌腫、メルケル細胞；小細胞肺がん；小腸がん；軟部組織肉腫、成人；軟部組織肉腫、小児；原発不明の頸部扁平上皮がん、転移性；胃（S t o m a c h）（胃（G a s t r i c））がん；胃がん、小児；テント上原始神経外胚葉性腫瘍、小児；皮膚のT細胞リンパ腫；辜丸がん；胸腺腫、小児；悪性胸腺腫；甲状腺がん；甲状腺がん、小児；じん盤及び尿管の移行細胞がん；絨毛腫瘍、妊娠性；原発部位不明のがん、小児；小児の異常がん；尿管及びじん盤、移行細胞がん；尿道がん；子宮肉腫；膣がん；視経路及び視床下部膠腫、小児；外陰がん；ヴァルデンストレームマクログロブリン血症；並びにウィルムス腫瘍が含まれる。

10

20

30

40

50

【0119】

一態様では、がんは、非小細胞性肺がん、皮膚扁平上皮細胞癌、脾臓がん、原発性肝細胞癌、結腸直腸癌、淡明細胞型腎細胞癌、又は乳がんから選択される。

【0120】

いくつかの態様では、本明細書に記載の融合タンパク質の投与は、1つ以上の追加の治療剤と併用され得る。「併用療法」、「併用して」などの語句は、応答を増加させるため

に1つ以上の治療薬又は処置を同時に使用することを指す。本発明の融合タンパク質及びその医薬組成物は、例えば、がんを処置するために使用されている他の薬物又は処置と併用して使用され得る。具体的には、対象への融合タンパク質の投与は、化学療法剤、手術、放射線療法、又はそれらの組み合わせと併用して行うことができる。そうした療法は、本発明の組成物の投与前に、投与と同時に、又は投与後に施すことができる。

【0121】

本明細書で使用される場合、「化学療法剤」という用語は、がんを処置するために使用される任意の治療薬を指す。化学療法剤の例としては、限定されないが、アクチノマイシン、アザシチジン、アザチオプリン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウ
10
ノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イマチニブ、イリノテカン、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、トポテカン、バルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシ
20
ン、ビノレルビン、パニツママブ、エルビタックス（セツキシマブ）、マツズマブ、IMC-IIF8、TheraCIM hR3、デノスマブ、アバスチン（ベバシズマブ）、ヒュミラ（アダリムマブ）、ヘルセプチン（トラスツズマブ）、レミケード（インフリキシマブ）、リツキシマブ、シナジス（パリビズマブ）、ミロターグ（ゲムツズマブオキソ
30
ガマイシン）、サルクリサ（イサツキシマブ）、ラプチバ（エファリズマブ）、タイサブリ（ナタリズマブ）、ゼナパックス（ダクリキシマブ）、NeutroSpec（テクネチウム（99mTc）ファンオレソマブ）、トシリズマブ、ProstaScint（インジウム-111標識カプロマブペンデチド）、ベキサール（トシツモマブ）、ゼバリン（イットリウム90にコンジュゲートされたイブリツモマブチウセタン（IDEC-Y2B8）、ゾレア（オマリズマブ）、マブセラ（リツキシマブ）、レオプロ（ブシキシマブ）、マブキャンパス（アレムツズマブ）、シムレクト（バシリキシマブ）、ロイコスキャン（スレソマブ）、CEASキャン（アルシツモマブ）、Verluma（ノフェツモマブ）、パノレックス（エドレコロマブ）、アレムツズマブ、CDP870、ナタリズマブ、ジオトリフ（アフアチニブ）、リンパルザ（オラパリブ）、ペルジェタ（ペルツズマブ）、オトディボ（ニボルマブ）、ボスリフ（ボスチニブ）、カボメティクス（カボザンチニ
40
ブ）、Ogivri（トラスツズマブ-dkst）、スーテント（リンゴ酸スニチニブ）、アドセトリス（ブレンツキシマブベドチン）、アレセンサ（アレクチニブ）、カルケンス（アカラブルチニブ）、イエスカルタ（シロロイセル）、ページニオ（アベマシクリブ）、キイトルーダ（ペムプロリズマブ）、アリコパ（コパンリシブ）、Nerlynx（ネラチニブ）、イミフィンジ（デュルバルマブ）、ダルザレックス（ダラツムマブ）、テセントリク（アテゾリズマブ）、及びタルセバ（エルロチニブ）が挙げられる。免疫療法剤の例には、インターロイキン（IL-2、IL-7、IL-12）、サイトカイン（インターフェロン、G-CSF、イミキモド）、ケモカイン（CCL3、CCL26、CXCL7）、免疫調節性イミド薬物（サリドマイド及びその類似体）が含まれるが、これらに限定されない。

【0122】

一実施形態では、本発明は、配列番号1のアミノ酸配列、又は配列番号1に対して90%以上の同一性を有する配列を含む、治療上有効な量の融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物を提供する。

【0123】

別の実施形態では、本発明は、対象に、本明細書に記載される医薬組成物を投与することを含む、対象におけるがんを処置する方法を提供する。

【0124】

NK細胞又は大顆粒リンパ球（LGL）としても知られるナチュラルキラー細胞は、先天性免疫系に重要な細胞傷害性リンパ球の一種であり、周知の自然リンパ球（ILC）の

10

20

30

40

50

うちの急速に拡大するファミリーに属し、ヒトの全ての循環リンパ球の5～20%を占める。NK細胞の役割は、脊椎動物の適応免疫応答における細胞傷害性T細胞の役割に類似する。NK細胞は、ウイルスに感染した細胞、及び感染後約3日で作用する他の細胞内病原体に対して迅速な応答を提供し、腫瘍形成に応答する。典型的には、免疫細胞は、感染した細胞表面上に存在する主要組織適合性複合体(MHC)を検出し、これがサイトカイン放出をトリガーし、溶解又はアポトーシスによって感染した細胞の死を引き起こす。しかしながら、NK細胞は、抗体及びMHCが存在しない状態でも、ストレスを受けた細胞を認識及び殺傷する能力を有するため、固有であり、はるかに速い免疫反応を可能にする。それらは、MHCクラス1の「自己」マーカーが欠損している細胞を死滅させる活性化を必要としないという考えから、「ナチュラルキラー」と名付けられた。MHC Iマーカーが欠損している有害な細胞は、Tリンパ球細胞などの他の免疫細胞によって検出及び破壊されないため、この役割は特に重要である。

10

【0125】

ナチュラルキラー細胞が先天性免疫のエフェクターであることに加えて、活性化NK細胞受容体及び阻害NK細胞受容体の両方が、自己耐容性及びNK細胞活性の維持を含む重要な機能的役割を果たす。NK細胞は、適応免疫応答においても役割を果たし、多くの実験は、同じ抗原との二次感染に応答するのに不可欠な、NK細胞が直接的な環境にすぐに適応し抗原特異的免疫記憶を作る能力を示した。先天性免疫応答及び適応免疫応答におけるNK細胞の役割は、潜在的ながん療法としてNK細胞活性を使用する研究において、ますます重要になりつつある。

20

【0126】

追加の実施形態では、本発明は、対象におけるがん細胞に対するナチュラルキラー(NK)細胞活性を誘導する方法であって、対象に、配列番号1で示される配列、及び配列番号1に対して90%以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与し、それによって対象におけるがん細胞に対するNK細胞活性を誘導する方法を提供する。

【0127】

一態様では、NK細胞活性を誘導することは、NK細胞脱顆粒を誘導すること、インターフェロン γ のNK細胞産生を誘導すること、対象における腫瘍浸潤NK細胞の数を増加させること、及び／又はNK細胞増殖を誘導する若しくは増加させることを含む。

【0128】

ナチュラルキラー細胞又は大顆粒リンパ球(LGL)は、先天性免疫系に重要な細胞傷害性リンパ球の一種であり、周知の自然リンパ球(ILC)のうちの急速に拡大するファミリーに属し、ヒトの全ての循環リンパ球の5～20%を占める。それらは、細胞溶解性顆粒媒介性細胞アポトーシス、抗体依存性細胞介在細胞傷害(ADCC)、並びにサイトカイン誘導性NK及び細胞傷害性Tリンパ球(CTL)活性化を含む、様々な機能を有する。

30

【0129】

NK細胞は細胞傷害性であり、その細胞質中の小さな顆粒は、パーフォリン、及びグランザイムとして知られるプロテアーゼなどの、タンパク質を含有する。殺傷予定の細胞に近接して放出されると、パーフォリンは標的細胞の細胞膜に細孔を形成し、グランザイム及び関連する分子が入ることができる水性チャネルを作り出し、アポトーシス、又は浸透圧による細胞溶解のいずれかを誘導する。アポトーシスと細胞溶解との区別は、免疫学において重要であり、ウイルスに感染した細胞を溶解することは潜在的にビリオンを放出する可能性があるが、アポトーシスは内部のウイルスの破壊をもたらす。 α -防御素、抗菌分子もまた、NK細胞によって分泌され、好中球に類似した方法でそれらの細胞壁を破壊することによって細菌を直接殺傷する。

40

【0130】

感染した細胞は、免疫細胞による検出のために抗体で通常オプソニン化される。抗原に結合する抗体は、NK細胞上で発現されるFc γ RIII(CD16)受容体によって認識され得、NK活性化、溶解性顆粒の放出、そして結果として標的細胞のアポトーシスを

50

もたらず。これは、リツキシマブ（R i t u x a n）、オファツムマブ（A z z e r a）及び他のものなどの、一部のモノクローナル抗体の主要な殺傷機構である。

【0131】

サイトカインは、NK細胞活性化に重要な役割を果たす。これらは、ウイルス感染時に細胞によって放出されるストレス分子であるため、罹患領域におけるウイルス病原体の存在をNK細胞にシグナル伝達する役割を果たす。NK活性化に關与するサイトカインとしては、IL-12、IL-15、IL-18、IL-2、及びCCL5が挙げられる。NK細胞は、インターフェロン又はマクロファージ由来サイトカインに応答して活性化される。それらは、感染を取り除くことができる抗原特異的細胞傷害性T細胞を適応免疫応答が生み出している間、ウイルス感染を封じ込める働きをする。NK細胞は、IFN γ 及びTNF α を分泌することによってウイルス感染を制御するように機能する。IFN γ は、食作用及び溶解のためにマクロファージを活性化し、TNF α は、直接のNK腫瘍細胞殺傷を促進するように作用する。NK細胞が欠損している患者は、ヘルペスウイルス感染の初期段階に対して非常に感受性であることが証明されている。

10

【0132】

腫瘍浸潤NK細胞は、ヒトトリプルネガティブ乳がんにおける薬物誘発性細胞死を促進する上で重要な役割を果たすことが報告されている。NK細胞は、非自己HLA抗原（自己ではない）を発現するときに標的細胞を認識するため、自己（患者自身の）NK細胞注入は、抗腫瘍効果を示さなかった。代わりに、研究者は、末梢血からの同種異系細胞を使用することに取り組んでおり、これは、致命的であり得る移植片対宿主病のリスクを除去するために、患者に注入する前に全てのT細胞を除去することを必要とする。これは、免疫磁気カラム（C l i n i M A C S）を使用して達成され得る。また、血液中のNK細胞の数が限られているため（リンパ球の10%のみがNK細胞である）、その数を培養中で拡大する必要がある。これには数週間かかる場合があり、収率はドナーに依存する。

20

【0133】

一実施形態では、本発明は、対象における腫瘍増殖を阻害する方法であって、対象に、配列番号1で示される配列、及び配列番号1に対して90%以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与し、それによって対象における腫瘍増殖を阻害する、方法を提供する。

【0134】

一態様では、腫瘍増殖を阻害することは、腫瘍細胞生存を減少させることを含む。

30

【0135】

別の実施形態では、本発明は、がんを有する対象の生存を増加させる方法であって、対象に、配列番号1で示される配列、及び配列番号1に対して90%以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与し、それによって対象の生存を増加させる、方法を提供する。

【0136】

生存を増加させるということは、対象が本発明の融合タンパク質を投与された場合に、投与しない場合での生存と比較して、又は本発明の融合タンパク質を含まない別の処置レジメンの投与と比較して、対象の生存が増加することを意味する。

40

【0137】

追加の実施形態では、本発明は、対象におけるがん細胞に対するナチュラルキラー（NK）媒介抗体依存性細胞傷害を誘導する方法であって、対象に、配列番号1で示される配列、及び配列番号1に対して90%以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与し、それによって対象の生存を増加させることを含む、方法を提供する。

【0138】

一態様では、対象に、配列番号1で示される配列、及び配列番号1に対して90%以上の同一性を有する配列を含む融合タンパク質を投与することは、対象に抗がん処置を施すことを更に含む。

【0139】

50

別の態様では、対象はがんを有している。いくつかの態様では、がんは、肺がん、前立腺がん、多発性骨髄腫、卵巣がん、及び頭頸部がんからなる群から選択される。他の態様では、がん細胞は、B7-H3発現がん細胞である。いくつかの態様では、がんは、処置耐性がんである。

【0140】

以下に、説明された用途のために企図される、B7-H3 TriKE分子の開発、特性評価、及び有効性の評価を説明する実施例を提示する。以下の実施例は、本発明の実施形態を更に例示するために提供されるが、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。それらは典型的に使用され得るであろう実施例であるが、当業者に周知の他の手順、方法論、又は技法も代替的に使用され得る。

【実施例】

【0141】

実施例1

三重特異性の開発及び特性評価

抗原特異的免疫療法は、腫瘍細胞において標的抗原が過剰発現し、正常組織において腫瘍外での発現が最小限である必要がある。理想的には、抗原が広範ながんにおいて高い発現を示し、免疫療法をいくつかの状況に適用可能にし、そして広範な標的を同定することができる場合にはバスケット臨床試験がより一般的になる。チェックポイントリガンドのB7ファミリーのメンバーである膜貫通共刺激タンパク質であるB7-H3は、免疫療法の標的として関心を得ている。これは、T細胞上の受容体と会合することにより共刺激及び阻害の状況の両方に関与する一方で、マクロファージなどの抗原提示細胞及び腫瘍微小環境内の腫瘍細胞における発現による免疫回避に寄与することも示されている。B7-H3発現は、多くの種類のがんにおいて高いが、正常組織においては非常に低い。マウス細胞に対して反応性のB7-H3標的指向CAR T構築物を利用するマウスモデルは、毒性なしでの抗腫瘍応答を実証し、標的としてのB7-H3の安全性プロファイルを更に強調する。卵巣腫瘍の93パーセントがB7-H3を発現し、発現は、進行期、高再発、及び不良な生存に関連する。結腸がん、前立腺がん、膵臓がん、非小細胞肺がん、及び胃がんを含む他の種類の癌腫について同様の所見が存在し、B7-H3が、様々な異なるがんの範囲にわたるがん生物学、進行、及び治療において有用なマーカーであり得ることを示す。これらの特徴のために、現在、Fc最適化抗体(NCT02982941)からCAR T細胞(NCT04077866)に至るまでの形態で、この抗原を標的とするいくつかの進行中の臨床試験が存在する。

【0142】

ブリナツモマブなどの二重特異性免疫エンゲージャーは、優れた臨床的な成功を示している。単一の操作された分子として、その一本鎖可変断片(scFv)の一方は、がん細胞を標的とし、他方は、T細胞におけるCD3を標的とする。これにより、T細胞とがん細胞との間に免疫シナプスが生成され、腫瘍が死滅する。しかしながら、T細胞の活性化及び増殖は、サイトカイン放出症候群、播種性血管内凝固、並びに脳症及び発作を含む神経系事象をもたらし得る。したがって、本研究は、T細胞の代わりにナチュラルキラー(NK)細胞を選択的に会合させることを目的とする。NK細胞は、先天性免疫系の一部であり、腫瘍のサーベイランスにおいて主要な役割を果たし、固形腫瘍及び血液がんを含む多くの研究で可能性を示している。これらの特徴のために、NK細胞における最も強力な活性化受容体であるCD16を標的指向する一本鎖可変断片(scFv)と、腫瘍関連抗原を標的指向するscFvと、IL-15部分と、からなる、三種特異性キラーエンゲージャー(TriKE)プラットフォームが設計され、記載されている。本発明者らは、CD16に対する単一のドメイン抗体を追加することによってこのプラットフォームを改善し、その結果は、より良好なIL-15活性及び全体的な機能である。IL-15は、NK細胞の機能のための最も重要な恒常性サイトカインである。これは、NK細胞の増殖及び生存に必要なものであり、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を増幅し、リンホカイン活性化キラー活性を誘導することができ、インターフェロンガンマ(IFNγ)及び腫瘍壊

10

20

30

40

50

死因子アルファ (TNF α) などの他の共刺激メディエーターの産生を増強することができる。

【0143】

本明細書には、ヒト化ラクダ科抗CD16 VHH単ドメイン抗体 (sdAb) と、cam1615B7-H3と称される抗B7-H3 scFvとの間の、修飾されたクロスリンカーとしてのヒトIL-15で生物工学的に操作された、第2世代のTriKEが記載される。したがって、単一の分子において、2つの重要な治療特性：ADCCを増強する能力を伴う、NK細胞増殖を特異的に増強する能力、が合わされた。cam1615B7-H3は、インビトロで多様な固形腫瘍に対するNK細胞活性の強力かつ特異的な誘導を実証する一方で、異種卵巣がんモデルにおいても強力な活性を示した。したがって、B7-H3をTriKEで標的指向することは、いくつかの固形がんのNK細胞ベースの免疫療法において高い治療効果を有し得る。

10

【0144】

cam1615B7-H3 TriKEの構築

ラクダ科に由来する単ドメインVHH抗体は、従来のVL-VH scFv断片よりも利点を提供することが知られている。ラクダ科 (ラマ) 抗CD16由来の相補性決定領域 (CDR) を、普遍的でヒト化された重鎖スキャホールド内に分けて入れた。このヒト化ラクダ科の配列を使用して、cam1615B7-H3を作成した。cam1615B7-H3をコードするハイブリッド遺伝子を、DNAシャッフリング及びDNAライゲーション技術を使用して合成した。完全に組織化された遺伝子は (5'末端から3'末端まで) 以下：NcoI制限部位；ATG開始コドン；抗ヒトCD16 VHH；20アミノ酸 (aa) セグメントである、PSGQAGAAASESLFVSNHAY (配列番号36)；ヒト野生型IL-15；7アミノ酸リンカーである、EASGGPE (配列番号37)；抗B7-H3 mAb 376.96 scFv；及びXhoI制限部位、をコードした。得られたハイブリッド遺伝子を、イソプロピル-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 誘導性T7プロモーターの制御下にあるpET28c発現ベクターにスプライシングした。cam1615B7-H3をコードするDNA標的遺伝子は、1527塩基対であった。Biomedical Genomics Center, University of Minnesota (St. Paul, MN, USA) の生物医学ゲノミクスセンターは、構築物の遺伝子配列及びインフレームでの精度を検証した。

30

【0145】

封入体からのタンパク質の精製

大腸菌 (*Escherichia coli*) 株BL21 (DE3) (Novagen, Madison, WI, USA) を、プラスミドトランスフェクション後のタンパク質の発現に使用した。細菌発現は、標的タンパク質の封入体 (IB) への隔離をもたらした。細菌を、カナマイシンを含有する800mLのルリアブロス (30mg/mL) 中で一晩培養した。600nmでの吸光度が0.65に達したときに、イソプロピル β -D-1-チオガラクトピラノシド/IPTG (Fischer Biotech, Fair Lawn, NJ, USA) を用いて発現を誘導した。2時間後に細菌を採取した。緩衝溶液 (50mMのTris、50mMのNaCl、及び5mMのEDTA pH8.0) での均質化ステップの後、ペレットを超音波処理し、遠心分離した。0.3%のデオキシコール酸ナトリウム、5%のTriton X-100、10%のグリセリン、50mmol/LのTris、50mmol/LのNaCl、及び5mmol/LのEDTA (pH8.0) の溶液を使用して、タンパク質をペレットから抽出した。抽出物を3回洗浄した。

40

【0146】

封入体状態での細菌による発現は、リフォールディングを必要とする。したがって、N-ラウロイルサルコシナトリウム (SLS) 空気酸化法を使用してタンパク質をリフォールドさせた (20)。IBを100mMのTris、2.5%のSLS (Sigma, St. Louis, MO USA) に溶解し、遠心分離によって清澄化した。次いで、50 μ MのCuSO₄を溶液に添加した後、-SH基の空気酸化のために、急速攪拌しながら

50

ら室温で20時間インキュベートした。SLSの除去は、6Mの尿素及び10%のAG 1-X8樹脂(200~400メッシュ、塩化物形態)(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を、デタージェントで可溶化した前記タンパク質溶液に添加することによって行った。グアニジンHCl(13.3M)を溶液に添加し、37℃で2~3時間インキュベートした。溶液を、リフォールディング緩衝液: 50mMのTris、0.5MのL-アルギニン、1Mの尿素、20%のグリセロール、5mMのEDTA(pH8.0)で、20倍に希釈した。混合物を4℃で2日間リフォールディングし、次いで、5体積の20mMのTris-HClに対して、pH8.0で48時間、4℃で、その後8体積に対して、更に18時間、透析した。次いで、生成物を高速流Qイオン交換カラムで精製し、サイズ排除カラム(Superdex 200, GE, Marlborough, MA, USA)を通過させることによって更に精製した。タンパク質の純度を、Simply Blue Safe Stain(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)で染色したドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)で判定した。

10

【0147】

B7-H3 標的指向 TriKE の生成及び精製

ADCC 及び NK 細胞の両方の拡張が可能な第2世代の TriKE を構築するために、既存の TriKE プラットフォームを改変した。2つの修飾されたフランキング領域を有する野生型ヒト IL-15 クロスリンカーを、N 末端側の VHH ヒト化ラクダ科抗 CD16 断片と、C 末端側の抗 B7-H3 断片との、2つの抗体断片の間に挿入し、cam1615 B7-H3 を作成した。図1Aは、B7-H3 TriKE 構築物の模式図を示す。B7-H3 TriKE は、IL-15 及び2つの柔軟性リンカー領域によって結合された、CD16 と B7-H3 とを標的とするラクダ科ナノボディ(cam)由来の単鎖可変断片を含み、約46kDaの分子量を有する単一ペプチドを形成する。これは、約35kDaの単一ペプチドを形成する、単一の柔軟性リンカー領域を有する、camCD16 及び camB7-H3 からなる BiKE とは異なる。NK 細胞媒介標的溶解は、B7-H3 の TriKE 又は BiKE による直接的な物理的連結の形成を介して、B7-H3 発現腫瘍細胞に向けられる。次いで、IL-15 は、NK 細胞を刺激する。図1Bは、グラフの横軸に示される8mL アリコートに収集された溶出液を用いた精製の第一段階としての、FFQ イオン交換カラムからの吸光度トレースを示す。両方向矢印は、薬物がカラムを出る際の収集ピークを示す。図1Cは、第2の精製段階であるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)からの吸光度トレースを示す。カラムから第1のピークを収集し、様々な薬物含有画分をプールし、均一な生成物の存在について、クマシーブルー染色を用いて SDS-PAGE を使用して分析した(図1D)。最終生成物は、約55kDaの分子量で90%超の純度であり、予測分子量は54.58kDaであった。他の TriKE 分子と同様に、この TriKE は、そのサイズに起因して迅速なクリアランスプロファイルを有し、EC50 は数時間程度の範囲であると予想される。

20

30

【0148】

cam1615 B7-H3 TriKE は、強力かつ特異的な NK 細胞増殖を誘導する

cam1615 B7-H3 TriKE の野生型 IL-15 部分を、NK 細胞への増殖シグナルの標的送達を誘導するように設計した。これを試験するために、無処置(NT)、単量体 rhIL-15(IL15)、又は TriKE(cam1615 B7-H3)で処置した PBMC に対して、7日間にわたる CellTrace 色素の希釈を評価する増殖アッセイを行った。7日間の終わりに、細胞を採取し、CD56+CD3-細胞をゲーティングすることによって増殖を評価した。無処置(NT)は、低い NK 細胞数の低い増殖をもたらしたが、cam1615 B7-H3 は、rhIL-15 によって誘導される増幅に類似する増幅の全体的な増加を誘導し(図2A~2D)、これらの2つの群間に有意差はなかった。IL-15 は NK 細胞及び T 細胞の両方に作用するため、次に、T 細胞におけるゲーティング(CD56-CD3+)によって特異性を評価した。T 細胞のロバストな増殖を誘導した rhIL-15 (図2E 及び 2F) とは対照的に、最小の T 細胞増殖

40

50

が TriKE 処置群で見られ、cam1615B7-H3 TriKE IL-15 送達
が、NK細胞に対して、より限定的であることを明確に示す。この差は、ロバストに増殖
する集団（3回の分裂を経て）で特に顕著であり、cam1615B7-H3 TriKE
は、未処置群よりも有意に少ない増殖を示した（図2G）が、T細胞数は、未処置群と
TriKE 処置群との間で差はなかった（図2H）。このデータは、cam1615B7
-H3 TriKEにおけるcam16エンゲージャーが、T細胞ではなくNK細胞にIL
-15を特異的に送達していることを示す。

【0149】

図3A及び3Bに示すように、本発明のcamB7-H3 TriKEは、WT B7
-H3に対する強い結合特異性を実証した。BT-12小児脳腫瘍株は、B7-H3（WT）を高度に発現する。CRISPRを使用して、B7-H3 KO BT-12細胞株
を産生した（Theruvath et al）。Raji（陰性B7-H3）及び前立
腺がん細胞株C4-2（陽性B7-H3）並びに複数の他の株を使用して同様の特異性を
認めた。B7-H3 BiKEは、陽性細胞株及び陰性細胞株と同様の結合を有した（デ
ータ未掲載）。

10

【0150】

CD16の有り又は無しでの、NK-92細胞を、NCI IL-15及びGTB-5
550の希釈液と、48時間インキュベートした。次いで、代謝活性を、レザズリンを使
用して測定した（n=4）。図4A～4Bに示されるように、CD16+NK-92にお
いて、TriKE分子はNCI IL-15の2倍強力であることが見出された。

20

【0151】

実施例 2

一般的な材料及び方法

がん細胞株及び抗体

MA-148（University of Minnesotaで局所的に確立）は
、ヒト上皮高悪性度漿液性卵巢癌細胞株である。インビボ実験では、Invitrogen
のLipofectamine試薬を用いてルシフェラーゼレポーター構築物をトラン
スフェクトし、10µg/mLのブラストサイジンで選択的圧力を加えた。卵巢癌細胞株
OVCAR5及びOVCAR8はBiological Testing Branch
、Developmental Therapeutics Program, National Cancer Institute（NCI）, National Ins
titutes of Health（NIH、Frederick, MD, USA）が
主催するDTP, DCTD Tumor Repositoryから入手した。OVCA
R3（卵巢）、C4-2（前立腺）、DU145（前立腺）、LNCaP（前立腺）、P
C-3（前立腺）、A549（肺）、NCI-H322（肺）、NCI-H460（肺）
、及びRaji細胞（バーキットリンパ腫）を含む他の細胞株を、American T
ype Culture Collectionから入手した。陰性対照として使用され
るRaji細胞を除いて、全ての株は、高レベルのB7-H3を発現する。株は、10～
20%のウシ胎児血清（FBS）及び2mmol/LのL-グルタミンを補充したRPM
I 1640培地で維持した。株を、一定の37℃で、5%CO2を含む加湿雰囲気
でインキュベートした。接着細胞が、90%を超えるコンフルエントであった場合、それらは、
剥離のためのトリプシン-EDTAを使用して、継代された。細胞カウントには、標準的
な血球計を使用した。生存率が95%超である細胞のみを実験に使用した。モノクローナ
ル抗体scFv断片376.96の配列はDr. Ferroneによって得られ、Tri
KEを構築するために使用した。

30

40

【0152】

細胞生成物

末梢血単核球（PBMC）は、Committee on the Use of H
uman Subjects in Researchによるガイドラインに応じて、ま
たDeclaration of Helsinkiに従い、同意を受け、また機関審査

50

委員会（IRB）で承認された（9709M00134及び1607M91103）後に、正常なボランティア又は対象から入手した。インビボ研究のために、新鮮なPBMCを、製造業者の推奨（STEMCELL Technologies、Cambridge, MA, USA）に従って、CD3及びCD19陽性細胞を、3回磁氣的に枯渇させ（すなわち、磁石を3回通過させ）、NK細胞濃縮生成物を生成した。卵巣がん検体（腹水）は、一次デバルキング手術時に、進行期の卵巣がん又は原発性腹膜癌と診断された女性で採取された。前立腺がんについては、転移性去勢抵抗性前立腺がんを有する2人の患者、及び転移性ホルモン感受性前立腺がんを有する1人の患者から、血液を採取した。肺がんについては、処置前の、診断時に切除不能な肺がんとなされた患者7人から血液を採取した。細胞をペレット化し、赤血球を溶解し、10%のDMSO／90%のFBS中で凍結保存し、液体窒素の中に保存した。

10

【0153】

IL-15刺激によるNK細胞増殖

IL-15部分を介してNK細胞の増殖を特異的に誘導するTriKEの能力を測定するために、健康なドナー由来のPBMCを、キット仕様に従ってCellTrace Violet増殖色素（Invitrogen、Carlsbad, CA, USA）で標識した。染色後、細胞を、記載された濃度のTriKE、又は等モル濃度の対照とともに培養し、5%のCO₂を含む加湿雰囲気中、37℃で7日間インキュベートした。細胞を採取し、Live／Dead試薬（Invitrogen、Carlsbad, CA, USA）で生存率について染色し、抗CD56 PE／Cy7（Biolegend、San Diego, CA, USA）及び抗CD3 PE-CF594（BD Biosciences、Franklin Lakes, NJ, USA）で表面染色して、生存可能なCD56＋CD3－NK細胞集団又はCD56－CD3＋T細胞集団をゲーティングした。データ分析は、FlowJoソフトウェア（FlowJo LLC, version 7.6.5, Ashland, OR, USA）を使用して行った。

20

【0154】

細胞傷害性及びNK細胞活性化の評価

ADCCは、CD107a（リソソーム関連膜タンパク質LAMP-1）を介した脱顆粒及び細胞内IFN γ 産生を評価することにより、フローサイトメトリーアッセイにおいて測定された。解凍時に、正常なドナー及び患者由来のPBMC又は腹水細胞を、10%のウシ胎仔血清を補充したRPMI1640培地（RPMI-10）中で一晚（37℃、5%のCO₂）置いた。翌朝、RPMI-10で2回洗浄した後、それらを腫瘍標的細胞と又は培地で懸濁した。次いで、細胞を、TriKE又は対照とともに、37℃で10分間インキュベートした。次いで、フルオレセインイソチオシアート（FITC）コンジュゲート抗ヒトCD107aモノクローナル抗体（BD Biosciences、San Jose, CA, USA）を添加した。37℃で1時間インキュベーションした後、ゴルジストップ（1：1500、BD Biosciences）及びゴルジプラグ（1：1000、BD Biosciences）を添加し3時間置いた。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、細胞を、PE／Cy7コンジュゲート抗CD56 mAb、APC／Cy7コンジュゲート抗CD16 mAb、及びPE-CF594コンジュゲート抗CD3 mAb（Biolegend、San Diego, CA, USA）で染色した。細胞を4℃で15分間インキュベートし、洗浄して、2%のパラホルムアルデヒドで固定した。次いで、細胞を、intracellular perm buffer（Biolegend）を使用して透過させて、aBV650コンジュゲート抗ヒトIFN γ 抗体（Biolegend）を介した検出によりIFN γ の産生を評価した。試料を洗浄し、LSRIIフローサイトメーター（BD Biosciences、San Jose, CA, USA）で評価した。

30

40

【0155】

リアルタイム腫瘍殺傷アッセイ

腫瘍殺傷を、Incucyteプラットフォームを使用してリアルタイムで評価した。

50

磁気ビーズで濃縮したCD3-CD56+NKEフェクター細胞を、2:1のエフェクター:標的比で、NucLightRedを安定して発現するOVCA R8細胞とともに、96ウェルの透明な平底ポリスチレン組織培養処理マイクロプレート(Corning, Flintshire, UK)にプレートした。カスパーゼ-3/7緑色色素(Sartorius, Ann Arbor, MI, USA)を添加して、NucLightRed蛍光をまだ失っていない染色細胞をピックアップした。次に、30nMの濃度で、記載された処置を加え、プレートを、37℃/5%のCO₂で、細胞インキュベーター内に収容されたIncucyte ZOOM(登録商標)プラットフォームに配置した。3つの技術的複製からの画像を、4X対物レンズを使用して、15分ごとに48時間撮影し、次いで、Incucyte(商標)ベーシックソフトウェアv2018A(Sartorius)を使用して分析した。グラフ化された読み出し情報は、開始(0時間)時点での生存標的単独に対して正規化された、生存OVCA R8標的(NucLightRed+Caspase-3/7-)のパーセンテージを表す。

10

【0156】

質量サイトメトリー(CyTOF)

質量サイトメトリー(CyTOF)研究のために、PBMCを、+/-cam1615 B7-H3(30nM)で、24時間、単独で、又は2:1の比でOVCA R8とともに、インキュベートした。試料を採取した後、細胞をカウントし、トリパンブルー排除を使用して生存率を測定した。各ドナーからの20万個の細胞を、バーコーディング及びCyTOF染色のために、5mLのポリスチレンU字底のチューブに等分した。細胞をシスプラチン(Fluidigm製品番号201064, San Francisco, CA, USA)で染色した後Cell-ID 20-Plex Pd Barcoding Kit(Fluidigm製品番号201060)を使用してバーコーディングした。バーコーディングした後、全ての細胞を単一の5mLポリスチレンU字底チューブの中で一緒にし、30分間4℃で、表面マーカー抗体カクテル中でインキュベートした。

20

【0157】

次に、表面染色後、細胞を2%のPFAを使用して固定した。細胞内染色のために、トリトンX-0.1%を用いて室温で5分間インキュベートすることによって細胞を透過させ、続いて、細胞内抗体カクテルと4℃で30分間インキュベートした。次いで、染色細胞を、Cell-IDインターカラー(Fluidigm製品番号201192A)で一晩インキュベートした。翌朝、細胞を洗浄し、CyTOF 2機器に供した。洗浄ステップは、Maxpar PBS(Fluidigm製品番号201058)、Maxpar Cell Staining Buffer(Fluidigm製品番号201068)、又はMillipore Waterのいずれかを使用し、1600RPMで4分間で完了した。カスタムタグ付き抗体について:重金属の特異的なScFvへのコンジュゲーションは、Maxpar抗体標識キット(Fluidigm)を使用して行われる。このプロトコルは、0.5MのTCEPを使用した部分的抗体還元を伴う:Pierce Bond-Breaker TCEP溶液(Thermo Scientific製品番号77720, Waltham, MA, USA)、並びに3kDa及び50kDaサイズの両方の遠心フィルターユニットを使用した包括的な緩衝液交換(Millipore製品番号UFC500396, UFC505096, Burlington, MA, USA)。抗体のコンジュゲーション後、収率を測定し、最終試薬を抗体安定剤(BioScientific製品番号131000, Westwood, MA, USA)に保存する。次いで、試薬を滴定し、周知のフローサイトメトリー抗体について検証する。3つのドナーからのデータを合わせた。FCSファイルの連結は、CytoBankとFlowJoとの組み合わせで完成させた。全てのVisne分析は、CytoBankで実施された。

30

40

【0158】

インビボマウス研究及びイメージング

MA-148-Luc卵巣がん細胞を、前述のNK細胞異種マウスモデル系に組み込ん

50

だ。NSGマウス(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wjl/SzJ、 $n=5$ /群)に、 2.0×10^5 MA-148-luc細胞をIP注射し、次いで3日後に、低用量の全身照射(225cGy)で条件付けした。翌日、全ての群は、100万個のNK細胞/マウスに相当する高濃縮NK細胞(磁気的にCD3及びCD19が枯渇されたPBMC)を受け取り、薬物レジメンを開始した。1つのコースの処置は、30 μ gのTriKE又は5 μ gのrhIL-15を3週間、毎日(月曜日~金曜日)投与するIP注射から構成された。MA-148-luc細胞は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子をトランスフェクトされたMA-148のサブラインであり、各週の、マウスのイメージングを可能にして、それらの生体発光活性を決定し、腫瘍進行を監視する。簡潔に述べると、イメージングの10分前に、100 μ Lの30mg/mLのルシフェリン基質をマウスに注入し、次いで、イソフルランガスの吸入により麻酔した(25)。次いで、マウスを、Xenogen Ivis 100イメージングシステムを使用してイメージングし、Living Image 2.5ソフトウェア(Xenogen Corporation、Alameda, CA, USA)により分析した。実験の終わり(21日目)に、全ての動物を殺し、死後腹膜洗浄液で、フローサイトメトリーによってヒトNK細胞含有量を分析した。動物のイメージング及び分析は、University of Minnesota Imaging Centerで行われた。マウス研究は、University of MinnesotaのInstitutional Animal Care and Use Committee(IACUC)からの承認(プロトコル1908-37330A)後に、そのガイドラインに従って実施した。

10

20

【0159】

統計分析

GraphPad PRISM8(GraphPad Prism Software, Inc.、San Diego, CA, USA)を使用して、全ての統計的検定を作成した。全てのインビトロ研究について、反復測定による一元配置ANOVAを使用して、cam1615B7-H3群との比較における有意性を計算した。マウス研究では、二元配置ANOVAを使用して縦断的研究における有意性を計算し、一元配置ANOVAを使用して、21日目の時点での放射線量の差における有意性を計算した。対応のないt検定を使用して、細胞カウント及びMFIの差を評価した。バーは平均値 $\pm$ SEMを表す。統計的有意性は、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、及び*** $p < 0.0001$ として示される。

30

【0160】

実施例3

血液がん細胞

本発明のH7-B3 TriKE分子の有効性を、いくつかの血液がん細胞株において評価した。別段に記載されない限り、使用される方法は、実施例2に記載されるようなものである。

【0161】

図5A~5Bに例示されるように、機能アッセイは、B7-H3発現のレベルが、ゼロ~非常に高いレベルまで異なる、血液悪性腫瘍細胞株を用いて行った。NK細胞の活性化を、フローサイトメトリー($n=3$)、Incucyte、又はxCelligenceアッセイによって測定したCD107a及びIFN γ を使用して測定した。

40

【0162】

次に、多発性骨髄腫に焦点を当てた。骨髄腫におけるB7-H3(CD276)の発現は、無増悪生存期間の減少と関連しており、健康な組織では低発現を呈し、骨髄腫の増殖を促進する骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)においては発現している。

【0163】

図6A~6Bに示されるように、B7-H3の高発現は、フローサイトメトリーによって、骨髄腫株RPMI-8226、U266、及びMM1Sにおいて見出され、H929においては比較的低発現であった。

50

【0164】

ライブイメージングIncucyte Zoomアッセイにおいて、B7-H3-TriKEの有り又は無しでの、骨髄腫細胞を死滅させるための末梢血NK細胞の能力を、TriKEの用量を漸増させて比較した。最大殺傷は、3 nMの濃度で生じた。3 nMのB7-H3-TriKEを添加した場合の4つの骨髄腫株全てのNK細胞媒介殺傷について、統計的に有意な増加が見出された。U266及びMM1Sに対して、B7-H3-TriKEは、2:1及び4:1のエフェクター:標的(E:T)比での殺傷を有意に増強した。RPMI-8226は、NK細胞の細胞傷害性に対して比較的高い耐性を示したが、B7-H3-TriKEは4:1のE:Tで殺傷を増強した。H929細胞は、B7-H3-TriKEの存在下で2:1のE:Tでより強力に殺傷されたが、両方の群において高い天然細胞傷害性に起因する可能性が高いために、E:T 4:1での殺傷に差はなかった(図7A~7B及び図8A~8Dを参照のこと)。

10

【0165】

プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(10 nM)及び免疫調節薬レナリドミド(5 µM)によるB7-H3-TriKEの有効性についても試験した。細胞傷害性曲線を反復測定ANOVAによって比較して3回行った。B7-H3-TriKE、NK細胞、及びレナリドミドとの併用療法は、48時間の生存細胞イメージング後に、H929細胞の相乗的殺傷を示した($p=0.047$)が、ボルテゾミブとの併用は、NK細胞及びTriKE単独と比較して、殺傷を更に増強しなかった(図9A)。レナリドミド及びボルテゾミブの両方が、NK細胞及びB7-H3-TriKEとともに投与された場合、MM1Sに対する殺傷の改善傾向を示したが、統計的有意性に達しなかった(図9B)。B7-H3-TriKE、NK細胞、及びレナリドミド又はボルテゾミブによる併用療法は、生存細胞イメージングの48時間後のRPMI-8226細胞の相乗的殺傷を示した(それぞれ $p<0.001$ 及び 0.015) (図9C)。B7-H3-TriKE及びNK細胞と組み合わせたボルテゾミブは、U266細胞における殺傷を増強した($p=0.037$) (図9D)。

20

【0166】

IL-6及びGM-CSFを使用するか、又は1:100の比率で骨髄腫細胞とともに7日間インキュベートすることによって、健康なドナー由来のCD33+骨髄性細胞からMDSCを発生させた。MDSC(CD14+CD11b+)は、B7-H3の高発現を呈した(図10A)。MDSCはまた、3人の新たに診断された骨髄腫患者の骨髄穿刺液から単離され、56~95の生存を示した(穿刺液を溶解緩衝液で処理し、CD14、CD11b、及びB7-H3を染色した。生存CD14+細胞のフローサイトメトリープロットを示す(図10C))。MDSCを骨髄腫細胞とともにインキュベートし、生存細胞イメージングによって48時間にわたって増殖を測定した(図10B)。細胞傷害性アッセイへのMDSCの添加は、骨髄腫細胞増殖を増強したが、B7-H3-TriKE及びNK細胞によって克服された(図10D)。B7-H3-TriKEは、比較的低いB7-H3発現のH929株においてさえ、NK細胞が媒介する骨髄腫細胞の殺傷を有意に増強した。これはまた、MDSC誘発性骨髄腫の増殖を逆転させることができることを示す。

30

【0167】

MDSCがB7-H3を発現した後、MDSCを、1:1のE:TでNKとともに共培養し、B7-H3-TriKEの有り又は無しでの殺傷を比較した(図11A及び11Bを参照されたい)。

40

【0168】

実施例4

前立腺がんにおけるH7-B3-TriKEの有効性

本発明のH7-B3のTriKE分子の有効性を、いくつかの前立腺がん細胞株において評価した。別段に記載されない限り、使用される方法は、実施例2に記載されるようなものである。

【0169】

50

図12A～12D、14A～14L、及び15A～15Dに示すように、cam1615B7-H3 TriKEは、前立腺がんを標的とする。前立腺がんに対するNK細胞活性を改善するためのcam1615B7-H3 TriKEの能力を試験した。試験した全ての前立腺がん細胞株は、B7-H3を発現した。これらの試験では、正常ドナーPBMC、及び転移性前立腺がん患者から得られたPBMCを使用した。転移性前立腺がん患者は、正常なドナーと比較した場合、NK細胞活性のわずかな低下を示したが、対照と比較した場合、C4-2、DU145、LNCaP、及びPC3前立腺がん腺癌細胞株に対して、cam1615B7-H3 TriKEは、正常ドナー及び患者のNK細胞の両方における脱顆粒及びIFN γ 産生を増強した（図14A～14G、14J、及び15A～15D）。個々のcam16 VHH又は抗B7-H3 scFv成分は、C4-2に対するNK細胞活性化の増加を誘導しなかった。したがって、このデータは、cam1615B7-H3 TriKEが、前立腺がん状況でのNK細胞免疫療法において有望であり、現在の治療アプローチでは転帰が悪いために新規の介入を必要とする患者においてNK細胞の機能を救済できることを示している。TriKEによって前立腺がん細胞に誘導されるシグナルは、強力な天然細胞傷害性シグナルによって誘導されるシグナルよりも強く、B7-H3に特異的であった。

10

【0170】

図13A～13Bに示すように、cam1615B7-H3 TriKEは、IL-15単独よりもNKの機能を誘導するのに強力であり、IL-15単独と比較して、NK細胞増殖を誘導するのに強力であった。

20

【0171】

図16に例示するように、PC-3細胞の腫瘍死滅は、Incucyteプラットフォームを使用してリアルタイムで評価され、Incucyteプラットフォームは、前立腺がん細胞死を誘導するB7-H3 TriKE分子の増強された有効性を強調した。

【0172】

図17～20に示すように、B7-H3 TriKE分子はまた、時間の経過とともにPC-3スフェロイドサイズを減少させることができた。

【0173】

図21に示すように、B7-H3 TriKE分子による前立腺がん細胞の死滅は、処置の開始後、迅速に（数時間以内に）起こることが実証された。

30

【0174】

様々なエンザルタミド耐性前立腺がん細胞を、B7-H3の発現について表現型を決定した。図22A～22Fに例示されるように、試験した全ての細胞株は、B7-H3を発現した。

【0175】

図23A～23Lに示すように、camB7-H3 TriKEは、CD107a+及びIFN γ +NK細胞のパーセントを測定することによって評価されるように、以前のscFvバージョンよりも広いダイナミックレンジにわたって前立腺がん細胞に対する活性を誘導することが見出された。

【0176】

40

実施例5

肺がんにおけるH7-B3 TriKEの有効性

本発明のH7-B3 TriKE分子の有効性を、いくつかの肺がん細胞株において評価した。別段に記載されない限り、使用される方法は、実施例2に記載されるようなものである。

【0177】

図24A～24Fに例示するように、cam1615B7-H3 TriKEは、肺がんを標的とする。B7-H3発現肺がんに対するNK細胞活性を改善するcam1615B7-H3 TriKEの能力を、2つの非小細胞肺がん腺癌株であるA549及びNCI-H322とインキュベートした正常ドナーPBMCにおいて試験した（図24A～2

50

4 D)。どちらの場合も、cam1615B7-H3 TriKEは、対照と比較した場合、NK細胞の活性化を有意かつ口バストに改善した。個々のcam16 VHH又は抗B7-H3のscFv成分を試験したところ、A549に対し、バックグラウンドNK細胞活性を示さなかった。正常ドナーPBMC及び新たに診断された切除不能な肺がんを有する患者からの任意の療法の前のPBMCを、大細胞肺がん細胞株であるNCI-H460細胞とインキュベートした。データが明確に示すように、cam1615B7-H3処置は、対照と比較した場合、正常ドナー及び患者試料の両方で、大細胞肺がんに対するNK細胞の機能を強く増加させた(図24E~24F)。肺がん細胞に対する、TriKEが媒介するNK細胞の脱顆粒及びIFN γ 産生は、NK細胞をK562標的単独とインキュベートしたときに見られたものよりも高かった。B7-H3-Raji細胞による活性化よりも高かったため、肺がん細胞株に対する活性化はB7-H3発現に特異的であった。したがって、データは、cam1615B7-H3 TriKEが、多くの固形腫瘍標的に対する幅広いB7-H3特異的活性を有することを示している。

10

【0178】

実施例 6

頭頸部がんにおけるH7-B3 TriKEの有効性

本発明のH7-B3 TriKE分子の有効性を、いくつかの頭頸部がん細胞株において評価した。別段に記載されない限り、使用される方法は、実施例2に記載されるようなものである。

【0179】

世界中で、頭頸部扁平上皮細胞癌(HNSCC)は約90万人の症例及び40万人の死亡を占めている。ファンコニー貧血(FA)のようないくつかの状況では、患者は根治的処置(同種幹細胞移植)を受けるが、高い発生率で成人早期においてHNSCCを発症する。非FA HNSCC患者の現在の処置戦略には、手術、化学療法、及び放射線療法が含まれる。しかしながら、高い毒性レベルの化学療法及び放射線に対する耐性が低いため、これらは、FA HNSCC患者にとって実行可能な処置選択肢ではない。したがって、FA HNSCC患者の処置のための新規かつ標的指向された治療介入について重要なニーズがある。

【0180】

B7及びCD28ファミリーのチェックポイントメンバーであるB7-H3は、いくつかの固形腫瘍において過剰発現するが、健康な組織においては存在しないか又は発現しない。これは免疫療法のための有望な標的であり、特に前立腺がんにおける最近のバスケット試験は、強力な臨床的シグナルを実証している。本願では、B7-H3標的指向成分を含む三重特異性キラーエンゲージャー(TriKE)の能力を開発し、NK細胞による死滅をB7-H3発現頭頸部がん標的に向けるように試験した。このTriKE分子は、CD16に対するヒト化ラクダ科ナノボディを含む、NK細胞エンゲージメントドメインと；B7-H3に対するラクダ科ナノボディと；これら2つのエンゲージャー間の野生型IL-15配列と、を含む。B7-H3の発現を、野生型HNSCC細胞、及びFANCA遺伝子をCRISPERによりKOした対になったバージョンでのフローサイトメトリーによって評価し、KOがB7-H3の発現に影響を及ぼさなかったと判定された。したがって、HNSCCに対するTriKE活性は、通常のHNSCC及びFA-HNSCCの両方の状況に存在する必要がある。

30

40

【0181】

B7-H3 TriKEの存在下でのHNSCC細胞株に対するNK細胞応答を、NK細胞の脱顆粒及びサイトカイン分泌を評価するためのフローサイトメトリーベースの機能アッセイ、又は標的殺傷を直接評価するためのIncucyteイメージングアッセイのいずれかによって評価した。B7-H3 TriKE処置試料のNK細胞脱顆粒及びIFN- γ 産生は、B7-H3単一ドメイン又はIL-15単独で処置された対照試料と比較して高かった。B7-H3 TriKEはまた、2D及び3DのIncucyteイメージングアッセイの両方において、FANCA遺伝子にかかわらず、B7-H3単一ド

50

メイン又はIL-15単独での処置と比較して、NK細胞によるより多くのHNSCC標的細胞殺傷を誘導した。進行中の実験は、インビボでB7-H3 TriKEの機能性及び有効性を評価する。まとめると、このデータは、B7-H3 TriKEが、B7-H3発現HNSCC細胞に対する、ラクダ科ナノボディであるB7-H3-CD16に対するNK細胞活性を駆動することができることを示し、これにより、B7-H3標的指向TriKEが、HNSCC又はFA-HNSCC患者を処置するために臨床的に使用される可能性が示される。

【0182】

図25A~25Bに示されるように、健康なドナー由来の凍結PBMC (N=3) を、5つのHNSCC細胞株：UM-SCC-01、SFCI-SCC-07、JHU-SCC-Fadu、Cal27及びCal33とともに5時間インキュベートし、CD107a発現（脱顆粒化についてのマーカーとして）及び細胞内IFN- γ 産生を評価する。HNSCC細胞株は、処置なしにNK細胞の細胞溶解機能を誘導しなかった。

10

【0183】

図26A~26Bに示されるように、5つのHNSCC細胞株を、フローサイトメトリーを介して、B7-H3発現について評価し、B7-H3単ドメインとの結合親和性を評価し、健康なドナー由来のPBMCを、フローサイトメトリーによって、B7-H3発現について評価した。B7-H3は、HNSCCにおいて高度に発現されるが、健康な免疫細胞においては発現されない。

【0184】

図27A~27Dに示すように、B7-H3 TriKEは、HNSCCに対するNK細胞活性を誘導した。健康なドナー由来の凍結PBMC (N=3) を、(A~B) Cal27トリオ、及び(B~C) Cal33トリオ（HNSCC WT株及びHNSCC FANCA KO株の2つのクローンからなる各トリオ）とともに、異なる処置：処置なし、又は3nMのIL-15、MOPC、B7-H3 SD、及びB7-H3のTriKEで、5時間インキュベートして、CD107a発現（脱顆粒のマーカーとして）及び細胞内IFN- γ 産生を評価した。エラーバーは、平均の標準エラーを示し、統計的有意性は、*p<.05、**p<.01、***p<.001及び****p<.0001として判定した。

20

【0185】

図28A~28Fに示されるように、B7-H3 TriKEは、リアルタイムイメージングアッセイにおいて、HNSCCに対する、NK細胞による殺傷を誘導した。濃縮したNK細胞 (N=4) をNuclight Red-標識Cal27とともに、5:1のE:Tで、異なる条件：処置なし、又は3nMのIL-15、B7-H3 SD、及びB7-H3 TriKEで、Incucyte Zoomイメージャー中で48時間インキュベートした。生存細胞のパーセント定量化は、赤血球の1時間当たりのカウントを、t=0での標的単独に対して正規化することによって行った。Nuclight red-標識Cal27のスフェロイドを72時間形成した後、5:1のE:Tで濃縮NK細胞 (N=4) とともに異なる条件：処置なし、又は3nMのIL-15、B7-H3 SD、及びB7-H3 TriKEで、96時間、Incucyte S3イメージャー中でインキュベートした。経時的なスフェロイドを示す代表的な画像。平均赤色物体面積（生存細胞）のパーセント定量化は、平均赤色物体面積の時間単位のカウントを、t=0での標的単独に対して正規化することによって行われた。同じアッセイのセットをCal33で行った。

30

40

【0186】

健康な細胞を温存しながら、HNSCC細胞を効果的に除去することができる標的療法に対し重要なニーズがある。本明細書では、HNSCCにおいて発現されるB7-H3リガンドに対するTriKE分子の前臨床研究を記載した。本発明者らは、B7-H3 TriKEでの処置が、HNSCCに対するNK細胞の脱顆粒及びサイトカイン産生を効果的に誘導し、並びにインビトロでのHNSCCの標的指向性の殺傷を促進することを見出

50

した。進行中の実験は、インビボでB7-H3 TriKEの機能性及び有効性を評価する。将来の研究は、HNSCC腫瘍微小環境の調査、及びHNSCC腫瘍微小環境におけるB7-H3 TriKEの有効性の評価に加えて、以前の研究がHPV+/-HNSCC腫瘍微小環境における差次的なNK細胞活性を報告しているため、HNSCCのHPV状態がHNSCC腫瘍微小環境におけるTriKEの有効性に何らかの意味を有するかどうかを評価することを含む。

【0187】

実施例7

卵巣がんにおけるH7-B3 TriKEの有効性

本発明のH7-B3 TriKE分子の有効性を、いくつかの卵巣がん細胞株において評価した。別段に記載されない限り、使用される方法は、実施例2に記載されるようなものである。

【0188】

図29A~29B及び30A~30Iに示されるように、cam1615B7-H3 TriKEは、卵巣がんの強力な殺傷を示す。卵巣がん細胞に対するNK細胞活性を媒介するためのcam1615B7-H3 TriKEの能力を評価した。使用した卵巣がん細胞は、ロバストなB7-H3発現を示した。B7-H3は免疫応答に役割を有することが示されているため、正常な免疫細胞に対する活性を誘発するためのcam1615B7-H3の能力をPBMCで評価した。フローサイトメトリーアッセイは、NK細胞のゲーティングを可能にし、cam1615B7-H3が、対照と比較して、NK細胞においていくつかのバックグラウンド脱顆粒(CD107a)を誘導したと判定したが、この活性は低かった。IFN γ では、バックグラウンドノイズは見られなかった。対照的に、PBMCを、OVCAR8、OVCAR3、及びOVCAR5を含む様々な高悪性度の漿液性卵巣癌細胞株とともにインキュベートした場合、処置なし及びrhIL-15単独と比較して、ロバストなNK細胞脱顆粒及び細胞内IFN γ 産生が見られた(図29A~29B及び30A~30F)。TriKEの個々の成分がそれ自体でNK細胞活性を誘導することができるかを判定するために、個々のcam16 VHH、IL-15、又は抗B7-H3のscFv成分を、PBMC及びOVCAR8細胞とともにインキュベートし、活性を判定した。データは、個々の成分がOVCAR8細胞に対するNK細胞活性を増強しないことを明確に示す。正常ドナーPBMC、及び手術時の卵巣がん患者の腹腔からの腹水からのNK細胞活性を、別の高悪性度漿液性卵巣腺癌細胞株であるMA-148細胞に対して評価した(図29A~29B及び30G~30H)。対照と比較して、cam1615B7-H3 TriKEは、正常ドナーNK細胞に対してロバストな活性を誘導した。卵巣がん由来の腹水試料からのNK細胞活性は、腫瘍微小環境によって駆動されるNK細胞の機能の変化及びCD16発現の減少のために予想されるように減少したが、cam1615B7-H3 TriKEは、対照と比較して著しく増強されたNK細胞の脱顆粒を誘導した。最後に、卵巣がん腫瘍細胞(OVCAR8)の殺傷を、濃縮されたNK細胞単独(処置なし)、NK細胞及びrhIL-15(IL15)、並びにNK細胞及びcam1615B7-H3 TriKEの存在下で、2日間にわたって動的に測定した(図30I)。このアッセイでは、腫瘍細胞は、安定して発現した蛍光タンパク質(NucLight Red)で追跡することができ、最近の細胞死を除外するために使用される早期アポトーシスの検出は、緑色蛍光カスパーゼ3/7色素によって媒介される。提供される基本的な読み出しは、記載された時点で腫瘍単独に対して正規化された、生存腫瘍細胞の数(赤色+緑色-)である。示されるように、cam1615B7-H3 TriKEは、対照と比較した場合、ロバストかつ迅速な腫瘍死滅を誘導した。このデータは、cam1615B7-H3 TriKEが、インビトロで卵巣がん細胞に対する活性を強力に増強することを示す。注目すべきことに、cam1615B7-H3 TriKEは、K562細胞によって誘導された、TriKEの非存在下での強力な天然細胞傷害性シグナルと比較して、同様の脱顆粒及びより強いIFN γ 産生を誘導した。全ての卵巣がん細胞株に対するNK細胞活性化倍率は、PBMC+腫瘍+TriKEにおける活性化を、PBMC

10

20

30

40

50

+ T r i K E 単独での活性化で割ったものとして計算したが、それは B 7 - H 3 陰性 R a j i 株による活性化よりも高く、T r i K E の B 7 - H 3 特異性を示した。

【0189】

図31に示すように、c a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 T r i K E 活性化細胞の高次元分析を行った。NK細胞に対するT r i K E 活性化の表現型及び機能的効果を幅広く評価するために、カスタムの42パラメータ、C y T O F (マスサイトメトリー) NK細胞標的パネルを使用した。P B M C を、処置せずに置いておく、c a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 T r i K E と24時間インキュベート、腫瘍 (O V C A R 8) と24時間インキュベート、又は腫瘍及びc a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 T r i K E と24時間インキュベートした。次いで、細胞を染色し、固定して、C y T O F 2 に供した。試料 (条件ごとに3つの生物学的反復) を連結し、データを v i S N E で視覚化した。これは、多次元データを調べるために、全ての発現情報を使用して2Dプロット内の個々の細胞の局在を示す (図31)。データは、C D 5 6 ^{bright} と C D 5 6 ^{dim} とで分布の変化を示さなかった。ケモカイン受容体 C X C R 3 と同様に、活性化マーカー C D 2 5 及び C D 6 9 の両方を、T r i K E 処置で誘導した。NK細胞の細胞溶解活性に關与するグランザイム B は、エフェクター + T r i K E においてプライミングされたが、腫瘍標的 (エフェクター + 腫瘍 + T r i K E) の存在下では、これらのグランザイム B が高い細胞は消失し、これは A D C C 駆動特異的脱顆粒が原因の可能性が高い。興味深いことに、エフェクターを T r i K E の存在下で腫瘍に曝露したとき、阻害性 K I R (K I R 2 D L 1、K I R 2 D L 3 及び K I R 3 D L 1) 及び活性化 K I R (K I R 2 D S 1 及び K I R 2 D S 4) の両方の発現が低下した。これは、N K G 2 D にも当てはまるようであったが、天然細胞傷害性受容体 (N C R : N K p 3 0、N K p 4 4、及び N K p 4 6) の影響は少なかった。最後に、阻害性受容体 T I G I T も、影響を受けたようには見えなかった。まとめると、このデータは、T r i K E 媒介活性化後のNK細胞表現型の動的変化を実証する。

【0190】

図32A~32Fに例示するように、c a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 T r i K E は、インビボで抗腫瘍活性を媒介する。インビボ活性の決定は、橋渡しのための重要なステップである。しかしながら、腫瘍に対する機能を誘導するc a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 T r i K E の能力を評価する前に、毒性の可能性を評価した。これを行うために、N S G マウスを照射し、処置なしで、I L - 1 5 で、又はc a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 で処置した100万個のNK細胞を3週間生着させ、初期処置後90日間にわたって体重を追跡した。全ての群において、照射に起因する可能性が高い体重の初期減少があったものの、T r i K E 処置群と対照とでは有意な差は見られなかった。I L - 1 5 の低い毒性プロファイル及びB 7 - H 3 の安全性プロファイルを考えると、これは驚くべきことではない。インビトロデータは、c a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 T r i K E が様々な腫瘍に対してNK細胞を強力に活性化することができることを示すが、このT r i K E が前臨床モデルにおいて有効性を有するかどうかを評価するために、前述した卵巣がんの異種マウスモデルを使用した (図32A)。このモデルでは、ヒトNK細胞及びヒト高異型度漿液性 M A - 1 4 8 - l u c 細胞を、N S G マウスの腹腔に注射する。腫瘍進行の縦断的分析は、I L - 1 5 処理されたマウス又は腫瘍のみのマウスと比較した場合、c a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 処置されたマウスが、最も低い腫瘍進行を示したことを示した (図32B)。採取時 (21日目) に、c a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 処置マウスは、腫瘍のみの群よりも有意に低い腫瘍量を有した (図32C~32D)。この時点での腹膜洗浄液は、r h I L - 1 5 及びc a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 処置群において同様のヒトNK細胞数を示し、腫瘍コントロールの差異がNK細胞数の差異のみによるものではなかったことを示した (図32E)。c a m 1 6 1 5 B 7 - H 3 T r i K E の作用機構に関連して、T r i K E 処置マウスは、I L - 1 5 処置マウスよりも高いレベルのC D 1 6 発現を有するNK細胞を有した (図32F)。P D - 1 発現は、しばしば免疫細胞の消耗に関連しており、T r i K E 処置マウスにおいても、I L - 1 5 処置マウスと比較して、より低い (しかし有意でない) 発現傾向を有した。

【0191】

実施例 8

結論及び考察

固形腫瘍に対する理想的な標的免疫治療介入は、オンターゲットオフ腫瘍毒性が限られているか又は全くないことを伴って、様々な癌腫の広範な認識を有することである。B7-H3はこれらの特徴を示し、多くの腫瘍で高い発現を示し、正常組織では低い発現を示す。B7-H3に対する標的抗体ベースの療法が、現在、臨床において探索されている（NCT04185038、NCT02982941、NCT03406949、NCT03729596、NCT04077866、及びNCT02475213）。これまでの臨床試験における抗B7-H3抗体の安全性プロファイル及び有効性は両方とも良好であった。B7-H3を標的指向する放射性標識抗体は、少なくとも10年間安全に投与されている。この薬物は、小児の脳内で使用するのに十分安全であると考えられている。興味深いことに、B7-H3は血管系及び間質線維芽細胞において発現されることが報告されており、この抗原を使用して腫瘍の血管系及びアーキテクチャを標的にすることができることを示している。高いB7-H3発現と、より少ない腫瘍浸潤リンパ球、より速いがん進行、及び、膵臓導管腺癌（PDAC）、前立腺がん、卵巣がん、肺がん、及び淡明細胞型腎細胞癌などのいくつかのがんにおける不良な臨床転帰を含む、様々な腫瘍増殖パラメータとの間に、明確な相関が存在する。更に、この研究で試験されたほとんどの腫瘍株に対する低い天然細胞傷害性によって強調されているように、ほとんどのがんに対する天然細胞傷害性は、通常、内因性NK細胞ががんの進行を抑えるのに十分ではない。まとめると、これらの研究は、B7-H3を標的指向するための非常に説得力のある事例を作る。

10

20

【0192】

しかしながら、以前の治療アプローチのいずれも、最適なNK細胞免疫療法のための2つの重要な構成要素であるサイトカインシグナル伝達及びADCCを組み合わせていない。本明細書に記載のcam1615 B7-H3タンパク質は、その最適な組み合わせを使用する。我々のデータは、cam1615 B7-H3 TriKEが、NK細胞に特異的なIL-15シグナルを送達し、オフターゲット毒性を防止し、また、卵巣、前立腺、及び肺がんの状況で、様々な腺癌細胞株に対するADCCを媒介することを示す。この作用の二重機構は、増強されたNK細胞増殖、生存、及び標的活性化を可能にする。TriKEを、IL-15を欠く二重特異性キラーエンゲージャー（BiKE）と比較した我々の以前の研究では、TriKEのIL-15部分が、NK細胞の増殖、生存、STAT5シグナル伝達の増加、及びプライミングの強化を誘導することを示した。しかしながら、我々のインビトロ研究は、IL-15の等モル濃度での処置と比較して、本質的には最小限であるが、TriKEにより全体的なT細胞増殖のある程度の誘導を示すことに留意すべきである。これは、TriKEが単量体IL-15よりも、より特異性を誘導しているが、依然として低レベルでT細胞増殖をトリガーすることを示している。興味深いことに、全体的なT細胞増殖は、処置なしと比較して、TriKEによって増加するが、3回の分裂を超える増殖は実際に減少し、これらの2つの群を比較すると、培養の最後にT細胞数に差はない。より複雑なモデル及び患者における探索が、cam1615 B7-H3 TriKEの特異性を完全に概説し、T細胞及びより重要なT細胞毒性への影響を評価するために必要とされる。

30

40

【0193】

前臨床卵巣がんマウスモデルの結果は有望であり、処置された動物は安定状態を有していたが、このモデルにおいては処置は治療的ではなかった。これは、様々な要因に起因し得る。ヒトNK細胞ドナーは可変であり、誘導多能性幹細胞由来NK細胞（iNK）のようなNK細胞製品のブレイクスルーにより解決され得る問題である。また、TriKE分子は小さく、65 kDa未満のサイズであり、腎臓で迅速にクリアランスされ、最適以下の投薬になる。異なるドナーは、異なる速度でクリアランスする可能性がある。あるいは、IL-15によって媒介されるか、又は強いNK細胞活性化によって媒介されるか、のいずれかでのNK細胞枯渇は、オペラントであり得る。TriKEは、活性化のためにCD16を標的指向することに依存しているが、メタロプロテイナーゼADAM17によっ

50

て切断され得る。本発明者ら及び他の者は、卵巣がんの女性の腹水に由来するNK細胞における低レベルのCD16、及びMA-148異種マウスモデルがこの現象を模倣することを、以前に記載した。CD16切断は、ADAM17が活性化すること及びサイトカイン受容体の両方によって引き起こされ得るため、腫瘍自体又は炎症性腫瘍微小環境によるNK細胞の過剰活性化のいずれかによって媒介され得る。これは、NK細胞における減少したCD16発現が他の腫瘍状況で説明されているため、卵巣がん固有のものではない。CD16の下方制御は、全ての腫瘍状況で見られるわけではない可能性があるが、本発明者らの腹水データは、低CD16発現の状況では、TrIKEは、減少した様式ではあるが、依然として腫瘍殺傷を媒介することができることを示す。しかし、何年か臨床的に試験されているADAM17阻害剤、又は、最近記載され、現在臨床的に試験されている、切断不能なCD16受容体を有する細胞生成物生成物（NCT04023071）との組み合わせは、CD16が下方制御される状況におけるTrIKEの活性を大幅に改善するはずである。

10

【0194】

免疫療法モダリティの大部分は、チェックポイント遮断及びT細胞に焦点を当てているが、ナチュラルキラー細胞は、固形腫瘍に対する細胞ベースの治療の理想的な候補となる多くの特徴を有する。これらの研究は、広範ながんについてのNK細胞媒介性標的指向を促進するために、二重特異性抗体クロスリンカーとしてIL-15を組み込む固有の生物学的プラットフォーム技術に焦点を当てている。TrIKEは、機能的なNK細胞媒介殺傷、活性化、及び増殖を増強することを意図した抗原特異的シナプスを促進することによって、天然細胞傷害性の非特異的メカニズムを克服する。本研究に記載のTrIKE分子は、いくつかの固形腫瘍悪性腫瘍において過剰発現される、Igタンパク質のB7共刺激ファミリーのメンバーであるB7-H3を標的とする。B7-H3が、TrIKE分子のロバストな標的であり、卵巣がん、前立腺がん、及び肺がんのNK細胞インビトロでの殺傷を選択的に促進することが見出された。IL-15作用はNK細胞活性に著しく特異的であり、T細胞に対するオフターゲット効果はほとんどない。これは、TrIKEが固形腫瘍に対して作用し、それらの将来の臨床開発をサポートできるという概念を支持する、最初のインビボ異種移植データを提供する。

20

【0195】

配列：

30

40

50

配列番号 1 **B7-H3 TriKE (cam1615B7-H3) アミノ酸配列 (488残基)**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSSYNMGWFRQAPGQGLEAVASITWSGR
DTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAANPWPVAAPRSGTY
WGQGT LVT VSSPSGQAGAAASESLFVSNHAYNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLY
TESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGC
KECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTSEASGGPEDIVMTQSHKFMSTSIGARVSITC
KASQDVRTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA
EDLAVYYCQQH YGTPPWTFGGG TKLEIKEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCEASRFTF
SSYAMSWVRQTPEKRLEWVA AISGGGRYTYYPDSMKGRFTISRDN AKNFLYLQMSS
LRSEDTAMYYCARHYDGYLDYWGQGTTLTVSS

10

配列番号 2 **camCD16**

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFSSYNMGWFRQAPGQGLEAVASITWSGR
DTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAANPWPVAAPRSGTY
WGQGT LVT VSS

配列番号 3 **HMAリンカー**

PSGQAGAAASESLFVSNHAY

配列番号 4 **Wt IL-15**

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLELQVISLES GDAS
IHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGC KECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

20

配列番号 5 **リンカー**

EASGGPE

配列番号 6 **B7-H3 scFv 軽鎖**

DIVMTQSHKFMSTSIGARVSITCKASQDVRTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTG
VPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQH YGTPPWTFGGG TKLEIK

30

配列番号 7 **B7-H3 scFv 重鎖**

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCEASRFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVA AISGGGR
YTYYPDSMKGRFTISRDN AKNFLYLQMSSLRSEDTAMYYCARHYDGYLDYWGQGT
TLTVSS

配列番号 8 **5' → 3' B7-H3 TriKE (cam1615B7-H3) DNA 配列 (1,464残基)**

cagggtgcagctgggtggagctctgggggaggcttggtgcagcctgggggctctctgagactctctgtgcagcctctggcctcaccttca
gtagctataacatgggctggtccgccaggctccagggaaggccttgaggctgtagcatctattacctggagtggtcgggacacattc
tatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaactccaagaacactctctatctgcaaatgaacagcctgcgcgcgg

40

aggacacggccgtttattattgtgctgcaaaccctggccagtgggcgccacgtagtggcacctactggggccaaggaccctgg
tcaccgtctcctaccgtctggctcaggctgggtgctgctgtagcgaatctctgtctgttctaaccacgcttacaactgggtgaatgtataa
agtgtattgaaaaaattgaagatcttattcaatctatgcatattgatgctactttatatacggaaagtgtgtcaccacagttgcaaagtaa
cagcaatgaagtgctttcttggagttacaagttattcacttgagtcggagatgcaagtattcatgatacagtagaaaaatctgatcatcc
tagcaaacacagtttgtcttcaatgggaatgtaacagaatctggatgcaaagaatgtgaggaaactggaggaaaaaatattaaagaa
ttttgacagagtttgtacatattgtccaaatgttcatcaacacttctgaagcttccggagggtcccaggatattgtatgaccagagccat
aaatttatgagcaccagcattggcgcgcgctgagcattacctgcaaagcgagccaggtatgtgcaccgcggtggcgtggtatcag
cagaaaccgggcccagagcccgaactgctgattatagcgcgagctatcgctataccggcggtgcccgatcgctttaccggcagcggc
agcggcaccgattttacctttaccattagcagcgtgagcggaagatctggcgggtgtattattgcccagcagcattatggcaccgccg
gtggaccttggcgcgccgaccaaactggaaattaaagaagtgcagctgggtgaaagcgcgcgccctggtgaaaccggcgcg
cagcctgaaactgagctgcgaagcgagccgctttaccttttagcagctatgcgatgagctgggtgcccagaccccggaaaaacgct
ggaaatgggtggcgcgctattagcggcgcgccgctatactattatccgatagcatgaaaggccgctttaccattagccgcgataa
cgcgaaaaactttctgtatctgcagatgagcagcctgcgcagcgaagataccgcgatgtattattgcgcgccattatgatggctatct
ggattattggggccagggcaccacctgaccgtgagcagc

10

配列番号 9**camCD16**

cagggtgcagctgggtggagctctgggggaggcttgggtgcagcctgggggctctctgagactctctgtgcagcctctggcctcaccttca
gtagctataacatgggctgttccgcccaggtctcaggcgcaaggccttgaggctgtagcatctattacctggagtggtcgggacacattc
tatgacagactccgtgaaggcgccgattcaccatctccagagacaactccaagaacactctctatctgcaaatgaacagcctgcgcgcg
aggacacggccgtttattattgtgctgcaaaccctggccagtgggcgccgacgtagtggcacctactggggccaaggaccctgg
tcaccgtctcctca

20

配列番号 10**HMAリンカー**

ccgtctggtcaggctgggtgctgctgctagcgaatctctgttcttctaaccacgcttac

配列番号 11**wtIL-15**

aaactgggtgaatgtaataagtgatttgaaaaaaattgaagatcttattcaatctatgcatattgatgctactttatatacggaaagtgtgtc
acccacgttgcгааagtaacagcaatgaagtgctttcttggagttacaagttattcacttgagtcggagatgcaagtattcatgataca
gtagaaaaatctgatcatcctagcaaacacagtttgtcttcaatgggaatgtaacagaatctggatgcaaagaatgtgaggaaactggag
gaaaaaatattaaagaattttgacagagttttgtacatattgtccaaatgttcatcaacacttct

配列番号 12**リンカー**

gaagcttccggagggtcccag

30

配列番号 13**B7-H3 scFv 軽鎖**

gatattgtgatgaccagagccataaatttatgagcaccagcattggcgcgcgctgagcattacctgcaaagcgagccaggatgtgc
gcaccgcgggtggcggtggtatcagcagaaaccgggcccagagccgaaactgctgatttatagcgcgagctatcgctataccggcggtg
ccggtatcgctttaccggcagcggcagcgccgacggatattacctttaccattagcagcgtgcaggcggaagatctggcgggtgtattattg
ccagcagcattatggcaccgcccggtggacctttggcgcgccgaccaaactggaaattaaa

配列番号 14**B7-H3 scFv 重鎖**

gaagtgcagctgggtgaaagcgggcgccgctgggtgaaaccggcgccgagcctgaaactgagctgcgaagcgagccgctttacct
ttagcagctatgcgatgagctgggtgcccagaccccggaaaaacgctggaatgggtggcgccgattagcggcgccgcccgtta

40

tacattatccgtagcatgaaagccgctttaccattagccgcgataacgcgaaaaactttctgtatctgcagatgagcagcctgcg
cagcgaagataccgcgatgtattatgcgcgcgcattatgatggctatctggattattggggccagggcaccaccctgaccgtgagc
agc

配列番号 15**Linkseq16リンカー**

SGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG

配列番号 16**哺乳動物リンカー**

GSTSGSGKPGSGEGSTKG

10

配列番号 17**IL-15 N72D 変異**

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDAS
IHDTVENLIILANDSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

配列番号 18**IL-15 N72A 変異**

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLELQVISLES GDAS
IHDTVENLIILANASLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS

配列番号 19**ヒト CD16 アミノ酸**

20

MEVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWN
GGSTGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSLLFDYWGQ
GTLVTVSRGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASW
YQQKPGQAPVPLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSRDS
SGNHVVFGGGTKLTVL

配列番号 20**ヒト CD16 DNA**

30

atggaagtgcagctgggtgaaagcggcgccggcggtggtgcgcccggcgcgagcctgcgcctgagctgcgcggcgagcggcttt
acctttgatgattatggcatgagctgggtgcgcagggcgccgggcaaaaggcctggaatgggtgagcggcattaactggaacggcgg
cagcaccggctatgcgtagcgtgaaaggcgcgtttaccattagccgcgataacgcgaaaaacagcctgtatctgcagatgaacag
cctgcgcgcggaagataccgcggtgtattatgcgcgcgcggccgcagcctgctgtttgattattggggccagggcaccctggtgac
cgtgagccgcggcgggcgggcagcggcgggcgggcgagcggcgggcgggcagcagcgaactgaccaggatccggcggt
gagcgtggcgctgggcccagaccgtgcgcattacctgccagggcgatagcctgcgcagctattatgcgagctggtatcagcagaac
cgggccaggcgccggtgctggtgatattggcaaaaacaaccgccgagcggcattccggatcgcttttagcggcagcagcagcgg
caacaccgcgagcctgaccattaccggcgcgagcgcggaagatgaagcggattattatgcaacagccgcgatagcagcggcaac
catgtggtgtttggcgggcgaccaaactgaccgtgctg

配列番号 21**HLE 配列 1**

40

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNATKPCCEEQYNSYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD

TLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYDGVVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMKQNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

配列番号 22HLE配列 2

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYR
CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号 23HLE配列 3

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

20

配列番号 24HLE配列 4

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YDTTPVLDSGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

配列番号 25HLE配列 5

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR
CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

配列番号 26Fc領域 1

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE

40

TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

配列番号 27

Fc領域 2

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWY
DGVVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

10

配列番号 28

Fc領域 3

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

配列番号 29

Fc領域 4

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPCEEQYNSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

20

配列番号 30

Fc領域 5

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLKSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

配列番号 31

Fc領域 6

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YDTPPVLDSDGDSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

30

配列番号 32

Fc領域 7

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCWVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

40

50

配列番号 33

Fc 領域 8

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

配列番号 34

scFcリンカー 1

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

10

配列番号 35

scFcリンカー 2

SSGGGGSGGGGSGGGGS

配列番号 36

20個のアミノ酸セグメント

PSGQAGAAASESLFVSNHAY

配列番号 37

7個のアミノ酸リンカー

EASGGPE

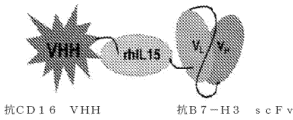
20

【 0 1 9 6 】

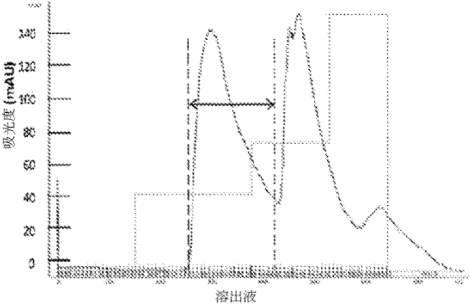
本発明は、上記の実施例を参照して記載されているが、当然のことながら、変更及び変形は、本発明の趣旨及び範囲内に包含される。したがって、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。

【 図 面 】

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】

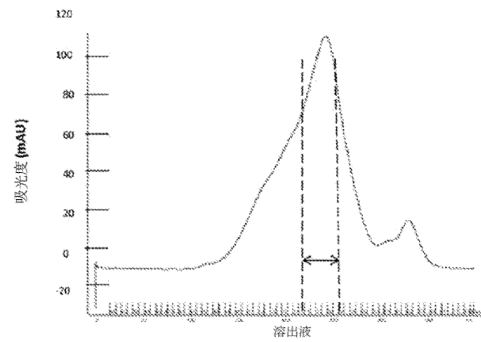


30

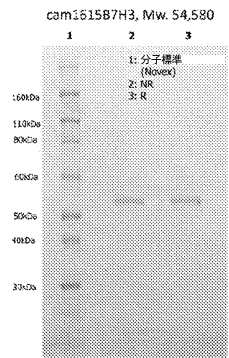
40

50

【図 1 C】

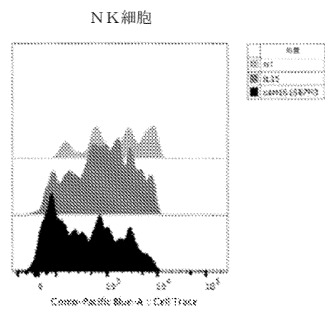


【図 1 D】

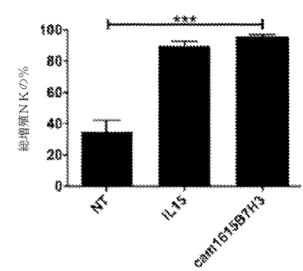


10

【図 2 A】

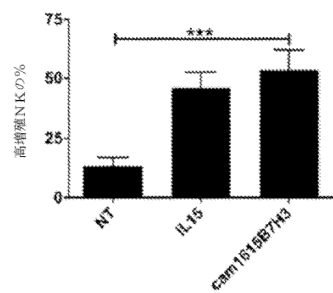


【図 2 B】

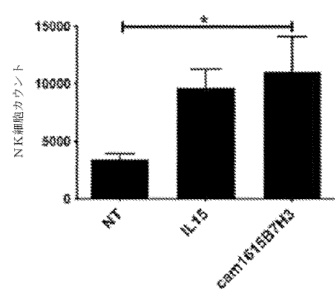


20

【図 2 C】



【図 2 D】

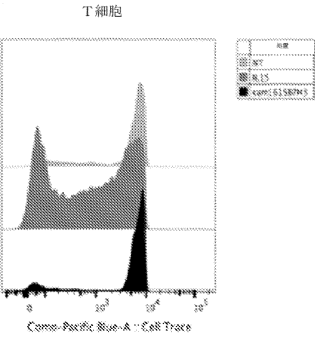


30

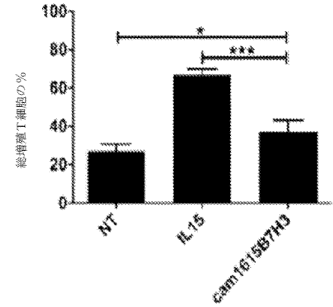
40

50

【図 2 E】

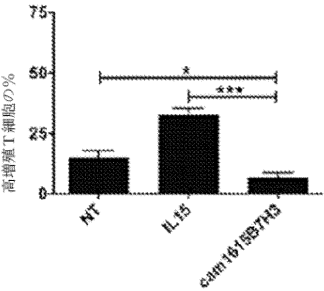


【図 2 F】

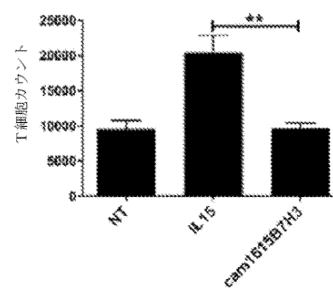


10

【図 2 G】

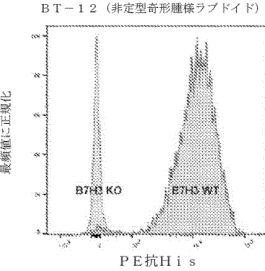


【図 2 H】

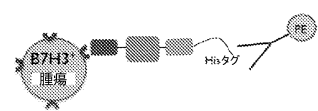


20

【図 3 A】



【図 3 B】

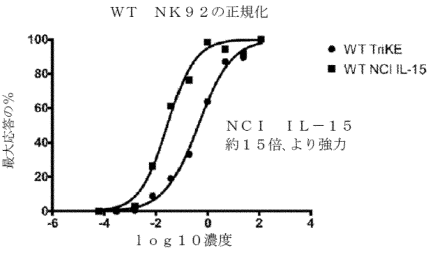


30

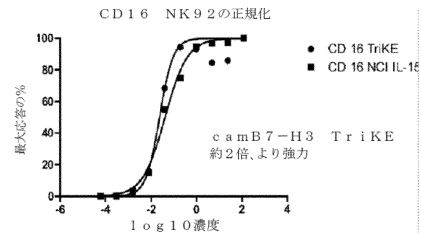
40

50

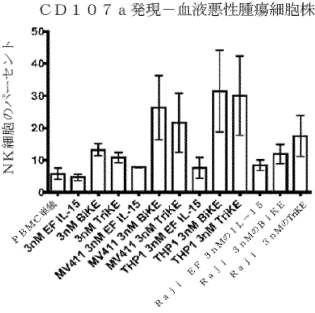
【図 4 A】



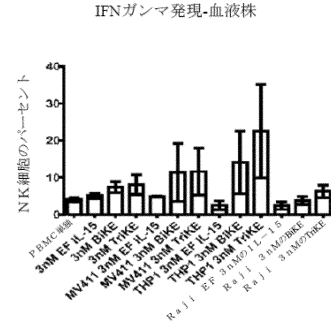
【図 4 B】



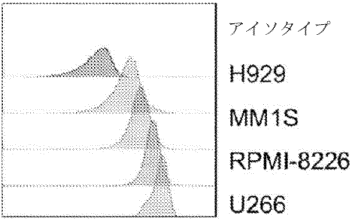
【図 5 A】



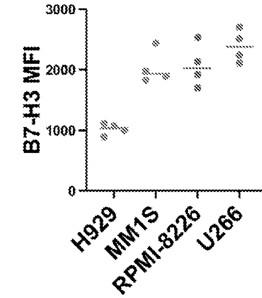
【図 5 B】



【図 6 A】



【図 6 B】



10

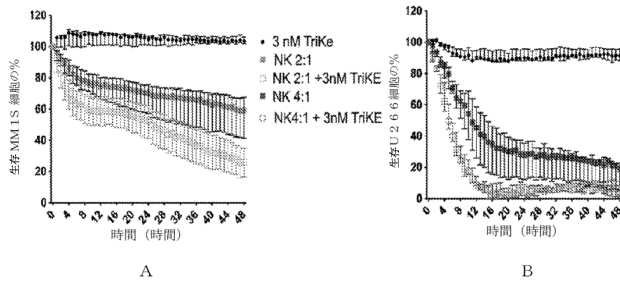
20

30

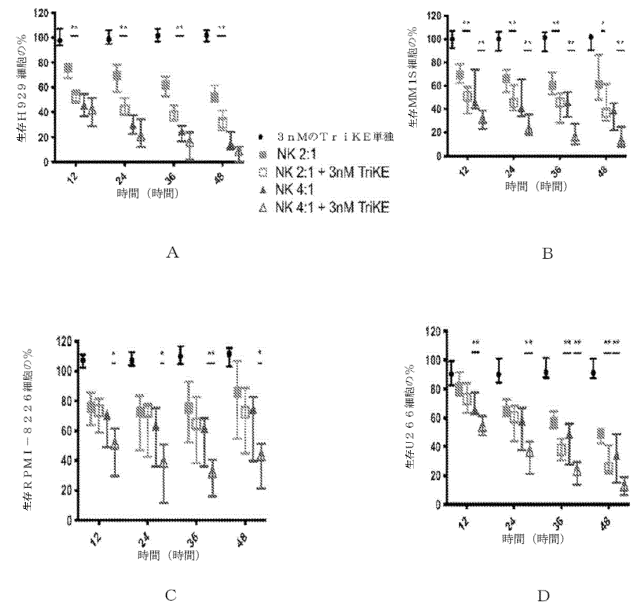
40

50

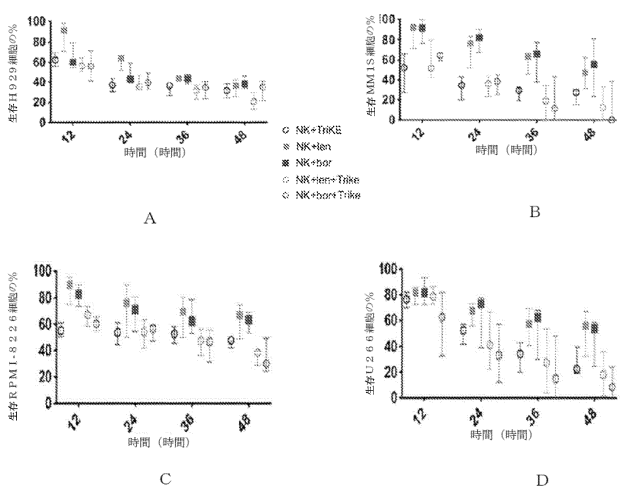
【図 7】



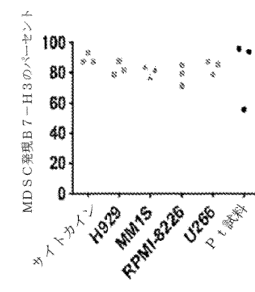
【図 8】



【図 9】



【図 10 A】



10

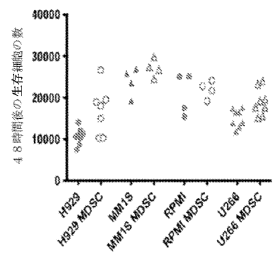
20

30

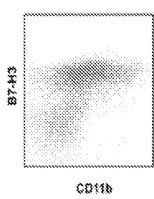
40

50

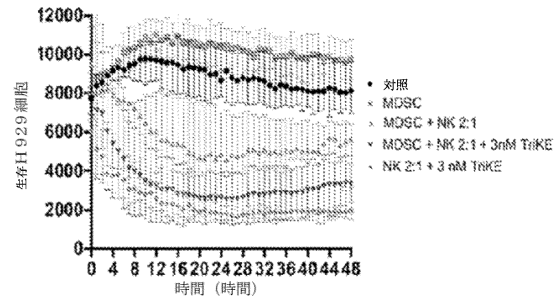
【図 10 B】



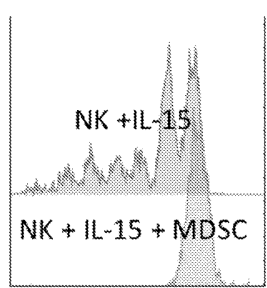
【図 10 C】



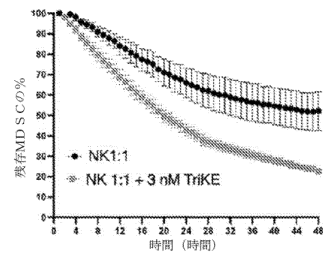
【図 10 D】



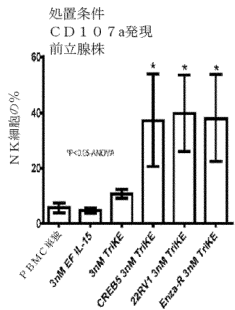
【図 11 A】



【図 11 B】



【図 12 A】



10

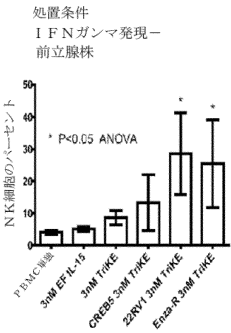
20

30

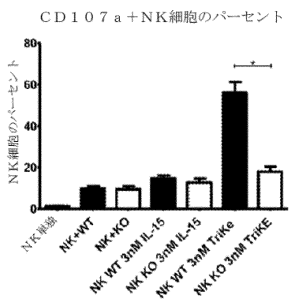
40

50

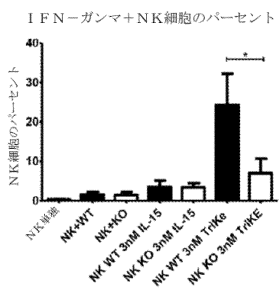
【図 1 2 B】



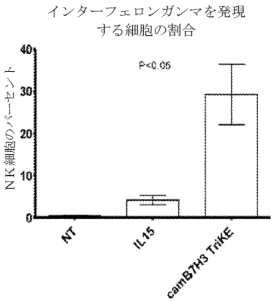
【図 1 2 C】



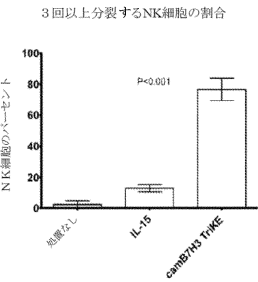
【図 1 2 D】



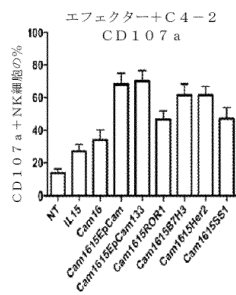
【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 1 4 A】



10

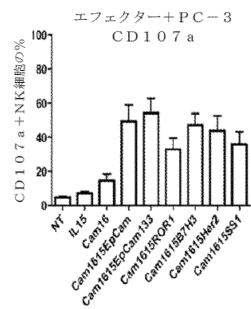
20

30

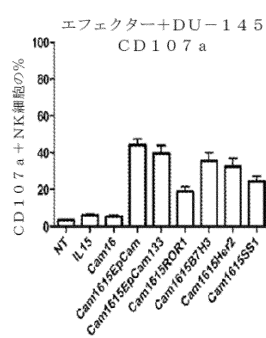
40

50

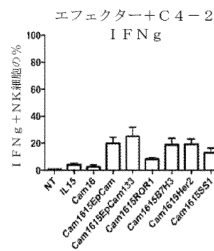
【図 1 4 B】



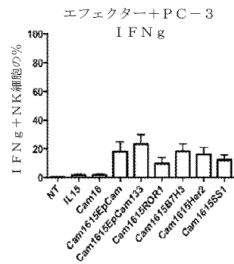
【図 1 4 C】



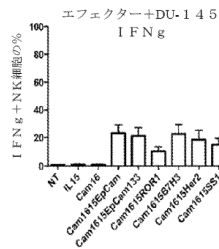
【図 1 4 D】



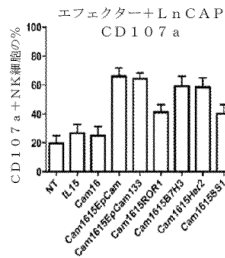
【図 1 4 E】



【図 1 4 F】



【図 1 4 G】



10

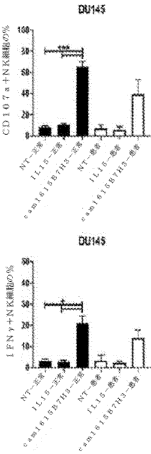
20

30

40

50

【図 15 B】



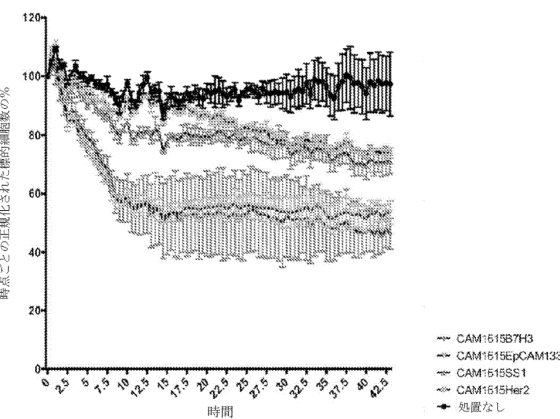
【図 15 C】



【図 15 D】



【図 16】



10

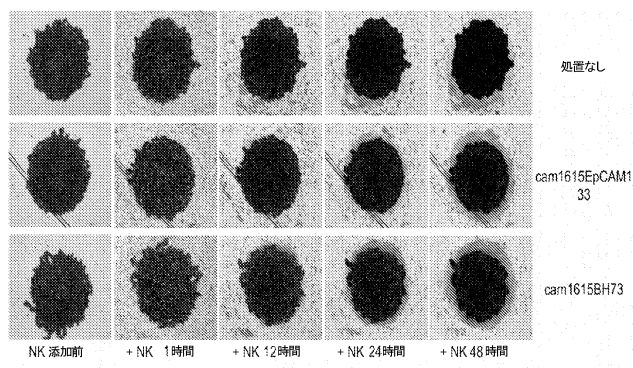
20

30

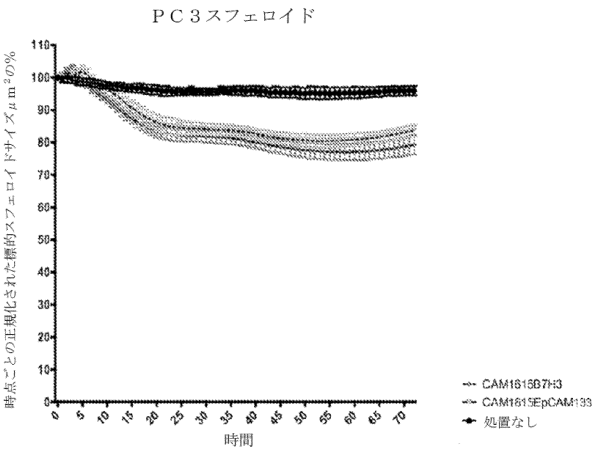
40

50

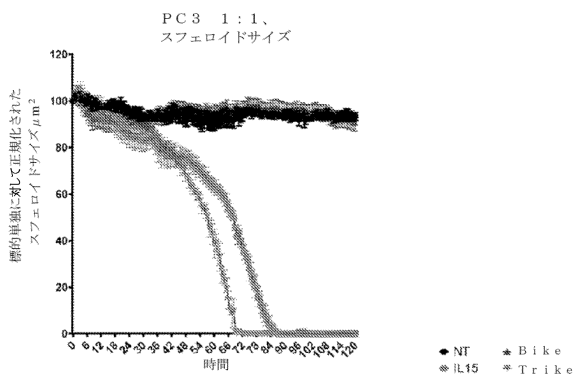
【図 17】



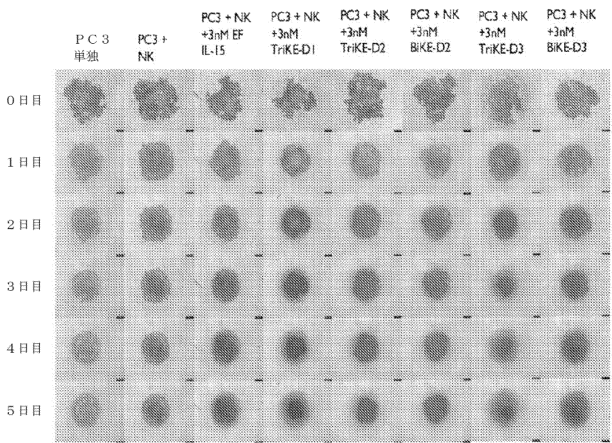
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

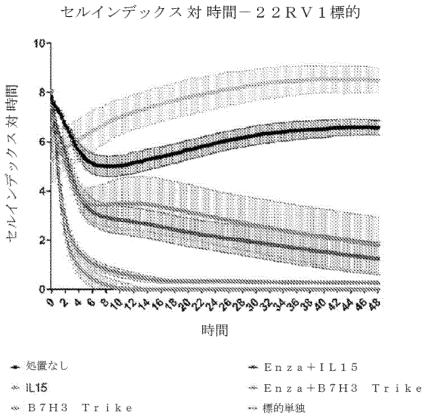
20

30

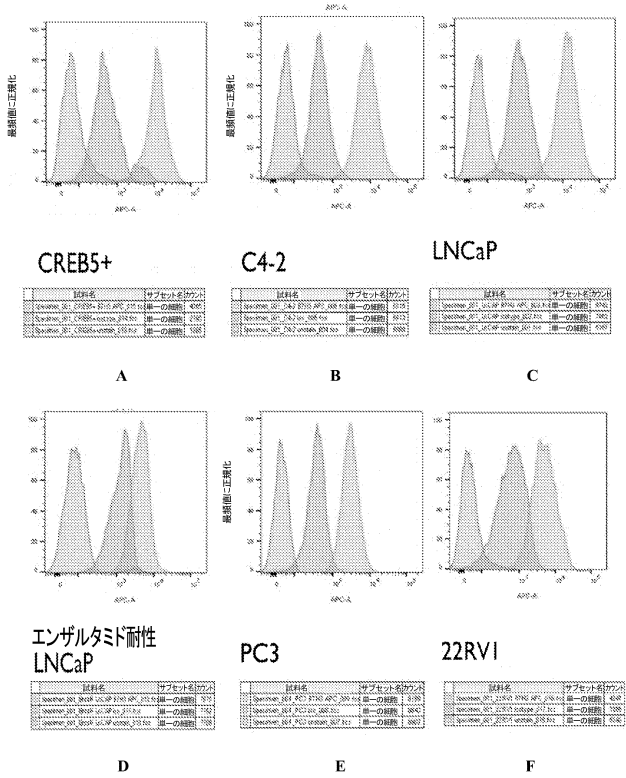
40

50

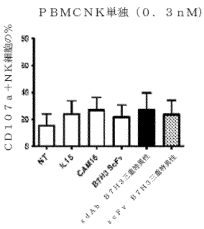
【図 2 1】



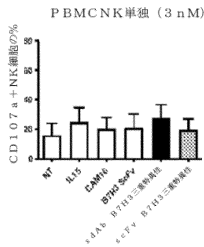
【図 2 2】



【図 2 3 A】



【図 2 3 B】



10

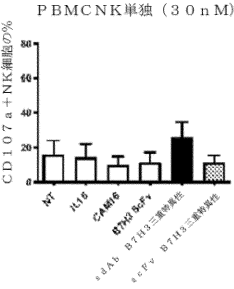
20

30

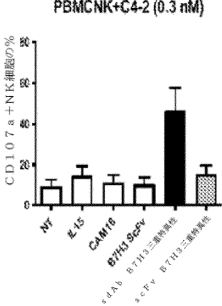
40

50

【図 2 3 C】

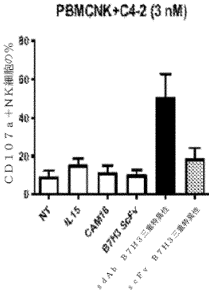


【図 2 3 D】

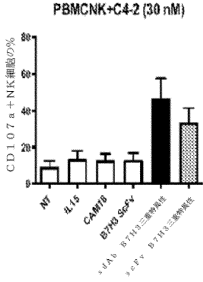


10

【図 2 3 E】

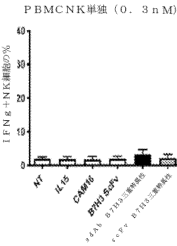


【図 2 3 F】

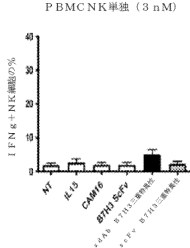


20

【図 2 3 G】



【図 2 3 H】

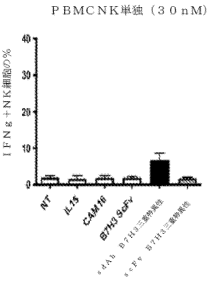


30

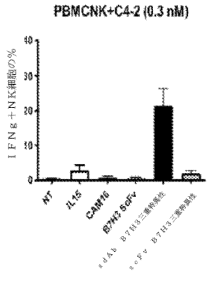
40

50

【図 2 3 I】

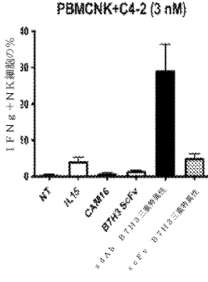


【図 2 3 J】

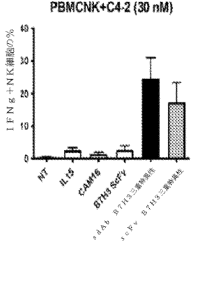


10

【図 2 3 K】

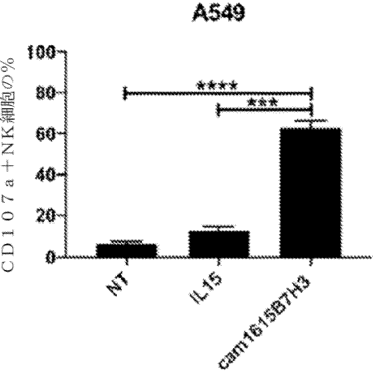


【図 2 3 L】

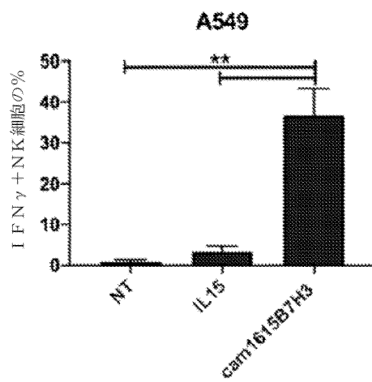


20

【図 2 4 A】



【図 2 4 B】

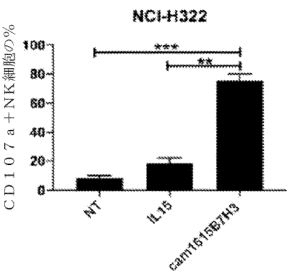


30

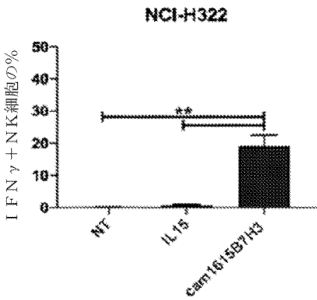
40

50

【図 2 4 C】

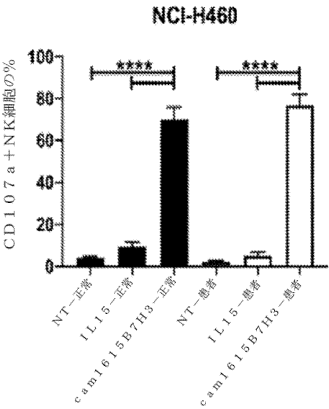


【図 2 4 D】

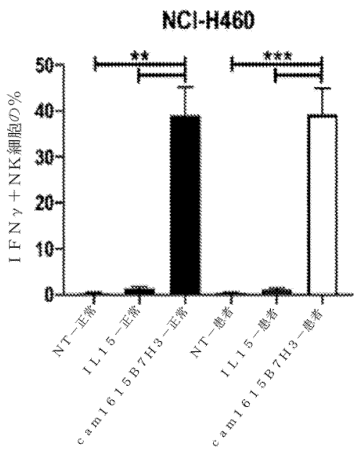


10

【図 2 4 E】

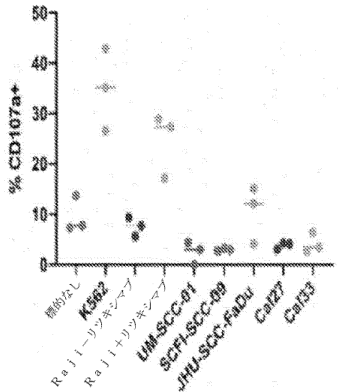


【図 2 4 F】

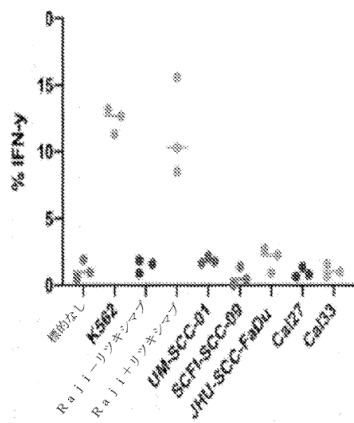


20

【図 2 5 A】



【図 2 5 B】

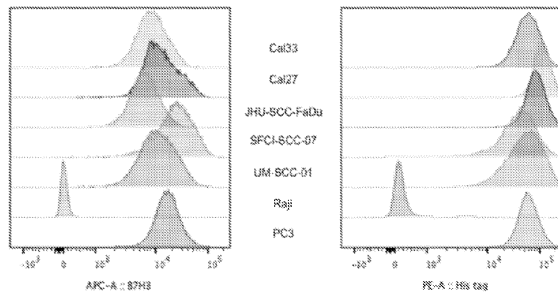


30

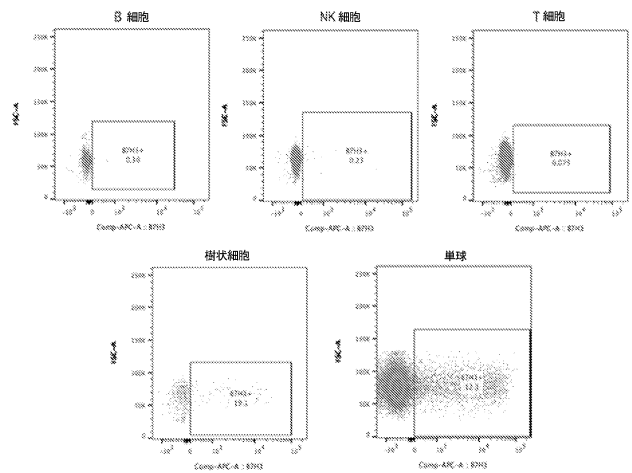
40

50

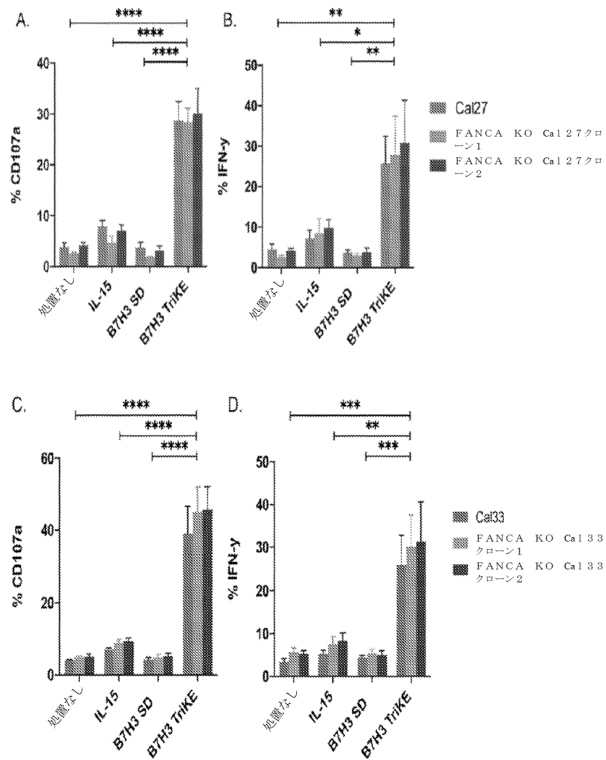
【図 26 A】



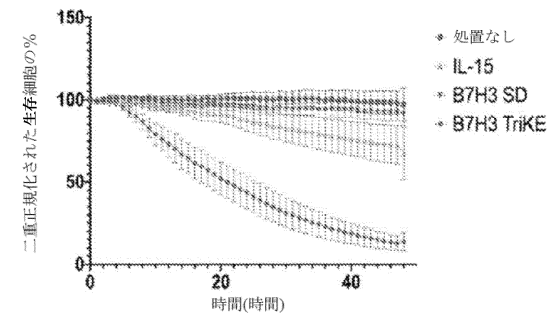
【圖 2 6 B】



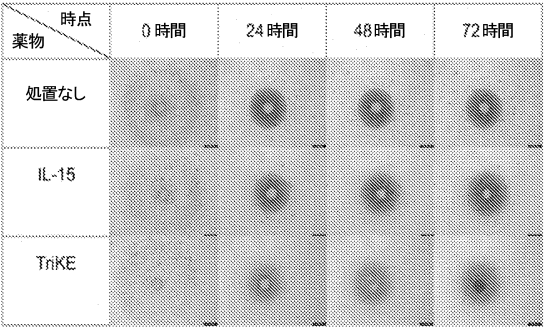
【図 27】



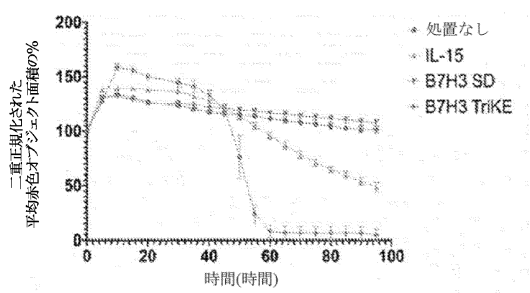
【図 28 A】



【図 2 8 B】

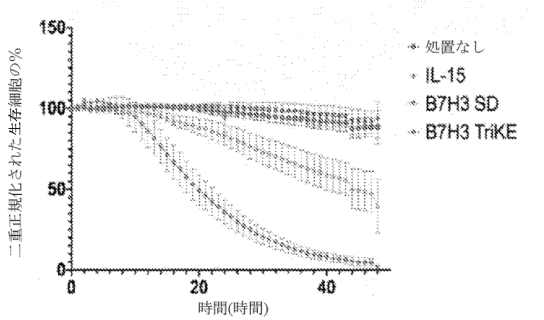


【図 2 8 C】

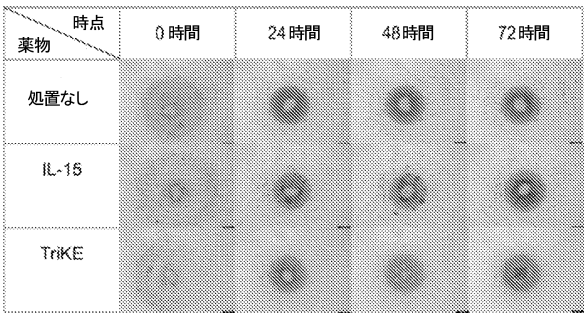


10

【図 2 8 D】

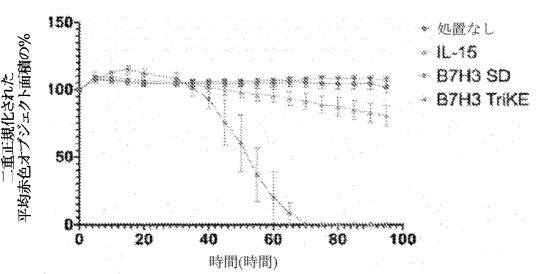


【図 2 8 E】

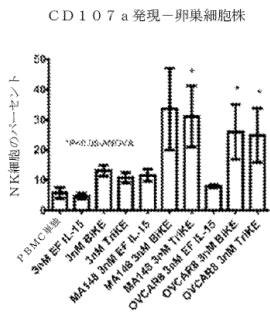


20

【図 2 8 F】



【図 2 9 A】

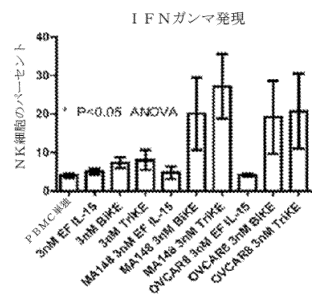


30

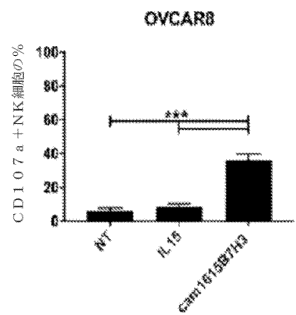
40

50

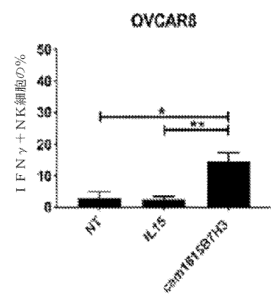
【図 29 B】



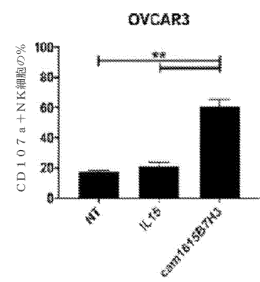
【図 30 A】



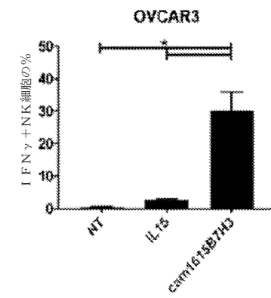
【図 30 B】



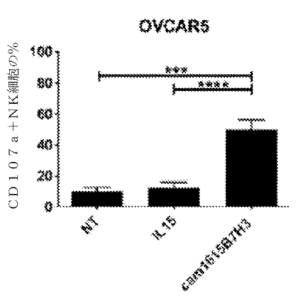
【図 30 C】



【図 30 D】



【図 30 E】



10

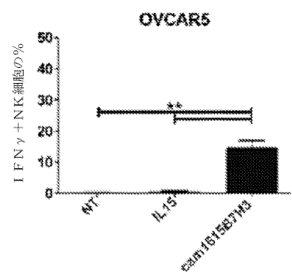
20

30

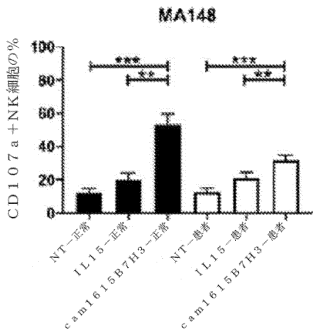
40

50

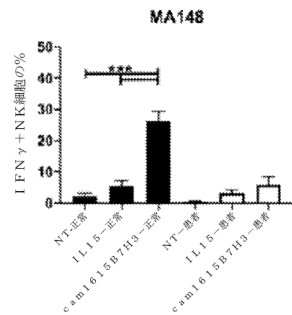
【図 3 0 F】



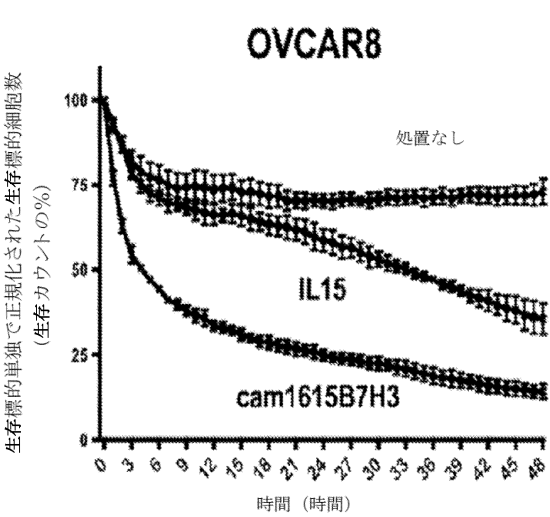
【図 3 0 G】



【図 3 0 H】



【図 3 0 I】



10

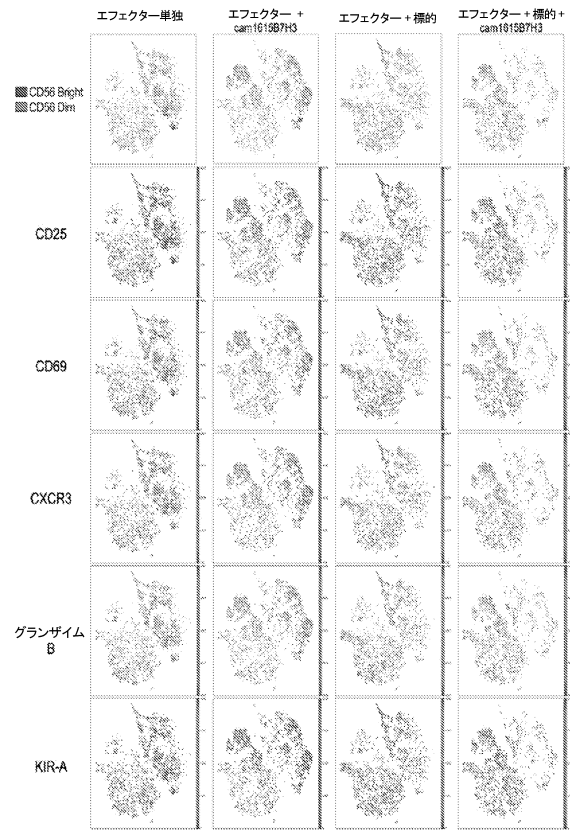
20

30

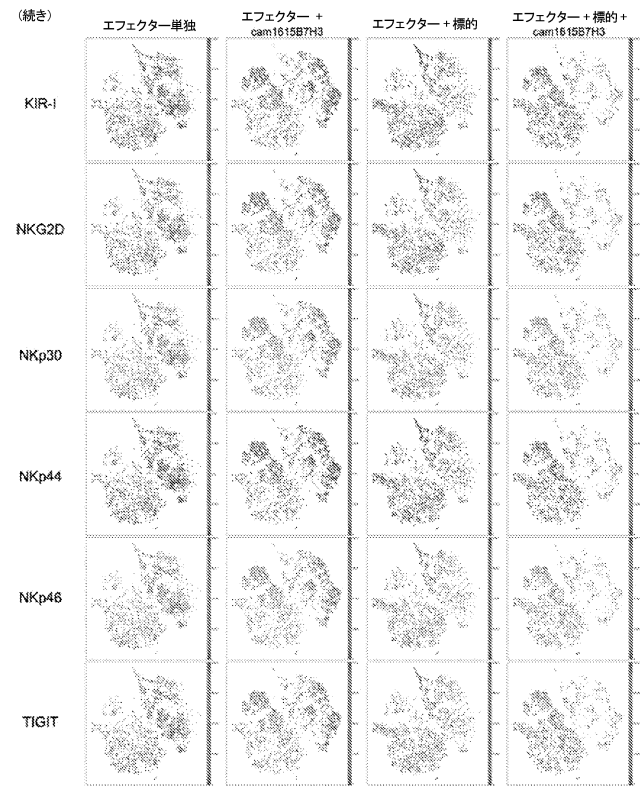
40

50

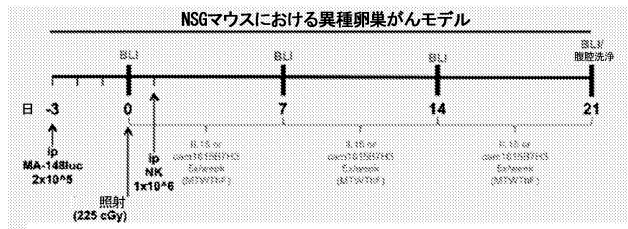
【図 3 1 - 1】



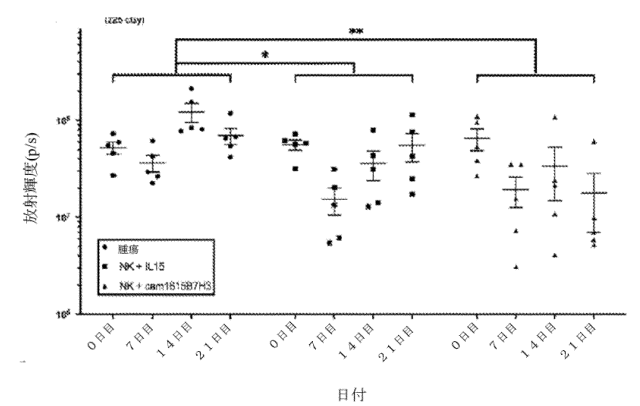
【図 3 1 - 2】



【図 3 2 A】



【図 3 2 B】



10

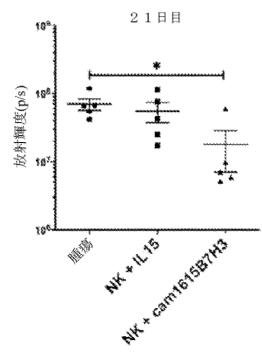
20

30

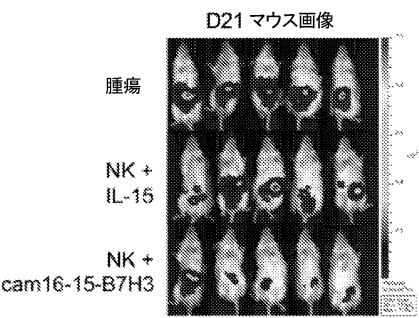
40

50

【図 3 2 C】

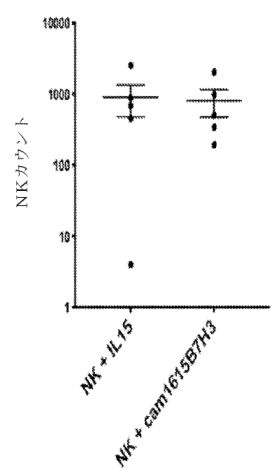


【図 3 2 D】

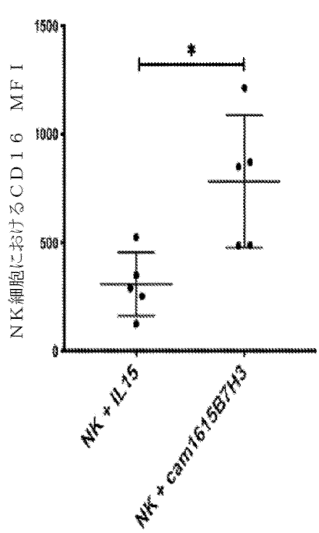


10

【図 3 2 E】



【図 3 2 F】



20

【配列表】

2024536791000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 22/43708
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. A61K 39/395, A61P 35/00, C07K 14/00 (2022.01) ADD. CPC - INV. A61K 39/39558, A61K 39/39541, A61P 35/00, C07K 14/00 ADD. C07K 2319/30, C07K 2319/33, C07K 2319/74 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.
A	US 2018/0162938 A1 (ICELL GENE THERAPEUTICS LLC) 14 June 2018 (14.06.2018); especially para [0334]; SEQ ID NO: 20	1-3
A	US 2019/0194802 A1 (GLORIANA THERAPEUTICS SARI) 27 June 2019 (27.06.2019); especially para [0033]; SEQ ID NO: 11	1-3
A	US 2017/0051044 A1 (IMAGINAB, INC.) 23 February 2017 (23.02.2017); especially SEQ ID NO: 162	1-3
☐ 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 "I" 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 5 January 2023		Date of mailing of the international search report FEB 01 2023
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 Karl Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
	International application No. PCT/US 22/43708
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. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 22/43708
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	☐	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	☐	Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
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.		
Continued on Supplemental Page		
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. 1-3, limited to SEQ ID NO: 13
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.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/43708

Continued on Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group I+: Claims 1-3, directed to an isolated nucleic acid sequence. The isolated nucleic acid sequence will be searched to the extent that the nucleic acid sequence encompasses SEQ ID NO: 13. The first named invention was determined based on the first SEQ ID NO. listed in claim 1. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-3 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 13. Additional sequences will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected sequences. 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 SEQ ID NO: 14 (claims 1-3).

Group II+: Claims 4-18, 21-26, directed to a fusion protein, a nucleic acid encoding a fusion protein, or a pharmaceutical composition comprising a fusion protein. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The fusion protein or nucleic acid encoding a fusion protein may be searched for an additional fee and election as such, for example, to the extent that the fusion protein encompasses SEQ ID NO: 1, comprising, in order, SEQ ID NOs: 2-7, and a half-life extending molecule is a Fc or a scFc antibody fragment comprising SEQ ID NO: 21 (claims 4-6, 7-13, 17-18(In-part)). Additional sequences will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected sequences. 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. Another exemplary election would be where the fusion protein comprises, in order, SEQ ID NOs: 7 and 6 (claims 4, 6, 8-13, 17(In-part)).

Group III: Claims 19-20, 27-38, directed to a method of treating cancer comprising administering a fusion protein.

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

Groups I+ requires an isolated nucleic acid sequence encoding a peptide, not required by Groups II+ or III.

Additionally, the inventions of Group I+ each include the special technical feature of a unique nucleic acid sequence. Each nucleic acid sequence comprises a unique molecule, and is considered a distinct technical feature.

Groups II+ requires composition of matter comprising or consisting of a fusion peptide, not required by Groups I+ or III.

No technical features are shared between the fusion peptides of Groups II+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

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

Group III requires a method for treating cancer comprising administering a fusion protein, not required by Groups I+ or II.

Common Technical Features

The feature shared by Groups I+ is an isolated nucleic acid sequence encoding a peptide.

Additionally, the feature shared by II+ and III is a fusion peptide.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2019/0314411 A1 to Innovative Cellular Therapeutics Co., Ltd (hereinafter "ICTCL").

ICTCL discloses a fusion peptide (abstract - "compositions and methods for enhancing T cell response and/or CAR cell expansion and/or maintenance in vivo and/or in vitro. For example, a method of enhancing T cell-based therapy comprises administering genetically modified T cells comprising a first chimeric antigen receptor (CAR) and a second CAR"; para [0126] - "In embodiments, the domains of the CAR are on the same polypeptide chain, for example a chimeric fusion protein."; para [0245] - "Table 4 shows various polypeptide domains and nucleic acid constructs and their Sequence Identifiers (SEQ ID NO). As examples, CD19 refers to CD19 CAR, which is a CAR containing an antigen binding domain that binds CD19"; Table 4, pg 41 - "Name... B7-H3 scFv 1... SEQ ID No... 434"; Note, fusion proteins of the instant application specifically include B7-H3 targeting fusion peptides, see instant specification para [0009]-[0012]; Figure 1A), and a nucleic acid encoding a peptide (para [0009] - "The present disclosure also describes one or more nucleic acids encoding a first CAR molecule and a second CAR molecule or a TCR.", used in a method of treating cancer (para [0018] - "a method of treating a patient having tumor with a mixed population of modified cells described herein.").

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.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
	A 6 1 K 39/395 T	

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,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
M,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY
,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

	弁理士 井上 隆一
(74)代理人	100148699
	弁理士 佐藤 利光
(74)代理人	100188433
	弁理士 梅村 幸輔
(74)代理人	100128048
	弁理士 新見 浩一
(74)代理人	100129506
	弁理士 小林 智彦
(74)代理人	100114340
	弁理士 大関 雅人
(74)代理人	100214396
	弁理士 塩田 真紀
(74)代理人	100121072
	弁理士 川本 和弥
(74)代理人	100221741
	弁理士 酒井 直子
(74)代理人	100114926
	弁理士 枝松 義恵
(72)発明者	シュローダー マーティン
	アメリカ合衆国 9 4 0 0 5 カリフォルニア州 ブリスベン マリーナ ブールバード 8 0 0 0 ス イト 1 0 0 ジーティー バイオフィーマ インコーポレイテッド内
F ターム (参考)	4C085 AA16 BB01 CC23 DD62
	4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74