

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7685821号

(P7685821)

(45)発行日 令和7年5月30日(2025.5.30)

(24)登録日 令和7年5月22日(2025.5.22)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

E

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

T

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

請求項の数 25 (全77頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-544919(P2019-544919)

(86)(22)出願日 平成30年2月20日(2018.2.20)

(65)公表番号 特表2020-508997(P2020-508997
A)

(43)公表日 令和2年3月26日(2020.3.26)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/018771

(87)国際公開番号 WO2018/152518

(87)国際公開日 平成30年8月23日(2018.8.23)

審査請求日 令和3年2月19日(2021.2.19)

審査番号 不服2023-30(P2023-30/J1)

審査請求日 令和5年1月4日(2023.1.4)

(31)優先権主張番号 62/461,146

(32)優先日 平成29年2月20日(2017.2.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 519288755

ドラゴンフライ セラピューティクス,
インコーポレイテッド
アメリカ合衆国02451マサチューセ
ッツ州ウォルサム、サード・アベニュー
180、シックス・フロア

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 Her 2、NK G 2 DおよびCD 1 6 に結合するタンパク質

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) NK G 2 D に結合する第 1 の抗原結合部位と、

(b) H E R 2 に結合する第 2 の抗原結合部位と、

(c) 一緒になって C D 1 6 に結合するに十分な、ヒト I g G 1 の第 1 の抗体 F c ドメインもしくはその一部分およびヒト I g G 1 の第 2 の抗体 F c ドメインまたはその一部分であって、前記第 1 の抗体 F c ドメインまたはその一部分および前記第 2 の抗体 F c ドメインまたはその一部分が、異なるアミノ酸変異を含み、ヘテロ二量化を促進する、ヒト I g G 1 の第 1 の抗体 F c ドメインもしくはその一部分およびヒト I g G 1 の第 2 の抗体 F c ドメインまたはその一部分と

を含むタンパク質。

【請求項 2】

前記第 1 の抗原結合部位が、ヒトおよび非ヒト霊長類の NK G 2 D に結合する、請求項 1 に記載のタンパク質。

【請求項 3】

前記第 1 の抗原結合部位が、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質。

【請求項 4】

前記重鎖可変ドメインおよび前記軽鎖可変ドメインが、同じポリペプチド上に存在する、請求項 3 に記載のタンパク質。

【請求項 5】

前記第 2 の抗原結合部位が、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、請求項 3 または 4 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 6】

前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインおよび前記軽鎖可変ドメインが、同じポリペプチド上に存在する、請求項 5 に記載のタンパク質。

【請求項 7】

前記第 1 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する、請求項 5 または 6 に記載のタンパク質。

【請求項 8】

前記第 1 の抗原結合部位が、

(a) 配列番号 102 と少なくとも 90% 同一の重鎖可変ドメインアミノ酸配列および配列番号 103 と少なくとも 90% 同一の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列であって、該重鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 104 の重鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 105 の重鎖 CDR2 アミノ酸配列、配列番号 106 の重鎖 CDR3 アミノ酸配列を含み、該軽鎖可変ドメインアミノ酸配列が配列番号 107 の軽鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 108 の軽鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 109 の軽鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメインアミノ酸配列および軽鎖可変ドメインアミノ酸配列；

(b) 配列番号 41 と少なくとも 90% 同一の重鎖可変ドメインアミノ酸配列および配列番号 42 と少なくとも 90% 同一の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列であって、該重鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 65 の重鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 66 の重鎖 CDR2 アミノ酸配列、配列番号 67 の重鎖 CDR3 アミノ酸配列を含み、該軽鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 68 の軽鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 69 の軽鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 70 の軽鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメインアミノ酸配列および軽鎖可変ドメインアミノ酸配列；

(c) 配列番号 43 と少なくとも 90% 同一の重鎖可変ドメインアミノ酸配列および配列番号 44 と少なくとも 90% 同一の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列であって、該重鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 71 の重鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 72 の重鎖 CDR2 アミノ酸配列、配列番号 73 の重鎖 CDR3 アミノ酸配列を含み、該軽鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 74 の軽鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 75 の軽鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 76 の軽鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメインアミノ酸配列および軽鎖可変ドメインアミノ酸配列；

(d) 配列番号 45 の重鎖可変ドメインアミノ酸配列および配列番号 46 の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列；

(e) 配列番号 47 の重鎖可変ドメインアミノ酸配列および配列番号 48 の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列；

(f) 配列番号 94 と少なくとも 90% 同一の重鎖可変ドメインアミノ酸配列および配列番号 95 と少なくとも 90% 同一の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列であって、該重鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 96 の重鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 97 の重鎖 CDR2 アミノ酸配列、配列番号 98 の重鎖 CDR3 アミノ酸配列を含み、該軽鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 99 の軽鎖 CDR1 アミノ酸配列、100 の軽鎖 CDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 101 の軽鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメインアミノ酸配列および軽鎖可変ドメインアミノ酸配列；または

(g) 配列番号 1 と少なくとも 90% 同一である重鎖可変ドメインアミノ酸配列であって、重鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 62 の重鎖 CDR1 アミノ酸配列、配列番号 63 の重鎖 CDR2 アミノ酸配列、配列番号 64 の重鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメインアミノ酸配列

を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 9】

10

20

30

40

50

前記第 1 の抗原結合部位が、

(a) 配列番号 1 0 4 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 1 0 5 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列；

配列番号 1 0 6 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列；

配列番号 1 0 7 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 1 0 8 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列；および

配列番号 1 0 9 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列；

(b) 配列番号 6 5 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 6 6 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列；

配列番号 6 7 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列；

配列番号 6 8 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 6 9 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列；および

配列番号 7 0 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列；

(c) 配列番号 7 1 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 7 2 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列；

配列番号 7 3 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列；

配列番号 7 4 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 7 5 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列；および

配列番号 7 6 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列；または

(d) 配列番号 9 6 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 9 7 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列；

配列番号 9 8 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列；

配列番号 9 9 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 1 0 0 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列；および

配列番号 1 0 1 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列；または

(e) 配列番号 6 2 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 6 3 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列；および

配列番号 6 4 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列

を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 1 0】

前記第 1 の抗原結合部位が、単一ドメイン抗体である、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質。

【請求項 1 1】

前記単一ドメイン抗体が、 $V_H H$ 断片または V_{NAR} 断片である、請求項 1 0 に記載のタンパク質。

【請求項 1 2】

前記第 2 の抗原結合部位が、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1、2、1 0、および 1 1 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 1 3】

前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインおよび前記軽鎖可変ドメインが、同じポリペプチド上に存在する、請求項 1 2 に記載のタンパク質。

【請求項 1 4】

前記第 2 の抗原結合部位が、

(a) 配列番号 4 9 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインアミノ酸配列および配列番号 5 3 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列であって、該重鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 5 0 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 5 1 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 5 2 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含み、該軽鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 5 4 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 5 5 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 5 6 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメインアミノ酸配列および軽鎖可変ドメインアミノ酸配列；

10

20

30

40

50

(b) 配列番号 57 と少なくとも 90 % 同一の重鎖可変ドメインアミノ酸配列および配列番号 58 と少なくとも 90 % 同一の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列であって、該重鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 77 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 78 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 79 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含み、該軽鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 80 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 81 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 82 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメインアミノ酸配列および軽鎖可変ドメインアミノ酸配列；または

(c) 配列番号 59 と少なくとも 90 % 同一である重鎖可変ドメインアミノ酸配列および配列番号 60 と少なくとも 90 % 同一である軽鎖可変ドメインアミノ酸配列であって、該重鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 83 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 84 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 85 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含む、該軽鎖可変ドメインアミノ酸配列が、配列番号 86 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 87 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 88 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列を含む、重鎖可変ドメインアミノ酸配列および軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 15】

前記第 2 の抗原結合部位が

(a) 配列番号 50 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列；
配列番号 51 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列；
配列番号 52 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列；
配列番号 54 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列；
配列番号 55 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列；および
配列番号 56 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列；

(b) 配列番号 77 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列；
配列番号 78 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列；
配列番号 79 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列；
配列番号 80 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列；
配列番号 81 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列；および
配列番号 82 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列；または

(c) 配列番号 83 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列；
配列番号 84 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列；
配列番号 85 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列；
配列番号 86 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列；
配列番号 87 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列；および
配列番号 88 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列

を含む、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 16】

前記第 2 の抗原結合部位が、単ドメイン抗体である、請求項 1 から 4 および 8 から 11 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 17】

前記第 2 の抗原結合部位が、V_HH 断片または V_{NAR} 断片である、請求項 16 に記載のタンパク質。

【請求項 18】

前記第 1 および第 2 の抗体 F_c ドメインが、それぞれ、ヒト IgG1 抗体のヒンジおよび C_H2 ドメインを含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 19】

前記第 1 および第 2 の抗体 F_c ドメインが、それぞれ、ヒト IgG1 の F_c ドメインと少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含み、Q347、Y349、T350、L351、S354、E356、E357、K360、Q362、S364、T366、L368、K370、N390、K392、T394、D399、S400、D401、F405

10

20

30

40

50

、 Y 4 0 7、 K 4 0 9、 T 4 1 1、 および K 4 3 9 からなる群から選択される 1 つまたは複数の位置において異なる、請求項 1 8 に記載のタンパク質。

【請求項 2 0】

請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載のタンパク質および薬学的に許容される担体を含む製剤。

【請求項 2 1】

請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載のタンパク質をコードする 1 つまたは複数の核酸を含む細胞。

【請求項 2 2】

腫瘍細胞死を直接的および / または間接的に増強する方法において使用するための、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載のタンパク質を含む組成物であって、前記方法が前記組成物に前記腫瘍細胞およびナチュラルキラー細胞を曝露することを含む、組成物。

【請求項 2 3】

治療に使用するための、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載のタンパク質または請求項 2 0 に記載の製剤を含む、組成物。

【請求項 2 4】

がんを処置する方法において使用するための、請求項 1 から 1 9 のいずれか一項に記載のタンパク質または請求項 2 0 に記載の製剤を含む、組成物であって、前記方法が、前記組成物を患者に投与することを含む、組成物。

【請求項 2 5】

前記がんが、乳がん、卵巣がん、食道がん、膀胱がん、胃がん、唾液管癌、肺の腺癌、ならびに侵襲性の形態の子宮がんおよび子宮漿液性内膜癌からなる群から選択される、請求項 2 4 に記載の組成物または製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願への相互参照

本出願は、2017年2月20日に出願された米国仮特許出願番号第62/461,146号に基づく利益および優先権を主張しており、その全体の内容は、すべての目的のために本明細書中に参考として援用される。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、A S C I I フォーマットで電子提出された配列表を含み、その全体は、参照により本明細書に組み込まれている。前記 A S C I I コピーは2018年2月16日に作成され、D F Y - 0 0 8 P C _ _ S L . t x t という名称であり、92,807バイトのサイズである。

【0 0 0 3】

発明の分野

本発明は、ヒト上皮増殖因子受容体2 (H E R 2 または E r b B 2)、N K G 2 D 受容体、および C D 1 6 に結合する多重特異性結合タンパク質に関する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

背景

がんは、この疾患を処置するための文献に報告されている十分な研究努力および科学進歩にもかかわらず、重大な健康問題であり続けている。最も頻繁に診断されるがんの中には、前立腺がん、乳がん、および肺がんが含まれる。前立腺がんは、男性におけるがんの最も一般的な形態である。乳がんは依然として女性における主要な死因である。これらのがんに対する現在の処置選択肢は、すべての患者に効果的というわけではなく、および / または実質的な有害副作用を有する可能性がある。他の種類のがんも、既存の治療選択肢を使用して処置することが依然として困難である。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

がん免疫療法は、それらが非常に特異的であり、患者自身の免疫系を使用してがん細胞の破壊を促進することができるので望ましい。二重特異性Ｔ細胞エンゲージャーなどの融合タンパク質は、腫瘍細胞の破壊を促進するために腫瘍細胞およびＴ細胞に結合する、文献に記載されているがん免疫療法である。ある特定の腫瘍関連抗原およびある特定の免疫細胞に結合する抗体は文献に記載されている。例えば、ＷＯ ２ ０ １ ６ / １ ３ ４ ３ ７ １ および ＷＯ ２ ０ １ ５ / ０ ９ ５ ４ １ ２ を参照されたい。

【 0 0 0 6 】

ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞は、先天性免疫系の構成要素であり、循環リンパ球の約 15% を構成する。ＮＫ細胞は実質的にすべての組織に浸潤し、最初は、事前感作を必要とせずに腫瘍細胞を効果的に殺傷するそれらの能力によって特徴付けられた。活性化されたＮＫ細胞は、細胞傷害性Ｔ細胞と同様の手段によって、すなわち、パーフォリンおよびグランザイムを含有する細胞傷害性顆粒を介して、ならびに死受容体経路を介して、標的細胞を殺傷する。活性化されたＮＫ細胞はまた、標的組織への他の白血球の動員を促進するＩＦＮ- およびケモカインなどの炎症性サイトカインを分泌する。

10

【 0 0 0 7 】

ＮＫ細胞は、それらの表面における様々な活性化受容体および阻害受容体を介してシグナルに応答する。例えば、ＮＫ細胞が健康な自己細胞に遭遇すると、それらの活性は、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（ＫＩＲ）の活性化によって阻害される。あるいはＮＫ細胞が外来細胞またはがん細胞に遭遇すると、それらは、それらの活性化受容体（例えば、ＮＫＧ２Ｄ、ＮＣＲ、ＤＮＡＭ１）を介して活性化される。ＮＫ細胞はまた、それらの表面におけるＣＤ１６受容体を介していくつかの免疫グロブリンの定常領域によって活性化される。活性化に対するＮＫ細胞の全体的な感受性は、刺激シグナルおよび阻害シグナルの合計に依存する。

20

ＨＥＲ２（ＥｒｂＢ２）は、上皮増殖因子受容体ファミリーに属する膜貫通糖タンパク質である。ＨＥＲ２（ＥｒｂＢ２）は、受容体チロシンキナーゼであり、細胞の生存、増殖および成長を制御している。ＨＥＲ２は、ヒト悪性腫瘍において重要な役割を演じている。ｅｒｂＢ２遺伝子は、ヒト乳がんのおよそ30%において増幅または過発現される。ＨＥＲ２過発現乳がんを有する患者は、がんがＨＥＲ２を過発現していない患者よりも実質的に低い全生存率および短い無病期間を有する。さらに、ＨＥＲ２の過剰発現は、乳がん転移の増加を生じる。ＨＥＲ２の過発現は、乳がん、卵巣がん、食道がん、膀胱がんおよび胃がん、唾液管癌、肺の腺癌ならびに子宮漿液性内膜癌などの侵襲性の形態の子宮がんが挙げられる、多数の他の種類のがんを生じることも公知である。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 8 】

【文献】国際公開第 2 0 1 6 / 1 3 4 3 7 1 号

【文献】国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 5 4 1 2 号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

40

【 0 0 0 9 】

要旨

本発明は、がん細胞のＨＥＲ２ならびにナチュラルキラー細胞におけるＮＫＧ２Ｄ受容体およびＣＤ１６受容体に結合する多重特異性結合タンパク質を提供する。かかるタンパク質は２種類以上のＮＫ活性化受容体と会合することができ、天然リガンドのＮＫＧ２Ｄへの結合を阻止し得る。ある特定の実施形態では、タンパク質は、ヒトならびにげっ歯動物およびカニクイザルなどの他の種においてＮＫ細胞を刺激し得る。本発明の様々な態様および実施形態を以下にさらに詳細に記載する。

【 0 0 1 0 】

したがって、本発明の一態様は、ＮＫＧ２Ｄに結合する第１の抗原結合部位と、ＨＥＲ

50

2に結合する第2の抗原結合部位と、CD16に結合するに十分な抗体Fcドメイン、その一部分、またはCD16に結合する第3の抗原結合部位とを組み込んだタンパク質を提供する。抗原結合部位は各々、抗体重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖可変ドメイン（例えば、抗体のように配列されるか、またはscFvを形成するために一緒に融合される）を組み込んでいてもよい、または抗原結合部位の1つもしくは複数は、ラクダ科抗体のようなV_HH抗体もしくは軟骨魚類に見出されるもののようなV_{NAR}抗体などの単ドメイン抗体であってもよい。

【0011】

NKG2Dに結合する第1の抗原結合部位は、一実施形態では、例えば配列番号1と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一のアミノ酸配列を有すること、ならびに/または、配列番号1のCDR1（配列番号62）、CDR2（配列番号63）、およびCDR3（配列番号64）配列と同一のアミノ酸配列を組み込むことにより、配列番号1に関連する重鎖可変ドメインを組み込んでいてもよい。代替的に第1の抗原結合部位は、配列番号41に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号42に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第1の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号41と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ/または列番号41のCDR1（配列番号65）、CDR2（配列番号66）およびCDR3（配列番号67）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号42と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ/または配列番号42のCDR1（配列番号68）、CDR2（配列番号69）、およびCDR3（配列番号70）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。他の実施形態では、第1の抗原結合部位は、配列番号43に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号44に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第1の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号43と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ/または配列番号43のCDR1（配列番号71）、CDR2（配列番号72）、およびCDR3（配列番号73）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号44と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ/または配列番号44のCDR1（配列番号74）、CDR2（配列番号75）、およびCDR3（配列番号76）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

【0012】

代替的に、第1の抗原結合部位は、例えば配列番号45と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一のアミノ酸配列と、配列番号46と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一のアミノ酸配列とを有することにより、それぞれ、配列番号45に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号46に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。別の実施形態では、第1の抗原結合部位は、例えば配列番号47と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一アミノ酸配列と、配列番号48と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一のアミノ酸配列とを有することにより、それぞれ、配列番号47に関連する重鎖可変ドメインと配列番号48に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。

【0013】

第2の抗原結合部位は、必要に応じて、配列番号49に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号53に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号49と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ/または配列番号49のCDR1（配列番号50）、CDR2（配列番号51）、およびCDR3（配列番号52）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号53と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ/または配列番号53のCDR1（配列番号54）、CDR2（配列番号55）、およびCDR3（配列番号56）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

10

【0014】

代替的に、第2の抗原結合部位は、配列番号57に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号58に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号57と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ/または配列番号57のCDR1（配列番号77）、CDR2（配列番号78）、およびCDR3（配列番号79）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号58と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ/または配列番号58のCDR1（配列番号80）、CDR2（配列番号81）、およびCDR3（配列番号82）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

20

【0015】

別の実施形態では、第2の抗原結合部位は、配列番号59に関連する重鎖可変ドメインと、配列番号60に関連する軽鎖可変ドメインとを組み込んでいてもよい。例えば、第2の抗原結合部位の重鎖可変ドメインは、配列番号59と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ/または配列番号59のCDR1（配列番号83）、CDR2（配列番号84）、およびCDR3（配列番号85）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。同様に、第2の抗原結合部位の軽鎖可変ドメインは、配列番号60と少なくとも90%（例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%）同一であり、かつ/または配列番号60のCDR1（配列番号86）、CDR2（配列番号87）、およびCDR3（配列番号88）配列と同一のアミノ酸配列を組み込んでいてもよい。

30

【0016】

一部の実施形態では、第2の抗原結合部位は、第1の抗原結合部位に存在する軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを組み込んでいる。

【0017】

一部の実施形態では、タンパク質は、CD16に結合するために十分な抗体Fcドメインの一部分を組み込んでおり、ここで抗体Fcドメインは、ヒンジおよびCH2ドメイン、および/またはヒトIgG抗体のアミノ酸配列234~332と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む。

40

【0018】

これらのタンパク質のうちの1つを含有する製剤、これらのタンパク質を発現する1つまたは複数の核酸を含有する細胞およびこれらのタンパク質を使用して腫瘍細胞死を増強する方法も提供される。

【0019】

本発明の別の態様は、患者におけるがんを処置する方法に関連する。方法は、本明細書

50

に記載の治療有効量の多重特異性結合タンパク質を、それを必要とする患者に投与することを含む。多重特異性結合タンパク質を使用して処置される例示的ながんとしては、例えば、乳がん、卵巣がん、食道がん、膀胱がんおよび胃がん、唾液管癌、肺の腺癌ならびに子宮漿液性内膜癌などの侵襲性の形態の子宮がんが挙げられる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 0 】

【図 1】図 1 は、N K G 2 D 結合ドメイン（右アーム）、腫瘍関連抗原結合ドメイン（左アーム）および C D 1 6 に結合する F c ドメインまたはその一部分を含有する多重特異性結合タンパク質の図である。

【 0 0 2 1 】

【図 2】図 2 は、s c F v フォーマットにおける N K G 2 D 結合ドメイン（右アーム）、腫瘍関連抗原結合ドメイン（左アーム）および C D 1 6 に結合する F c ドメインまたはその一部分を含有する多重特異性結合タンパク質の図である。

【 0 0 2 2 】

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

【 0 0 2 3 】

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

【 0 0 2 4 】

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

【 0 0 2 5 】

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

【 0 0 2 6 】

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

【 0 0 2 7 】

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

【 0 0 2 8 】

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

【 0 0 2 9 】

【図 1 0】図 1 0 は、天然リガンドの R a e - 1 デルタと競合することによる、組換えマウス N K G 2 D - F c に対する N K G 2 D 結合ドメイン（クローンとして列記されている）の特異的結合親和性を示す線グラフである。

【 0 0 3 0 】

【図 1 1】図 1 1 は、ヒト N K G 2 D - C D 3 ゼータ融合タンパク質を発現する T N F - アルファ陽性細胞のパーセンテージを定量することにより、N K G 2 D 結合ドメイン（クローンとして列記されている）によるヒト N K G 2 D の活性化を示す棒グラフである。

【 0 0 3 1 】

【図 1 2】図 1 2 は、マウス N K G 2 D - C D 3 ゼータ融合タンパク質を発現する T N F - アルファ陽性細胞のパーセンテージを定量することにより、N K G 2 D 結合ドメイン（

10

20

30

40

50

クローンとして列記されている)によるマウスNK G2Dの活性化を示す棒グラフである。

【0032】

【図13】図13は、NK G2D結合ドメイン(クローンとして列記されている)によるヒトNK細胞の活性化を示す棒グラフである。

【0033】

【図14】図14は、NK G2D結合ドメイン(クローンとして列記されている)によるヒトNK細胞の活性化を示す棒グラフである。

【0034】

【図15】図15は、NK G2D結合ドメイン(クローンとして列記されている)によるマウスNK細胞の活性化を示す棒グラフである。

10

【0035】

【図16】図16は、NK G2D結合ドメイン(クローンとして列記されている)によるマウスNK細胞の活性化を示す棒グラフである。

【0036】

【図17】図17は、腫瘍細胞に対するNK G2D結合ドメイン(クローンとして列記されている)の細胞傷害効果を示す棒グラフである。

【0037】

【図18】図18は、示差走査型蛍光定量法によって測定された、NK G2D結合ドメイン(クローンとして列記されている)の融解温度を示す棒グラフである。

【0038】

20

【図19】図19は、多重特異性結合タンパク質によるヒトNK細胞の増強された活性化を示すグラフである。

【0039】

【図20】図20は、ヒトNK細胞によって腫瘍標的細胞に対してより高いレベルの細胞傷害性を誘導した多重特異性結合タンパク質を示すグラフである。

【0040】

【図21】図21は、ヒトNK細胞によって腫瘍標的細胞に対してより高いレベルの細胞傷害性を誘導した多重特異性結合タンパク質を示すグラフである。

【0041】

【図22】図22は、ヒトNK細胞によって腫瘍標的細胞に対してより高いレベルの細胞傷害性を誘導した多重特異性結合タンパク質を示すグラフである。

30

【0042】

【図23】図23は、ヒトNK細胞によって腫瘍標的細胞に対してより高いレベルの細胞傷害性を誘導した多重特異性結合タンパク質を示すグラフである。

【0043】

【図24】図24は、マウスNK細胞によって腫瘍標的細胞に対してより高いレベルの細胞傷害性を誘導した多重特異性結合タンパク質を示すグラフである。

【0044】

【図25】図25は、マウスNK細胞によって腫瘍標的細胞に対してより高いレベルの細胞傷害性を誘導した多重特異性結合タンパク質を示すグラフである。

40

【0045】

【図26】図26は、EL4細胞で発現されるNK G2DへのHER2標的化Tr iNK E Tの結合プロファイルである。図26は、同じ2つのNK G2D結合ドメインがここでHER2第2標的化アームと対合することを表している。

【0046】

【図27-1】図27Aは、ヒト786-O腎細胞癌細胞で発現されるHER2へのHER2標的化Tr iNK E Tの結合プロファイルである。図27Bは、Tr iNK E Tを含有するNK G2D結合クローンC26がヒトHER2を用いて形質導入されたRMA細胞に結合することを示している、図27Cは、Tr iNK E Tを含有するNK G2D結合クローンF04がヒトHER2を用いて形質導入されたRMA細胞に結合することを示して

50

いる。

【図 27 - 2】図 27 A は、ヒト 786 - O 腎細胞癌細胞で発現される HER2 への HER2 標的化 Tr i N K E T の結合プロファイルである。図 27 B は、Tr i N K E T を含有する NK G 2 D 結合クローン C 2 6 がヒト HER2 を用いて形質導入された RMA 細胞に結合することを示している、図 27 C は、Tr i N K E T を含有する NK G 2 D 結合クローン F 0 4 がヒト HER2 を用いて形質導入された RMA 細胞に結合することを示している。

【0047】

【図 28 - 1】図 28 A ~ 28 C は、Tr i N K E T およびトラスツズマブが、HER2 陽性ヒト腫瘍細胞との共培養において初代ヒト NK 細胞を活性化することができたことを示す棒グラフであり、CD 107 a 脱顆粒および IFN γ サイトカイン産生の増加によって示される。モノクローナル抗体トラスツズマブと比較して、両方の Tr i N K E T は、様々なヒト HER2 がん細胞でヒト NK 細胞の優れた活性化を示した。図 28 A は、ヒト NK 細胞が、Sk Br - 3 細胞と培養された場合、Tr i N K E T によって活性化されることを示す。図 28 B は、ヒト NK 細胞が、Colo 201 細胞と培養された場合、Tr i N K E T によって活性化されることを示す。図 28 C は、ヒト NK 細胞が、HCC 1954 細胞と培養された場合、Tr i N K E T によって活性化されることを示す。

10

【図 28 - 2】図 28 A ~ 28 C は、Tr i N K E T およびトラスツズマブが、HER2 陽性ヒト腫瘍細胞との共培養において初代ヒト NK 細胞を活性化することができたことを示す棒グラフであり、CD 107 a 脱顆粒および IFN γ サイトカイン産生の増加によって示される。モノクローナル抗体トラスツズマブと比較して、両方の Tr i N K E T は、様々なヒト HER2 がん細胞でヒト NK 細胞の優れた活性化を示した。図 28 A は、ヒト NK 細胞が、Sk Br - 3 細胞と培養された場合、Tr i N K E T によって活性化されることを示す。図 28 B は、ヒト NK 細胞が、Colo 201 細胞と培養された場合、Tr i N K E T によって活性化されることを示す。図 28 C は、ヒト NK 細胞が、HCC 1954 細胞と培養された場合、Tr i N K E T によって活性化されることを示す。

20

【0048】

【図 29】図 29 A および 29 B は、Tr i N K E T が、トラスツズマブと比較して、HER2 が中程度のがんおよび低いがんに対してより大きな利点を提供することを示すグラフである。図 29 A は、HER2 高 - Sk Br - 3 腫瘍細胞の活性化ヒト NK 細胞の殺傷を示す。図 29 B は、HER2 低 - 786 - O 腫瘍細胞のヒト NK 細胞の殺傷を示す。Tr i N K E T は、低い HER2 発現を有するがん細胞に対してトラスツズマブと比較してより大きな利点を提供する。

30

【0049】

【図 30】図 30 A ~ 30 C は、CD 16 および NK G 2 D を使用した NK 細胞の相乗的活性化の棒グラフである。図 30 A は CD 107 a のレベルを示し、図 30 B は IFN γ のレベルを示し、図 30 C は CD 107 a および IFN γ のレベルを示す。グラフは平均 ($n = 2$) \pm SD を示している。データは、5 名の異なる健康なドナーを使用した、5 つの独立した実験を代表するものである。

【0050】

40

【図 31】図 31 は、NK G 2 D および CD 16 を標的とする Tr i N K E T を使用した NK 細胞の活性化を示す棒グラフである。試験した抗体は、ヒト Ig G 1 アイソタイプである。グラフは平均 ($n = 2$) \pm SD を示している。

【0051】

【図 32 - 1】図 32 A ~ 32 C は、ヒト IL - 2 活性化 NK 細胞およびヒト休止 NK 細胞を使用した細胞傷害活性の Tr i N K E T 増強を示すグラフである。図 32 A は、ヒト休止 NK 細胞による Sk Br - 3 腫瘍細胞の特異的溶解パーセントを示す。図 32 B は、ヒト IL - 2 活性化 NK 細胞による Sk Br - 3 腫瘍細胞の特異的溶解パーセントを示す。図 32 C は、ヒト IL - 2 活性化 NK 細胞による NC I - H 661 肺がん細胞の特異的溶解パーセントを示す。

50

【図32-2】図32A~32Cは、ヒトIL-2活性化NK細胞およびヒト休止NK細胞を使用した細胞傷害活性のTrinKET増強を示すグラフである。図32Aは、ヒト休止NK細胞によるSkBr-3腫瘍細胞の特異的溶解パーセントを示す。図32Bは、ヒトIL-2活性化NK細胞によるSkBr-3腫瘍細胞の特異的溶解パーセントを示す。図32Cは、ヒトIL-2活性化NK細胞によるNCI-H661肺がん細胞の特異的溶解パーセントを示す。

【0052】

【図33-1】図33Aおよび33Bは、健康なドナー由来のB細胞が、TrinKET媒介溶解に感受性があることを示す棒グラフである。

【図33-2】図33Cおよび33Dは、骨髄細胞が、TrinKET媒介溶解に対して耐性があることを示す棒グラフである。

10

【0053】

【図34】図34は、長期共培養におけるSkBr-3腫瘍細胞のTrinKET媒介hPBMCK殺傷の線グラフである。

【0054】

【図35】図35は、1つの分子における三重特異的結合が、最大NK細胞活性にとって重要であることを示す線グラフである。

【0055】

【図36】図36は、RMA/S-HER2皮下SC2.2有効性の研究設計のフローチャートである。

20

【0056】

【図37】図37は、SC2.2が皮下RMA/S-HER2腫瘍増殖に効果を有さないことを示す線グラフである。

【0057】

【図38】図38Aは、HER2-TrinKET-C26がhNKG2D-FcをRMA-HER2細胞に架橋することを示す図である。図38Bは、HER2-TrinKET-F04がhNKG2D-FcをRMA-HER2細胞に架橋することを示している。点線は、アイソタイプ対照を示す。塗りつぶしていない実線は、未染色対照を表す。塗りつぶした実線は、TrinKETを表す。

【0058】

【図39】図39は、IgG様形状を維持する三機能性の二重特異性抗体であるTriomab形態におけるTrinKETの図である。このキメラは、2つの親抗体に由来する2つの半抗体からなり、各半抗体が1本の軽鎖および1本の重鎖を有する。Triomab形態は、ラット抗体の1/2およびマウス抗体の1/2を含有するヘテロ二量体構築物であり得る。

30

【0059】

【図40】図40は、ノブ・イントゥ・ホール(KIH:knoobs-into-holes)技術を用いるKiH共通軽鎖(LC)形態におけるTrinKETの図である。KiHは、標的1および2に結合する2つのFab、ならびにヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたFcを含有するヘテロ二量体である。KiHフォーマットにおけるTrinKETは、2つの異なる重鎖と、両方の重鎖と対合する共通の軽鎖とを含有する、標的1および標的2に結合する2つのfabを含むヘテロ二量体構築物であり得る。

40

【0060】

【図41】図41は、自然起源の可動性リンカーを介して2つのモノクローナル抗体の標的結合ドメインを組み合わせ、四価のIgG様分子をもたらす、二重可変ドメイン免疫グロブリン(DVD-Ig(商標))形態におけるTrinKETの図である。DVD-Ig(商標)とは、抗原2を標的とする可変ドメインが、抗原1を標的とするFabの可変ドメインのN末端に融合しているホモ二量体構築物である。構築物は通常のFcを含有する。

【0061】

50

【図 4 2】図 4 2 は、F c に融合した標的 1 および標的 2 に結合する 2 つの F a b を含有するヘテロ二量体構築物である、直交性 F a b 界面（オルト - F a b）形態における T r i N K E T の図である。L C - H C の対合は、直交界面によって確実にになっている。ヘテロ二量体化は、F c における突然変異によって確実にになっている。

【 0 0 6 2 】

【図 4 3】図 4 3 は、2 - i n - 1 I g フォーマットにおける T r i n K E T の図である。

【 0 0 6 3 】

【図 4 4】図 4 4 は、F c に融合した標的 1 および標的 2 に結合する 2 つの異なる F a b を含有するヘテロ二量体構築物である、E S 形態における T r i N K E T の図である。ヘテロ二量体化は、F c における静電的ステアリング突然変異によって確実にになっている。

10

【 0 0 6 4 】

【図 4 5】図 4 5 は、F a b アーム交換形態における T r i N K E T、すなわち、重鎖および結合した軽鎖（半分子）を別の分子の重鎖 - 軽鎖対とスワップすることにより F a b アームを交換した結果、二重特異性抗体となった抗体の図である。F a b アーム交換形態（c F a e）は、標的 1 および 2 に結合する 2 つの F a b、ならびにヘテロ二量体化突然変異によって安定化された F c を含有するヘテロ二量体である。

【 0 0 6 5 】

【図 4 6】図 4 6 は、標的 1 および 2 に結合する 2 つの F a b、ならびにヘテロ二量体化突然変異によって安定化された F c を含有するヘテロ二量体である、S E E D B o d y 形態における T r i N K E T の図である。

20

【 0 0 6 6 】

【図 4 7】図 4 7 は、2 つの異なる H C のヘテロ二量体化を誘導するためにロイシンジッパーを使用する、L u Z - Y 形態における T r i N K E T の図である。L u Z - Y 形態は、F c に融合した標的 1 および 2 に結合する 2 つの異なる s c F a b を含有するヘテロ二量体である。ヘテロ二量体化は、F c の C 末端に融合したロイシンジッパーモチーフによって確実にになっている。

【 0 0 6 7 】

【図 4 8】図 4 8 は、C o v - X - B o d y 形態における T r i N K E T の図である。

【 0 0 6 8 】

30

【図 4 9】図 4 9 A および 4 9 B は、ヘテロ二量体化突然変異によって安定化された F c に融合した 2 つの異なる F a b を有するヘテロ二量体構築物である、- B o d y 形態における T r i N K E T の図である。抗原 1 を標的とする F a b 1 はカップ L C を含有し、一方、抗原 2 を標的とする第 2 の F a b はラムダ L C を含有する。図 4 9 A は、- B o d y の一形態の例示的な図であり、図 4 9 B は、別の - B o d y の例示的な図である。

【 0 0 6 9 】

【図 5 0】図 5 0 は、F c に融合した、標的 1 に結合する F a b と、標的 2 に結合する s c F a b とを含む、O a s c - F a b ヘテロ二量体構築物である。ヘテロ二量体化は、F c における突然変異によって確実にになっている。

40

【 0 0 7 0 】

【図 5 1】図 5 1 は、抗原 1 および 2 に結合する 2 つの異なる F a b、ならびにヘテロ二量体化突然変異によって安定化された F c を含有するヘテロ二量体構築物である、D u e t M a b である。F a b 1 および 2 は、L C および H C の正確な対合を確実にする特異な（differential）S - S 架橋を含有する。

【 0 0 7 1 】

【図 5 2】図 5 2 は、ヘテロ二量体化によって安定化された F c に融合した標的 1 および 2 に結合する 2 つの異なる F a b を有するヘテロ二量体構築物である、C r o s s m a b である。C L ドメインおよび C H 1 ドメインと、V h ドメインおよび V L ドメインとが切り換わっており、例えば、C H 1 は、V L とインラインで融合しており、一方、C L は、

50

V Hとインラインで融合している。

【 0 0 7 2 】

【図 5 3】図 5 3 は、抗原 2 に結合する F a b が、抗原 1 に結合する F a b の H C の N 末端に融合しているホモ二量体構築物である、F i t - I g である。この構築物は、野生型 F c を含有する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 7 3 】

詳細な説明

本発明は、がん細胞における H E R 2 ならびにナチュラルキラー細胞における N K G 2 D 受容体および C D 1 6 受容体に結合してナチュラルキラー細胞を活性化させる多重特異性結合タンパク質、かかる多重特異性結合タンパク質を含む医薬組成物、ならびに、がんの処置などのためにかかる多重特異性タンパク質および医薬組成物を使用する治療方法を提供する。本発明の様々な態様を複数のセクションに分けて以下に記述する。しかしながら、1つの特定のセクションに記載される本発明の態様は、いずれかの特定のセクションに限定されるものではない。

【 0 0 7 4 】

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語および句を以下に定義する。

【 0 0 7 5 】

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

本明細書で使用される場合、「抗原結合部位」という用語は、抗原結合に關与する免疫グロブリン分子の一部分を指す。ヒト抗体において、抗原結合部位は、重 (「 H 」) 鎖および軽 (「 L 」) 鎖の N 末端可変 (「 V 」) 領域のアミノ酸残基によって形成される。重鎖および軽鎖の V 領域内の 3 つの高度に分歧したストレッチは、「フレームワーク領域」または「 F R 」として公知である、より保存された隣接するストレッチの間に介在している「超可変領域」と称される。したがって、「 F R 」という用語は、免疫グロブリンにおける超可変領域の間およびそれに隣接して天然に見出されるアミノ酸配列を指す。ヒト抗体分子において、軽鎖の 3 つの超可変領域および重鎖の 3 つの超可変領域は、抗原結合表面を形成するように三次元空間において互いに対して配置される。抗原結合表面は、結合した抗原の三次元表面と相補的であり、重鎖および軽鎖の各々の 3 つの超可変領域は、「相補性決定領域」または「 C D R 」と称される。ラクダおよび軟骨魚類などのある特定の動物において、抗原結合部位は、「単一ドメイン抗体」を提供する単一抗体鎖によって形成される。抗原結合部位は、インタクトな抗体中、抗原結合表面を保持する抗体の抗原結合断片中、または s c F v などの組換えポリペプチド中に存在し、ペプチドリンカーを使用して単一ポリペプチドにおいて重鎖可変ドメインを軽鎖可変ドメインに連結することができる。

【 0 0 7 6 】

本明細書で使用される場合、「腫瘍関連抗原」という用語は、がんに関連するタンパク質、糖タンパク質、ガングリオシド、炭水化物、脂質を含むがこれらに限定されない、任意の抗原を意味する。このような抗原は、悪性細胞において、または腫瘍関連血管、細胞外マトリックス、間葉系間質、もしくは免疫浸潤物におけるような腫瘍微小環境中で発現され得る。

【 0 0 7 7 】

本明細書で使用される場合、「対象」および「患者」という用語は、本明細書に記載の方法および組成物によって処置される生物を指す。かかる生物には、好ましくは、限定されないが、哺乳動物 (例えば、ネズミ、サル、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど) が含まれ、より好ましくはヒトが含まれる。

【 0 0 7 8 】

本明細書中で使用される場合、「有効量」という用語は、有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な化合物 (例えば、本発明の化合物) の量を指す。有効量は、1回または

10

20

30

40

50

複数回の投与、適用または投薬量で投与されてもよく、特定の製剤または投与経路に限定されることを意図しない。本明細書中で使用される場合、「処置する」という用語は、何らかの効果、例えば、状態、疾患、障害などの好転をもたらす、減少、低減、モジュレート、改善もしくは除去、またはそれらの症状の改善を含む。

【0079】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、組成物を、*in vivo* または *ex vivo* での診断的使用または治療的使用に特に適切にする、活性剤と、不活性または活性な担体との組合せを指す。

【0080】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、エマルション（例えば、油/水または水/油エマルションなど）、および種々の種類の湿潤剤などの標準的な医薬担体のいずれかを指す。組成物はまた、安定剤および保存剤を含んでもよい。担体、安定剤およびアジュバントの例に関しては、例えば、Martin、Remington's Pharmaceutical Sciences、第15版、Mack Publ.Co.、Easton、PA [1975年]を参照されたい。

【0081】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される塩」という用語は、対象に投与すると、本発明の化合物またはその活性代謝産物もしくは残留物を提供することができる、本発明の化合物の任意の薬学的に許容される塩（例えば、酸または塩基）を指す。当業者に公知であるように、本発明の化合物の「塩」は、無機または有機の酸および塩基から誘導され得る。例示的な酸には、限定されないが、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、トルエン-p-スルホン酸、酒石酸、酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、ナフタレン-2-スルホン酸、ベンゼンスルホン酸などが含まれる。シュウ酸などの他の酸は、それら自体では薬学的に許容されないが、本発明の化合物およびそれらの薬学的に許容される酸付加塩を得る際の間体として有用な塩の調製に利用され得る。

【0082】

例示的な塩基には、限定されないが、アルカリ金属（例えば、ナトリウム）水酸化物、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）水酸化物、アンモニアおよび式 NW_4^+ （式中、WはC₁~4アルキルである）の化合物などが含まれる。

【0083】

例示的な塩には、限定されないが、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、酪酸塩、クエン酸塩、ショウノウ酸塩、ショウノウスルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、フルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2-ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、2-ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウ酸塩、パルモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシル酸塩、ウンデカン酸塩などが含まれる。塩の他の例には、 Na^+ 、 NH_4^+ および NW_4^+ （式中、WはC₁~4アルキル基である）などの適切なカチオンと配合された本発明の化合物のアニオンが含まれる。

【0084】

治療的使用のために、本発明の化合物の塩は、薬学的に許容されると意図される。しかしながら、薬学的に許容されない酸および塩基の塩も、例えば、薬学的に許容される化合物の調製または精製において使用することができる。

【0085】

組成物が特定の成分を有する、含む（*including*）、もしくは含む（*comprising*）と記載されているか、またはプロセスおよび方法が特定のステップを有す

10

20

30

40

50

る、含む (i n c l u d i n g)、もしくは含む (c o m p r i s i n g) と記載されている説明全体にわたって、さらに、列挙された成分から本質的になる、またはそれからなる本発明の組成物が存在すること、ならびに列挙されたプロセスステップから本質的になる、またはそれからなる本発明によるプロセスおよび方法が存在することが意図される。

【 0 0 8 6 】

一般的事項として、パーセンテージを特定する組成物は、特に明記しない限り、重量による。さらに、変数が定義を伴わない場合、変数の以前の定義が優先する。

I . タンパク質

【 0 0 8 7 】

本発明は、がん細胞における H E R 2 ならびにナチュラルキラー細胞における N K G 2 D 受容体および C D 1 6 受容体に結合してナチュラルキラー細胞を活性化させる多重特異性結合タンパク質を提供する。多重特異性結合タンパク質は、本明細書に記載の医薬組成物および治療方法において有用である。ナチュラルキラー細胞の N K G 2 D 受容体および C D 1 6 受容体に多重特異性結合タンパク質が結合すると、がん細胞の破壊を目的としたナチュラルキラー細胞の活性が増強される。がん細胞の H E R 2 に多重特異性結合タンパク質が結合すると、がん細胞がナチュラルキラー細胞に近接するため、ナチュラルキラー細胞によるがん細胞の直接的および間接的な破壊が容易になる。例示的な多重特異性結合タンパク質のさらなる記載を以下に提供する。

【 0 0 8 8 】

多重特異性結合タンパク質の第 1 の構成要素は、N K 細胞、T 細胞および C D 8 + T 細胞を含み得るがこれらに限定されない、N K G 2 D 受容体発現細胞に結合する。多重特異性結合タンパク質は、N K G 2 D に結合すると、U L B P 6 および M I C A などの天然リガンドが N K G 2 D に結合することおよび N K G 2 D 受容体を活性化することを阻止し得る。

【 0 0 8 9 】

多重特異性結合タンパク質の第 2 の構成成分は、乳がん、卵巣がん、食道がん、膀胱がんおよび胃がん、唾液管癌、肺の腺癌ならびに子宮漿液性内膜癌などの侵襲性の形態の子宮がんを含み得るがこれらに限定されない、H E R 2 発現細胞に結合する。

【 0 0 9 0 】

多重特異性結合タンパク質の第 3 の構成要素は、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、マスト細胞、および濾胞性樹状細胞を含む白血球の表面にある F c 受容体である C D 1 6 を発現する細胞に結合する。

【 0 0 9 1 】

本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質は、様々なフォーマットをとることができる。例えば、1つのフォーマットは、第 1 の免疫グロブリン重鎖、第 1 の免疫グロブリン軽鎖、第 2 の免疫グロブリン重鎖、および第 2 の免疫グロブリン軽鎖を含む、ヘテロ二量体の多重特異性抗体 (図 1) である。第 1 の免疫グロブリン重鎖は、第 1 の F c (ヒンジ - C H 2 - C H 3) ドメインと、第 1 の重鎖可変ドメインと、必要に応じて第 1 の C H 1 重鎖ドメインとを含む。第 1 の免疫グロブリン軽鎖は、第 1 の軽鎖可変ドメインおよび第 1 の軽鎖定常ドメインを含む。第 1 の免疫グロブリン軽鎖は、第 1 の免疫グロブリン重鎖と一緒に、N K G 2 D に結合する抗原結合部位を形成する。第 2 の免疫グロブリン重鎖は、第 2 の F c (ヒンジ - C H 2 - C H 3) ドメインと、第 2 の重鎖可変ドメインと、必要に応じて第 2 の C H 1 重鎖ドメインとを含む。第 2 の免疫グロブリン軽鎖は、第 2 の軽鎖可変ドメインおよび第 2 の軽鎖定常ドメインを含む。第 2 の免疫グロブリン軽鎖は、第 2 の免疫グロブリン重鎖と一緒に、H E R 2 に結合する抗原結合部位を形成する。第 1 の F c ドメインおよび第 2 の F c ドメインは一緒に C D 1 6 に結合することができる (図 1) 。一部の実施形態では、第 1 の免疫グロブリン軽鎖は、第 2 の免疫グロブリン軽鎖と同一であってもよい。

【 0 0 9 2 】

別の例示的なフォーマットは、第 1 の免疫グロブリン重鎖、第 2 の免疫グロブリン重鎖

10

20

30

40

50

、および免疫グロブリン軽鎖を含む、ヘテロ二量体の多重特異性抗体（図2）に関する。第1の免疫グロブリン重鎖は、対合し、NKGD2またはHER2に結合する重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインから構成された一本鎖可変断片（scFv）に、リンカーまたは抗体ヒンジのいずれかを介して融合している、第1のFc（ヒンジ-CH2-CH3）ドメインを含む。第2の免疫グロブリン重鎖は、第2のFc（ヒンジ-CH2-CH3）ドメインと、第2の重鎖可変ドメインと、必要に応じてCH1重鎖ドメインとを含む。この免疫グロブリン軽鎖は、軽鎖可変ドメインおよび定常軽鎖ドメインを含む。第2の免疫グロブリン重鎖は、免疫グロブリン軽鎖と対合し、NKGD2またはHER2に結合する。第1のFcドメインおよび第2のFcドメインは、一緒にCD16に結合することができる（図2）。

10

【0093】

1つまたは複数のさらなる結合モチーフが、必要に応じてリンカー配列を介して、定常領域CH3ドメインのC末端に融合され得る。ある特定の実施形態では、抗原結合部位は、一本鎖もしくはジスルフィド安定化可変領域（ScFv）であり得るか、または四価もしくは三価の分子を形成し得る。

【0094】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、IgG様形状を維持する三機能性の二重特異性抗体である、Triomab形態である。このキメラは、2つの親抗体に由来する2つの半抗体からなり、各半抗体が1本の軽鎖および1本の重鎖を有する。

【0095】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、ノブ・イントゥ・ホール（KiH）技術を用いるKiH共通軽鎖（LC）形態である。KiHは、ヘテロ二量体化を促進するために、CH3ドメインを工学操作して各重鎖に「ノブ」または「ホール」のいずれかを作出することを伴う。「ノブ・イントゥ・ホール（KiH）」Fc技術の背後にある概念は、小さな残基を嵩高の残基で置換することにより、1つのCH3ドメイン（CH3A）に「ノブ」（例えば、EU付番でT366WCH3A）を導入することであった。この「ノブ」に適応するように、他方のCH3ドメイン（CH3B）において、ノブに最も近い隣接残基をより小さな残基に置き換えること（すなわち、T366S/L368A/Y407VCH3B）により、相補的な「ホール」表面が作出された。「ホール」突然変異は、構造情報に基づくファージライブラリスクリーニング（Atwell S、Ridgway JB、Wells JA、Carter P、Stable heterodimers from remodeling the domain interface of a homodimer using a phage display library、J Mol Biol（1997年）270巻（1号）：26～35頁）によって最適化された。KiH Fc変異体のX線結晶構造（Elliott JM、Ultsch M、Lee J、Tong R、Takeda K、Spiess Cら、Antiparallel conformation of knob and hole aglycosylated half-antibody homodimers is mediated by a CH2-CH3 hydrophobic interaction. J Mol Biol（2014年）426巻（9号）：1947～57頁、Mimoto F、Kadono S、Katada H、Igawa T、Kamikawa T、Hattori K、Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for Fcγ receptors. Mol Immunol（2014年）58巻（1号）：132～8頁）は、CH3ドメイン間のコア界面では、立体的相補性によって推進される疎水性相互作用がヘテロ二量体化に熱力学的に有利に働くが、ノブ-ノブおよびホール-ホールの界面は、それぞれ立体障害および好ましい相互作用の妨害が原因でホモ二量体化に有利に働かないことを示した。

20

30

40

【0096】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、自然起源の可動性リンカーを介して2つのモノクローナル抗体の標的結合ドメインを組み合わせ、四価のIgG様分子をもたらす、二重可変ドメイン免疫グロブリン（DVD-Ig（商標））形態におけるものである。

【0097】

50

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、直交性 F a b 界面（オルト - F a b）形態におけるものである。オルト - F a b I g G アプローチ（Lewis SM、Wu X、Pustilnik A、Serenio A、Huang F、Rick HLら、Generation of bispecific I g G antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. Nat. Biotechnol. (2014年) 32巻(2号): 191~8頁)では、構造に基づく領域デザインにより、一方の F a b における L C および H C_{VH}-C_{H1} の界面にのみ相補的突然変異が導入され、他方の F a b が変化することはない。

【0098】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、2 i n 1 I g フォーマットにおけるものである。一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、F c に融合した標的 1 および標的 2 に結合する 2 つの異なる F a b を含有するヘテロ二量体構築物である、E S 形態におけるものである。ヘテロ二量体化は、F c における静電的ステアリング突然変異によって確実にになっている。一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、ヘテロ二量体化突然変異によって安定化された F c に融合した 2 つの異なる F a b を有するヘテロ二量体構築物である、- B o d y 形態におけるものである。抗原 1 を標的とする F a b 1 はカップ L C を含有し、一方、抗原 2 を標的とする第 2 の F a b はラムダ L C を含有する。図 49 A は、- B o d y の一形態の例示的な図であり、図 49 B は、別の - B o d y の例示的な図である。

10

【0099】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、F a b アーム交換形態（重鎖および結合した軽鎖（半分子）を別の分子の重鎖 - 軽鎖対とスワップすることにより F a b アームを交換した結果、二重特異性抗体となった抗体）である。一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、S E E D B o d y 形態におけるものである。S E E D (s t r a n d - e x c h a n g e e n g i n e e r e d d o m a i n) プラットフォームは、天然抗体の治療用途を広げる可能性がある非対称かつ二重特異性抗体様の分子を生成するためにデザインされた。このタンパク質工学操作プラットフォームは、保存された C H 3 ドメインにおける免疫グロブリンの構造的に関連した配列の交換に基づく。S E E D デザインは、A G および G A S E E D C H 3 ドメインのホモ二量体化を回避しつつ、A G / G A ヘテロ二量体の効果的な生成を可能にする（Muda M.ら、Protein Eng. Des. Sel. (2011年、24巻(5号): 447~54頁)）。一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、2 つの異なる H C のヘテロ二量体化を誘導するためにロイシンジッパーを使用する、L u Z - Y 形態におけるものである（Wranik, B.J.ら、J. Biol. Chem. (2012年)、287巻: 43331~9頁）。

20

30

【0100】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、C o v - X - B o d y 形態におけるものである。二重特異性 C o v X - B o d y では、分枝状のアゼチジノンリンカーを使用して 2 つの異なるペプチドをひとつに結合させ、温和な条件下にてスキャフォールド抗体に部位特異的様式で融合させる。機能的活性に関与するのはファルマコフォアだが、抗体スキャフォールドは長い半減期および I g 様の分布をもたらす。最適化された、または独特の二重特異性抗体を生成するために、ファルマコフォアは化学的に最適化するか、または他のファルマコフォアに置き換えることができる（Doppalapudi VRら、PNAS (2010年)、107巻(52号): 22611~22616頁）。

40

【0101】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、F c に融合した、標的 1 に結合する F a b と、標的 2 に結合する s c F a b とを含む、O a s c - F a b ヘテロ二量体形態におけるものである。ヘテロ二量体化は、F c における突然変異によって確実にになっている。

【0102】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、抗原 1 および 2 に結合する 2 つの異なる F a b 、ならびにヘテロ二量体化突然変異によって安定化された F c を含有するヘ

50

テロ二量体構築物である、D u e t M a b形態におけるものである。F a b 1および2は、L CおよびH Cの正確な対合を確実にする特異なS - S架橋を含有する。

【0103】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、ヘテロ二量体化によって安定化されたF cに融合した、標的1および2に結合する2つの異なるF a bを有するヘテロ二量体構築物である、C r o s s m A b形態におけるものである。C LドメインおよびC H 1ドメインと、V HドメインおよびV Lドメインとが切り換わっており、例えば、C H 1は、V Lとインラインで融合しており、C Lは、V Hとインラインで融合している。

【0104】

一部の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、抗原2に結合するF a bが、抗原1に結合するF a bのH CのN末端に融合しているホモ二量体構築物である、F i t - I g形態におけるものである。この構築物は、野生型F cを含有する。

【0105】

本明細書に記載のN K G 2 D結合性断片およびH E R 2結合性断片の様々なフォーマットを組み合わせるにより、さらなる多重特異性結合タンパク質のフォーマットが考案され得る。

【0106】

表1は、組み合わせてN K G 2 Dと結合することができる重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのペプチド配列を記載している。

【表1 - 1】

表 1		
クローン	重鎖可変領域のアミノ酸配列	軽鎖可変領域のアミノ酸配列
ADI-27705	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYPNPSLKS RVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPPWGQGLTVTVSS (配列番号 1) CDR1 (配列番号 62) – GSFSGYYWS CDR2 (配列番号 63) – EIDHSGSTNYPNPSLKS	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYNSYPI TFGGGTKVEIK (配列番号 2)

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

	CDR3 (配列番号 64) – ARARGPWSEDP	
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SEDPWGQGTLVTVSS (配列番号 3)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPIT FGGGTKVEIK (配列番号 4)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SEDPWGQGTLVTVSS (配列番号 5)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDFAVYYCQQYHSFYT FGGGTKVEIK (配列番号 6)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SEDPWGQGTLVTVSS (配列番号 7)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDFAVYYCQQSNSYYT FGGGTKVEIK (配列番号 8)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SEDPWGQGTLVTVSS (配列番号 9)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDFAVYYCQQYNSYPT FGGGTKVEIK (配列番号 10)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW GFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 11)	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR TSQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESQVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDSATYYCQQSYDIP YTFGQGKLEIK (配列番号 12)

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYGSFPIT FGGGTKVEIK (配列番号 14)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPDDFATYYCQQSKEVP WTFGQGTKVEIK (配列番号 16)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 17)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYNSFPT FGGGTKVEIK (配列番号 18)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 19)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYDIYPT FGGGTKVEIK (配列番号 20)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 21)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYDSYPT FGGGTKVEIK (配列番号 22)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFT

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

	FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 23)	LTISLQPDDFATYYCQQYGSFPT FGGGTKVEIK (配列番号 24)
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 25)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGLVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYQSFT FGGGTKVEIK (配列番号 26)
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGLVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYSSFT FGGGTKVEIK (配列番号 28)
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 29)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGLVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYESYST FGGGTKVEIK (配列番号 30)
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 31)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGLVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYDSFITF GGGKTKVEIK (配列番号 32)
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 33)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGLVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYQSYPT FGGGTKVEIK (配列番号 34)

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 35)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYHSFPT FGGGTKVEIK (配列番号 36)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYELYSY TFGGGTKVEIK (配列番号 38)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLVTVSS (配列番号 39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYDTFIT FGGGTKVEIK (配列番号 40)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDVAVYYCARGDSSI RHAYYYYGMDVWGQGTITVTVSS (配列番号 41) CDR1 (配列番号 65) – GTFSSYAIS CDR2 (配列番号 66) – GIPIFGTANYAQKFQG CDR3 (配列番号 67) – ARGDSSIRHAYYYYGMDV	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QQYYSTPITFGGGTKVEIK (配列番号 42) CDR1 (配列番号 68) – KSSQSVLYSSNNKNYLA CDR2 (配列番号 69) – WASTRES CDR3 (配列番号 70) – QQYYSTPIT
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSG GSISSSSYYWGWRQPPGKGLEWIGSI YYSGSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQ	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQSVSRYLAWYQQKPGQAPRLLI YDASNRAITGIPARFSGSGSGTDFT

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

	FSLKLSSVTAADTAVYYCARGSDRF HPYFDYWGGTGLVTVSS (配列番号 43) CDR1 (配列番号 71) - GSISSSYYWG CDR2 (配列番号 72) - SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (配列番号 73) - ARGSDRFHPYFDY	LTISSELEPEDFAVYYCQQFDTWPP TFGGGTKVEIK (配列番号 44) CDR1 (配列番号 74) - RASQSVSRILA CDR2 (配列番号 75) - DASNRAT CDR3 (配列番号 76) - QQFDTWPPT
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGGTGLVTVSS (配列番号 89)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDEFATYYCEQYDSYPT FGGGTKVEIK (配列番号 90)
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKAS GGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWMGG IPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDVAVYYCARRGRK ASGSFYFYYGMDVWGQGTITVTVSS (配列番号 91)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCE SSQSLNSGNQKNYLTWYQQKP GQPPKPLIYWASTRESGVDPDRFSG SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QNDYSYPYTFGQGTKLEIK (配列番号 92)
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS GYTFTSYMHVVRQAPGGGLEWM GIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARG APNYGDTTHDYYYMDVWGKGTITV VSS (配列番号 94) CDR1 (配列番号 96) - YTFTSYMH CDR2 (配列番号 97) - IINPSGGSTSYAQKFQG CDR3 (配列番号 98) - ARGAPNYGDTTHDYYYMDV	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLL IYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFT LTISLQSEDFAVYYCQQYDDWP FTFGGGTKVEIK (配列番号 95) CDR1 (配列番号 99) - RASQSVSSNLA CDR2 (配列番号 100) - GASTRAT CDR3 (配列番号 101) - QQYDDWPFT

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSS ISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNANK SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP MGAAAGWFDPWGQGLTVTVSS (配列番号 102)	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQGVSP RTFGGGTKVEIK (配列番号 103)
	CDR1 (配列番号 104) - FTFSSYSMN CDR2 (配列番号 105) - SISSSSSYIYYADSVKG CDR3 (配列番号 106) - ARGAPMGAAAGWFDP	CDR1 (配列番号 107) - RASQGISSWLA CDR2 (配列番号 108) - AASSLQS CDR3 (配列番号 109) - QQGVSPRT

10

【 0 1 0 7 】

代替的に、US9, 273, 136において説明されているように、配列番号45によって定義される重鎖可変ドメインを、配列番号46によって定義される軽鎖可変ドメインと対合させて、NKGDに結合することができる抗原結合部位を形成してもよい。

20

【化 1】

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDYW
GQGTTVTVSS (配列番号 45)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLPSG
VSDRFGSGSKGTS AFLAISGLQSEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL (配列
番号 46)

30

【 0 1 0 8 】

代替的に、US7, 879, 985において説明されているように、配列番号47によって定義される重鎖可変ドメインを、配列番号48によって定義される軽鎖可変ドメインと対合させて、NKGDに結合することができる抗原結合部位を形成してもよい。

【化 2】

QVHLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSDDSISSYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGSAN
YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMTVTS
S (配列番号 47)

40

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
PDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQYGSSPWTFGGGTKVEIK (配列番号
48)

【 0 1 0 9 】

表2は、組み合わせさせてHER2に結合することができる重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのペプチド配列を列記する。

50

【表 2 - 1】

表 2		
クローン	重鎖可変ドメインのアミノ酸配列	軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列
トラスツマブ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVS S (配列番号 49) CDR1(配列番号 50) - GFNIKDT CDR2 (配列番号 51) - YPTNGY CDR3 (配列番号 52) - WGGDGFYAMDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF GQGTKVEIK (配列番号 53) CDR1(配列番号 54) - QDVNTAVA CDR2 (配列番号 55) - SASFLYS CDR3 (配列番号 56) - QQHYTTPPT
ペルツマブ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEW VADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLS VDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVS SA (配列番号 57) CDR1 (配列番号 77) - GFTFTDY CDR2 (配列番号 78) - NPNSGG CDR3 (配列番号 79) - NLGPSFYFDY	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIY SASYRYTGVPSPRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG QGTKVEIKR (配列番号 58) CDR1 (配列番号 80) - QDVSIGVA CDR2 (配列番号 81) - SASYRYT CDR3 (配列番号 82) - QQYYIYPYT
MGAH22 (US 8,802,093)	QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCA SGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWI GRIYPTNGYTRYDPKFQDKATITAD TSSNTAYLQVSRLTSEDVAVYYCS	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCK ASQDVNTAVAWYQQKPGHSPKLL IYSASFRYTGVDPDRFTGSRSGTDFT FTISSVQAEDLAVYYCQQHYTPPT

【表 2 - 2】

	RWGGDGFYAMDYWGQGASVTVS SA (配列番号 59) CDR1 (配列番号 83) - GFNIKDT CDR2 (配列番号 84) - YPTNGY CDR3 (配列番号 85) - WGGDGFYAMDY	TFGGGTKVEIKR (配列番号 60) CDR1 (配列番号 86) - QDVNTAVA CDR2 (配列番号 87) - SASFRYT CDR3 (配列番号 88) - QQHYTTPPT
--	---	--

【 0 1 1 0 】

代替的に、H E R 2 に結合することができる新規の抗原結合部位は、配列番号 6 1 によって定義されるアミノ酸配列への結合についてスクリーニングすることによって特定することができる。

【 化 3 】

MELAAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMRLHLYQGCQV
VQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNY
ALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILW
KDIFHKNNQLALTIDTNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAAGGCAR
CKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPALVTYNTDTFESMP
NPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCA
RVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQL
QVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLR
SLRELGSGLALIHNTLHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACH
QLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNAHCLPCHPECQ
PQNGSVTCFGPEADQCACAHYKDPFVCVARCPGSKPDLSYMPIWKFPDEEGACQ
PCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIR
KYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWI
PDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPPVSRLLGICLTSTVQLVT
QLMPYGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCMIKAGMSYLEDVRLVHRDLAARNVL
VKSPNHVKITDFGLARLLDIDETEHADGGKVPIKWMALLESILRRRFTHQSDVWSYG
VTWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMMVKCWMIDSECRP
RFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYL
VPQQGFFCPDPAPGAGGMVHRRHRSSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGA
GSDVFDGDLGMGAAGKGLQSLPTHDPSPQLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPE
YVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKNGVVKDVFAGGAVENPE
YLTPQGGGAAPQPHPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGDL
VPV (配列番号 61).

10

20

【 0 1 1 1 】

F c ドメイン内で、C D 1 6 結合はヒンジ領域およびC H 2 ドメインによって媒介される。例えば、ヒト I g G 1 内で、C D 1 6 との相互作用は主に、アミノ酸残基 A s p 2 6 5 ~ G l u 2 6 9、A s n 2 9 7 ~ T h r 2 9 9、A l a 3 2 7 ~ I l e 3 3 2、L e u 2 3 4 ~ S e r 2 3 9、およびC H 2 ドメインにおける炭水化物残基N - アセチル - D - グルコサミンに焦点が当てられている (Sondermannら、Nature、4 0 6 巻 (6 7 9 3 号) : 2 6 7 ~ 2 7 3 頁を参照されたい)。既知のドメインに基づいて、突然変異は、ファージディスプレイライブラリもしくは酵母表面ディスプレイ c D N A ライブラリを使用することなどによって、C D 1 6 に対する結合親和性を増強もしくは低減させるように選択され得るか、または相互作用の既知の三次元構造に基づいてデザインされ得る。

30

【 0 1 1 2 】

ヘテロ二量体抗体重鎖の構築は、同じ細胞内で2つの異なる抗体重鎖配列を発現させることによって達成することができる。これにより、各抗体重鎖のホモ二量体の構築およびヘテロ二量体の構築をもたらすことができる。ヘテロ二量体の選択的構築の促進は、U S 1 3 / 4 9 4 8 7 0、U S 1 6 / 0 2 8 8 5 0、U S 1 1 / 5 3 3 7 0 9、U S 1 2 / 8 7 5 0 1 5、U S 1 3 / 2 8 9 9 3 4、U S 1 4 / 7 7 3 4 1 8、U S 1 2 / 8 1 1 2 0 7、U S 1 3 / 8 6 6 7 5 6、U S 1 4 / 6 4 7 4 8 0 および U S 1 4 / 8 3 0 3 3 6 に示されているように、各抗体重鎖定常領域のC H 3 ドメイン内に異なる突然変異を組み込むことによって達成することができる。例えば、突然変異は、ヒト I g G 1 に基づき、これらの2つの鎖が互いに選択的にヘテロ二量体化することを可能にする第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチド内にアミノ酸置換の異なる対を組み込んでいるC H 3 ドメイン内で作製され得る。以下に例示したアミノ酸置換の位置は、K a b a t におけるように、すべてE U インデックスに従って番号付けしている。

40

【 0 1 1 3 】

1つの状況では、第1のポリペプチドにおけるアミノ酸置換は、元のアミノ酸を、アル

50

ギニン（Ｒ）、フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）またはトリプトファン（Ｗ）から選択される、より大きなアミノ酸で置換し、第２のポリペプチドにおける少なくとも１つのアミノ酸置換は、元のアミノ酸を、より大きなアミノ酸置換（突出）が、より小さなアミノ酸置換（空洞）の表面に適合するように、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）、またはバリン（Ｖ）から選択される、より小さなアミノ酸で置換する。例えば、一方のポリペプチドはＴ３６６Ｗ置換を組み込むことができ、他方のポリペプチドは、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖを含む３つの置換を組み込むことができる。

【０１１４】

本発明の抗体重鎖可変ドメインは、必要に応じて、ＣＨ１ドメインを有するまたは有さないヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３ドメインを含むＩｇＧ定常領域などの、抗体定常領域と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列と連結され得る。一部の実施形態では、定常領域のアミノ酸配列は、ヒトＩｇＧ１定常領域、ＩｇＧ２定常領域、ＩｇＧ３定常領域、またはＩｇＧ４定常領域などの、ヒト抗体定常領域と少なくとも９０％同一である。一部の他の実施形態では、定常領域のアミノ酸配列は、ウサギ、イヌ、ネコ、マウス、またはウマなどの別の哺乳動物由来の抗体定常領域と少なくとも９０％同一である。１つまたは複数の突然変異が、ヒトＩｇＧ１定常領域と比較して、例えば、Ｑ３４７、Ｙ３４９、Ｌ３５１、Ｓ３５４、Ｅ３５６、Ｅ３５７、Ｋ３６０、Ｑ３６２、Ｓ３６４、Ｔ３６６、Ｌ３６８、Ｋ３７０、Ｎ３９０、Ｋ３９２、Ｔ３９４、Ｄ３９９、Ｓ４００、Ｄ４０１、Ｆ４０５、Ｙ４０７、Ｋ４０９、Ｔ４１１および／またはＫ４３９において定常領域に組み込まれ得る。例示的な置換には、例えば、Ｑ３４７Ｅ、Ｑ３４７Ｒ、Ｙ３４９Ｓ、Ｙ３４９Ｋ、Ｙ３４９Ｔ、Ｙ３４９Ｄ、Ｙ３４９Ｅ、Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３５０Ｖ、Ｌ３５１Ｋ、Ｌ３５１Ｄ、Ｌ３５１Ｙ、Ｓ３５４Ｃ、Ｅ３５６Ｋ、Ｅ３５７Ｑ、Ｅ３５７Ｌ、Ｅ３５７Ｗ、Ｋ３６０Ｅ、Ｋ３６０Ｗ、Ｑ３６２Ｅ、Ｓ３６４Ｋ、Ｓ３６４Ｅ、Ｓ３６４Ｈ、Ｓ３６４Ｄ、Ｔ３６６Ｖ、Ｔ３６６Ｉ、Ｔ３６６Ｌ、Ｔ３６６Ｍ、Ｔ３６６Ｋ、Ｔ３６６Ｗ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ｅ、Ｌ３６８Ａ、Ｌ３６８Ｄ、Ｋ３７０Ｓ、Ｎ３９０Ｄ、Ｎ３９０Ｅ、Ｋ３９２Ｌ、Ｋ３９２Ｍ、Ｋ３９２Ｖ、Ｋ３９２Ｆ、Ｋ３９２Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、Ｔ３９４Ｆ、Ｔ３９４Ｗ、Ｄ３９９Ｒ、Ｄ３９９Ｋ、Ｄ３９９Ｖ、Ｓ４００Ｋ、Ｓ４００Ｒ、Ｄ４０１Ｋ、Ｆ４０５Ａ、Ｆ４０５Ｔ、Ｙ４０７Ａ、Ｙ４０７Ｉ、Ｙ４０７Ｖ、Ｋ４０９Ｆ、Ｋ４０９Ｗ、Ｋ４０９Ｄ、Ｔ４１１Ｄ、Ｔ４１１Ｅ、Ｋ４３９Ｄ、およびＫ４３９Ｅが含まれる。

【０１１５】

ある特定の実施形態では、ヒトＩｇＧ１定常領域のＣＨ１に組み込まれ得る突然変異は、アミノ酸Ｖ１２５、Ｆ１２６、Ｐ１２７、Ｔ１３５、Ｔ１３９、Ａ１４０、Ｆ１７０、Ｐ１７１、および／またはＶ１７３であり得る。ある特定の実施形態では、ヒトＩｇＧ１定常領域のＣに組み込まれ得る突然変異は、アミノ酸Ｅ１２３、Ｆ１１６、Ｓ１７６、Ｖ１６３、Ｓ１７４、および／またはＴ１６４であり得る。

【０１１６】

アミノ酸置換は以下の表３にされる置換のセットから選択され得る。

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3		
	第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
セット 1	S364E/F405A	Y349K/T394F
セット 2	S364H/D401K	Y349T/T411E
セット 3	S364H/T394F	Y349T/F405A
セット 4	S364E/T394F	Y349K/F405A
セット 5	S364E/T411E	Y349K/D401K
セット 6	S364D/T394F	Y349K/F405A
セット 7	S364H/F405A	Y349T/T394F
セット 8	S364K/E357Q	L368D/K370S
セット 9	L368D/K370S	S364K
セット 10	L368E/K370S	S364K
セット 11	K360E/Q362E	D401K
セット 12	L368D/K370S	S364K/E357L
セット 13	K370S	S364K/E357Q
セット 14	F405L	K409R
セット 15	K409R	F405L

10

20

【 0 1 1 7 】

代替的に、アミノ酸置換は以下の表 4 に示される置換のセットから選択され得る。

【表 4】

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

30

【 0 1 1 8 】

代替的に、アミノ酸置換は以下の表 5 に示される置換のセットから選択され得る。

【表 5】

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

40

50

【 0 1 1 9 】

代替的に、各ポリペプチド鎖における少なくとも 1 つのアミノ酸置換は表 6 から選択され得る。

【表 6】

表 6	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
L351Y, D399R, D399K, S400K, S400R, Y407A, Y407L, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F, K392D, K392E, K409F, K409W, T411D および T411E

10

【 0 1 2 0 】

代替的に、以下の表 7 における置換のセットから少なくとも 1 つのアミノ酸置換を選択してもよく、ここで「第 1 のポリペプチド」欄に示される位置は、任意の公知の負に帯電したアミノ酸によって置き換えられ、「第 2 のポリペプチド」欄に示される位置は、任意の公知の正に帯電したアミノ酸に置き換えられる。

【表 7】

表 7	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
K392, K370, K409,または K439	D399, E356,または E357

20

【 0 1 2 1 】

代替的に、以下の表 8 におけるセットから少なくとも 1 つのアミノ酸置換を選択してもよく、ここで「第 1 のポリペプチド」欄に示される位置は、任意の公知の負に帯電したアミノ酸によって置き換えられ、「第 2 のポリペプチド」欄に示される位置は、任意の公知の負に帯電したアミノ酸によって置き換えられる。

【表 8】

表 8	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
D399, E356, または E357	K409, K439, K370, または K392

30

【 0 1 2 2 】

代替的に、アミノ酸置換は、以下の表 9 のセットから選択してもよい。

【表 9】

表 9	
第1のポリペプチド	第2のポリペプチド
T350V, L351Y, F405A, および Y407V	T350V, T366L, K392L, および T394W

40

【 0 1 2 3 】

代替的にまたは付加的に、ヘテロ多量体タンパク質の構造安定性は、第 1 または第 2 のポリペプチド鎖のいずれかに S 3 5 4 C を導入し、反対のポリペプチド鎖に Y 3 4 9 C を導入することによって増加させることができ、これにより、2 つのポリペプチドの界面内で人工ジスルフィド架橋が形成する。

【 0 1 2 4 】

上記の多重特異性タンパク質は、当業者に周知の組換え DNA 技術を使用して作製され

50

得る。例えば、第1の免疫グロブリン重鎖をコードする第1の核酸配列を第1の発現ベクターにクローニングすることができ、第2の免疫グロブリン重鎖をコードする第2の核酸配列を第2の発現ベクターにクローニングすることができ、免疫グロブリン軽鎖をコードする第3の核酸配列を第3の発現ベクターにクローニングすることができ、第1、第2および第3の発現ベクターを一緒に宿主細胞に安定にトランスフェクトして多量体タンパク質を産生することができる。

【0125】

多重特異性タンパク質の最も高い収率を達成するために、第1、第2および第3の発現ベクターの異なる比率を調べて宿主細胞へのトランスフェクションのための最適比率を決定することができる。トランスフェクション後、限界希釈、ELISA、FACS、顕微鏡法、またはClonepixなどの当技術分野において公知の方法を使用して、細胞バンク生成のために単クローンを単離することができる。

【0126】

クローンは、バイオリアクタスケールアップに適した条件下で培養することができ、多重特異性タンパク質の発現を維持することができる。多重特異性タンパク質は、遠心分離、深層濾過、細胞溶解、均質化、凍結融解、親和性精製、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用交換クロマトグラフィー、およびミックスモードクロマトグラフィーを含む、当技術分野において公知の方法を使用して単離され、精製され得る。

II. 多重特異性タンパク質の特徴

【0127】

ある特定の実施形態では、NKGD結合ドメインおよびHER2結合ドメインを含む本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質は、ヒトNKGDを発現する細胞に結合する。ある特定の実施形態では、NKGD結合ドメインおよびHER2結合ドメインを含む多重特異性結合タンパク質は、同じHER2結合ドメインを有するモノクローナル抗体のものと比較可能なレベルでHER2に結合する。例えば、NKGD結合ドメインおよびトラスツマブ由来HER2結合ドメインを含む多重特異性結合タンパク質は、トラスツマブのものと比較可能なレベルで、細胞に発現されたHER2に結合できる。

【0128】

しかしながら、本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質は、腫瘍成長を低減させ、がん細胞を殺傷するのにより有効である。例えば、HER2発現腫瘍/がん細胞を標的とする本開示の多重特異性結合タンパク質は、NKGDに対するリガンドである、ULBP-6に連結したトラスツマブに由来するscFvから構築された一本鎖二重特異性分子であるSC2.2よりも効果的である。SC2.2は、HER2+がん細胞およびNKGD+NK細胞に同時に結合する。したがって、HER2+がん細胞の数の減少におけるSC2.2の有効性を調べた。in vitro活性化および細胞傷害性アッセイにより、SC2.2がNK細胞を活性化させ、殺傷するのに有効であることが示された。しかしながら、SC2.2は、RMA/S-HER2皮下腫瘍モデルにおいて有効性を示すことができなかった。SC2.2の有効性も、RMA/S-HER2過剰発現同系マウスモデルを使用してin vivoで試験した(図36)。このマウスモデルにおいて、SC2.2は、ビヒクル対照と比較して腫瘍成長の制御を示すことができなかった(図37)。したがって、SC2.2はNK細胞を活性化させ、殺傷し、HER2+がん細胞に結合するが、これらの特性はHER2+腫瘍成長を効果的に制御するには不十分であった。

【0129】

ある特定の実施形態では、NKGD結合ドメインおよび腫瘍関連抗原に対する結合ドメインを含む、本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質は、抗原を発現する腫瘍細胞と共に培養すると初代ヒトNK細胞を活性化させる。NK細胞の活性化は、CD107aの脱顆粒およびIFN- γ サイトカイン産生量の増加によって示される。さらに、腫瘍関連抗原結合ドメインを含むモノクローナル抗体と比較して、多重特異性結合タンパク質は、抗原を発現する腫瘍細胞の存在下において、ヒトNK細胞の優れた活性化を示す。例えば、モノクローナル抗体トラスツマブと比較して、HER2結合ドメインを有する本開示

10

20

30

40

50

の多重特異性結合タンパク質は、HER2発現がん細胞の存在下においてヒトNK細胞の優れた活性化を有する。

【0130】

ある特定の実施形態では、NKGD結合ドメインおよび腫瘍関連抗原に対する結合ドメインを含む、本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質は、抗原を発現する腫瘍細胞の存在下において、休止ヒトNK細胞およびIL-2活性化ヒトNK細胞の活性を増強する。休止NK細胞は、IL-2活性化NK細胞よりも少ないバックグラウンドIFN産生およびCD107aの脱顆粒を示した。ある特定の実施形態では、休止NK細胞は、IL-2活性化NK細胞と比較して、IFN産生およびCD107aの脱顆粒においてより大きな変化を示す。ある特定の実施形態では、IL-2活性化NK細胞は、TriNKETでの刺激後、より多くのパーセンテージの細胞がIFN + ; CD107a + になることを示す。

10

【0131】

ある特定の実施形態では、NKGD結合ドメインおよび腫瘍関連抗原(CD20、B CMA、およびHER2を含む腫瘍関連抗原の非限定的な例)に対する結合ドメインを含む、本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質は、抗原を発現する腫瘍細胞の存在下において、休止ヒトNK細胞およびIL-2活性化ヒトNK細胞の細胞傷害活性を増強する。さらに、HER2に対する結合ドメインを含む、多重特異性結合タンパク質(例えば、A40 - 多重特異性結合タンパク質、A44 - 多重特異性結合タンパク質、A49 - 多重特異性結合タンパク質、C26 - 多重特異性結合タンパク質、F04 - 多重特異性結合タンパク質、F43 - 多重特異性結合タンパク質、F47 - 多重特異性結合タンパク質、およびF63 - 多重特異性結合タンパク質)は、HER2を含むモノクローナル抗体と比較して、腫瘍細胞に対する活性化NK細胞応答および休止NK細胞応答をより強力に指向する。ある特定の実施形態では、多重特異性結合タンパク質は、HER2結合部位であるモノクローナル抗体と比較して、中程度および低度のHER2を発現する腫瘍細胞に対する利点を提示する。したがって、多重特異性結合タンパク質を含む治療は、モノクローナル抗体治療よりも優れている可能性がある。

20

【0132】

ある特定の実施形態では、HER2に対する結合ドメインを含む、本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質(例えば、A40 - 多重特異性結合タンパク質、A49 - 多重特異性結合タンパク質、C26 - 多重特異性結合タンパク質、F04 - 多重特異性結合タンパク質、F43 - 多重特異性結合タンパク質、F47 - 多重特異性結合タンパク質、およびE79 - 多重特異性結合タンパク質)は、モノクローナル抗体と比較して、Fc受容体(FcR)を高発現するがん、またはFcRのレベルが高い腫瘍微小環境に存在するがんを処置するのに有利である。モノクローナル抗体は、とりわけADCC、CDC、食作用、およびシグナル遮断を含む複数の機構により、腫瘍成長に対するそれらの効果を発揮する。FcRの中でも、CD16がIgGFcに対して最も低い親和性を有し、FcRI(CD64)は、CD16の約1000倍強くIgGFcに結合する高親和性FcRである。CD64は通常、骨髄系系列などの多くの造血系系列で発現し、これらの細胞型に由来する腫瘍、例えば急性骨髄性白血病(AML)で発現する場合がある。MDSおよび単球などの腫瘍に浸潤する免疫細胞もCD64を発現し、腫瘍微小環境に浸潤することが公知である。腫瘍による、または腫瘍微小環境におけるCD64の発現は、モノクローナル抗体療法に有害作用を及ぼし得る。抗体は高親和性受容体に優先的に結合するため、腫瘍微小環境でCD64が発現すると、これらの抗体がNK細胞表面上のCD16と会合することが困難になる。多重特異性結合タンパク質は、NK細胞の表面にある2つの活性化受容体を標的とすることにより、CD64発現(腫瘍におけるものか腫瘍微小環境におけるものかを問わない)がモノクローナル抗体療法に及ぼす有害作用を克服することができる。NK細胞にある2つの活性化受容体の二重標的化により、NK細胞に対するより強い特異的結合がもたらされるため、腫瘍細胞におけるCD64発現にかかわらず、多重特異性結合タンパク質は、あらゆる腫瘍細胞に対するヒトNK細胞応答を媒介することがで

30

40

50

きる。

【 0 1 3 3 】

一部の実施形態では、H E R 2 に対する結合ドメインを含む、本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質（例えば、A 4 0 - 多重特異性結合タンパク質、A 4 9 - 多重特異性結合タンパク質、C 2 6 - 多重特異性結合タンパク質、F 0 4 - 多重特異性結合タンパク質、F 4 3 - 多重特異性結合タンパク質、F 4 7 - 多重特異性結合タンパク質、および E 7 9 - 多重特異性結合タンパク質）は、オンターゲット・オフ腫瘍（on-target off-tumor）副作用の低減によって、より良好な安全性プロファイルをもたらす。ナチュラルキラー細胞および C D 8⁺ T 細胞が腫瘍細胞から正常な自己を認識する機構は異なるが、N K 細胞および C D 8⁺ T 細胞はいずれも、腫瘍細胞を直接的に溶解させることができる。N K 細胞の活性は、活性化受容体（N C R、N K G 2 D、C D 1 6 など）および阻害性受容体（K I R、N K G 2 A など）からのシグナルのバランスによって調節される。これらの活性化シグナルおよび阻害性シグナルのバランスにより、N K 細胞が、ストレスを受けた自己細胞、ウイルスに感染した自己細胞、または形質転換した自己細胞から健康な自己細胞を判定することが可能になる。この「内蔵された」自己寛容機構は、正常で健康な組織を N K 細胞応答から保護するのに役立つ。この原理を拡大適用すると、N K 細胞の自己寛容により、多重特異性結合タンパク質が、腫瘍外の副作用を伴わず、または治療域の増加を伴って、自己および腫瘍の両方で発現する抗原を標的とすることが可能になる。ナチュラルキラー細胞とは異なり、T 細胞は、活性化およびエフェクター機能のために、M H C 分子によって提示される特定のペプチドの認識を必要とする。T 細胞は免疫療法の主要な標的であり、腫瘍に対する T 細胞応答を再指向するために多くの方策が立てられてきた。T 細胞二重特異性薬、チェックポイント阻害剤、および C A R - T 細胞はすべて F D A に承認されているが、用量制限毒性を有することが多い。T 細胞二重特異性薬および C A R - T 細胞は、結合ドメインを使用して腫瘍細胞の表面にある抗原を標的とすること、および工学操作されたシグナル伝達ドメインを使用して活性化シグナルをエフェクター細胞に伝達することにより、T C R - M H C 認識システムを回避する。これらの療法は、抗腫瘍免疫応答を誘発するのに効果的ではあるが、サイトカイン放出症候群（C R S）およびオンターゲット・オフ腫瘍副作用を伴うことが多い。これに関連して、多重特異性結合タンパク質が独特であるのは、N K 細胞の活性化および阻害の天然のシステムを「無効化」しないからである。むしろ多重特異性結合タンパク質は、このバランスを傾け、N K の健康な自己に対する寛容性を維持しながら、さらなる活性化シグナルを N K 細胞にもたらしようにデザインされている。

【 0 1 3 4 】

一部の実施形態では、H E R 2 に対する結合ドメインを含む、N K G 2 D 結合ドメイン（例えば、A 4 0 - 多重特異性結合タンパク質、A 4 9 - 多重特異性結合タンパク質、C 2 6 - 多重特異性結合タンパク質、F 0 4 - 多重特異性結合タンパク質、F 4 3 - 多重特異性結合タンパク質、F 4 7 - 多重特異性結合タンパク質、および E 7 9 - 多重特異性結合タンパク質）を含む本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質は、同じ腫瘍抗原結合ドメインを含むモノクローナル抗体より効果的に腫瘍の進行を遅延させる。一部の実施形態では、N K G 2 D 結合ドメインおよび腫瘍抗原結合ドメインを含む多重特異性結合タンパク質は、同じ腫瘍抗原結合ドメインを含むモノクローナル抗体よりがん転移に対して効果的である。

I I I . 治療用途

【 0 1 3 5 】

本発明は、本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質および / または本明細書に記載の医薬組成物を使用してがんを処置するための方法を提供する。本方法は、それを必要とする患者に、本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質を治療有効量で投与することにより、H E R 2 を発現する種々のがんを処置するために使用され得る。

【 0 1 3 6 】

この治療方法は、処置されるがんによって特徴付けられ得る。例えば、ある特定の実施

形態では、がんは、乳がん、卵巣がん、食道がん、膀胱がんおよび胃がん、唾液管癌、唾液管癌、肺の腺癌ならびに子宮漿液性内膜癌などの侵襲性の形態の子宮がんである。

【 0 1 3 7 】

治療方法は、処置されるがんによって特徴付けられ得る。例えば、特定の実施形態では、がんは固形腫瘍である。ある特定の他の実施形態では、がんは、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、白血病、肺がん、肝がん、黒色腫、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん、胃がん、精巣がん、または子宮がんである。さらに他の実施形態では、がんは、扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、黒色腫、神経芽細胞腫、肉腫（例えば、血管肉腫または軟骨肉腫）、喉頭がん、耳下腺がん、胆道がん（biliary tract cancer）、甲状腺がん、末端黒子型黒色腫、日光角化症、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、腺様嚢胞癌（adenoid cystic carcinoma）、腺腫、腺肉腫、腺扁平上皮癌、肛門管がん、肛門がん、肛門直腸がん、星細胞系腫瘍、バルトリン腺癌、基底細胞癌、胆管がん、骨がん、骨髄がん、気管支がん、気管支腺癌、カルチノイド、胆管細胞癌、軟骨肉腫（chondrosarcoma）、脈絡叢乳頭腫（choriod plexus papilloma）/細胞腫、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、明細胞癌、結合組織がん、嚢胞腺腫、消化器系がん、十二指腸がん、内分泌系がん、卵黄嚢腫瘍、子宮内膜増殖症、子宮内膜間質肉腫、類内膜腺癌、内皮細胞がん、上衣がん、上皮細胞がん、ユーイング肉腫、眼および眼窩のがん、女性性器がん、限局性結節性過形成、胆嚢がん、胃噴門がん、胃底部がん、ガストリン産生腫瘍、神経膠芽腫、グルカゴン産生腫瘍、心臓がん、血管芽腫（hemangioblastoma）、血管内皮腫、血管腫、肝腺腫、肝腺腫症、肝胆道がん、肝細胞癌、ホジキン病、回腸がん、インスリノーマ、上皮内新生物（intraepithelial neoplasia）、上皮間扁平細胞新生物（interepithelial squamous cell neoplasia）、肝内胆管がん、浸潤性扁平上皮癌、空腸がん、関節がん、カポジ肉腫、骨盤がん、大細胞癌、大腸がん、平滑筋肉腫、悪性黒子由来黒色腫、リンパ腫、男性生殖器がん、悪性黒色腫、悪性中皮腫、髄芽腫、髄上皮腫、髄膜がん、中皮がん、転移性癌、口がん、粘表皮癌、多発性骨髄腫、筋肉がん、鼻腔がん、神経系がん、神経上皮腺癌結節性黒色腫、非上皮性皮膚がん、非ホジキンリンパ腫、燕麦細胞癌、乏突起膠細胞がん、口腔がん、骨肉腫、漿液性乳頭腺がん、陰茎がん、咽頭がん、下垂体腫瘍、形質細胞腫、偽肉腫、肺芽腫、直腸がん、腎細胞癌、呼吸器系がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、漿液性細胞腫、副鼻腔がん、皮膚がん、小細胞癌、小腸がん、平滑筋がん、軟部組織がん、ソマトスタチン分泌腫瘍、脊椎がん、扁平上皮癌、横紋筋がん、中皮下がん、表在拡大型黒色腫、T細胞白血病、舌がん、未分化癌、尿管がん、尿道がん、膀胱がん、泌尿器系がん、子宮頸部がん、子宮体がん、ぶどう膜黒色腫、膣がん、疣状癌、VIP産生腫瘍、外陰部がん、高分化癌、またはウィルムス腫瘍である。

【 0 1 3 8 】

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

【 0 1 3 9 】

処置されるがんは、がん細胞の表面で発現する特定の抗原の存在によって特徴付けられ得る。ある特定の実施形態では、がん細胞は、HER2に加えて、以下：CD2、CD19、CD20、CD30、CD38、CD40、CD52、CD70、EGFR/ERB

10

20

30

40

50

B 1、I G F 1 R、H E R 3 / E R B B 3、H E R 4 / E R B B 4、M U C 1、c M E T、S L A M F 7、P S C A、M I C A、M I C B、T R A I L R 1、T R A I L R 2、M A G E - A 3、B 7 . 1、B 7 . 2、C T L A 4、および P D 1 のうちの 1 つまたは複数を発現し得る。

I V . 併用療法

【 0 1 4 0 】

本発明の別の態様は併用療法を提供する。本明細書に記載の多重特異性結合タンパク質は、がんを処置するためにさらなる治療剤と組み合わせて使用される。

【 0 1 4 1 】

がんを処置する際の併用療法の一部として使用され得る例示的な治療剤には、例えば、放射線、マイトマイシン、トレチノイン、リボムスチン、ゲムシタビン、ビンクリスチン、エトポシド、クラドリピン、ミトブロニトール、メトトレキサート、ドキソルビシン、カルボコン、ペントスタチン、ニトラクリン、ジノスタチン、セトロレリクス、レトロゾール、ラルチトレキセド、ダウノルビシン、ファドロゾール、フォテムスチン、チマルファシン、ソブゾキサン、ネダブラチン、シタラビン、ピカルタミド、ビノレルビン、ベスナリノン、アミノグルテチミド、アムサクリン、プログルミド、酢酸エリブチニウム、ケタンセリン、ドキシフルリジン、エトレチナート、イソトレチノイン、ストレプトゾシン、ニムスチン、ビンデシン、フルタミド、ドロゲニル、プトシン、カルモフル、ラゾキサン、シゾフィラン、カルボプラチン、ミトラクトール、テガフル、イホスファミド、ブレドニムスチン、ピシバニール、レバミゾール、テニポシド、インプロスルファン、エノシタビン、リスリド、オキシメトロン、タモキシフェン、プロゲステロン、メピチオスタン、エピチオスタノール、ホルメスタン、インターフェロン - アルファ、インターフェロン - 2 アルファ、インターフェロン - ベータ、インターフェロン - ガンマ、コロナー刺激因子 - 1、コロナー刺激因子 - 2、デニロイキンディフティトックス、インターロイキン - 2、黄体形成ホルモン放出因子、ならびにその同種受容体に対して特異な結合、および増加したまたは減少した血清半減期を示し得る上述の薬剤の変形型が含まれる。

【 0 1 4 2 】

がんを処置する際の併用療法の一部として使用され得る薬剤のさらなるクラスは免疫チェックポイント阻害剤である。例示的な免疫チェックポイント阻害剤には、(i) 細胞傷害性 T リンパ球関連抗原 4 (C T L A 4)、(i i) プログラム細胞死タンパク質 1 (P D 1)、(i i i) P D L 1、(i v) L A G 3、(v) B 7 - H 3、(v i) B 7 - H 4、および (v i i) T I M 3 のうちの 1 つまたは複数を阻害する薬剤が含まれる。C T L A 4 阻害剤であるイピリムマブは、黒色腫を処置するために米国食品医薬品局によって承認されている。

【 0 1 4 3 】

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

【 0 1 4 4 】

抗がん剤のさらに他のカテゴリーには、例えば、(i) A L K 阻害剤、A T R 阻害剤、A 2 A アンタゴニスト、塩基除去修復阻害剤、B c r - A b l チロシンキナーゼ阻害剤、ブルトン型チロシンキナーゼ阻害剤、C D C 7 阻害剤、C H K 1 阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、D N A - P K 阻害剤、D N A - P K および m T O R の両方の阻害剤、D N M T 1 阻害剤、D N M T 1 阻害剤 + 2 - クロロ - デオキシアデノシン、H D A C 阻害剤、ヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤、I D O 阻害剤、J A K 阻害剤、m T O R 阻害剤、M E K 阻害剤、M E L K 阻害剤、M T H 1 阻害剤、P A R P 阻害剤、ホスホイノシチド 3 - キナーゼ阻害剤、P A R P 1 および D H O D H の両方の阻害剤、プロテアソーム阻害剤、トポイソメラーゼ - I I 阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、V E G F R 阻害剤、ならびに W E E 1 阻害剤から選択される阻害剤；(i i) O X 4 0、C D 1 3 7、C D 4 0、G I T R、C D 2 7、H V E M、T N F R S F 2 5、または I C O S のアゴニスト；な

10

20

30

40

50

らびに (i i i) I L - 1 2、I L - 1 5、G M - C S F、および G - C S F から選択されるサイトカインが含まれる。

【 0 1 4 5 】

本発明のタンパク質はまた、原発病巣の外科的除去の補助として使用され得る。

【 0 1 4 6 】

多重特異性結合タンパク質およびさらなる治療剤の量ならびに投与の相対的タイミングは、所望の併用療法効果を達成するために選択され得る。例えば、このような投与を必要とする患者に併用療法を投与する場合、組み合わせる治療剤、または治療剤を含む1つもしくは複数の医薬組成物は、例えば、連続的に、併せて、一緒に、同時になどの任意の順序で投与され得る。さらに、例えば、多重特異性結合タンパク質は、さらなる治療剤がその予防効果または治療効果を発揮する時間の間投与されてもよく、またはその逆であってもよい。

10

V . 医薬組成物

【 0 1 4 7 】

本開示はまた、治療有効量の本明細書に記載のタンパク質を含有する医薬組成物を特徴とする。組成物は、種々の薬物送達系で使用されるように製剤化することができる。適切な製剤を作るために、1種または複数の生理学的に許容される賦形剤または担体を組成物に含めることもできる。本開示で使用される好適な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Company、Philadelphia、Pa.、第17版、1985年に見出される。薬物送達のための方法に関する簡潔な概説については、例えば、Langer (Science、249巻：1527～1533頁、1990年)を参照されたい。

20

【 0 1 4 8 】

本開示の静脈内薬物送達製剤は、バッグ、ペン、または注射器に含有されてもよい。ある特定の実施形態では、バッグはチューブおよび/または針を含むチャンネルに接続されてもよい。ある特定の実施形態では、製剤は凍結乾燥製剤または液体製剤であってもよい。ある特定の実施形態では、製剤はフリーズドライ(凍結乾燥)されてもよく、約12～60個のバイアルに含有されてもよい。ある特定の実施形態では、製剤はフリーズドライされてもよく、45mgのフリーズドライされた製剤が1個のバイアルに含有されてもよい。ある特定の実施形態では、約40mg～約100mgのフリーズドライされた製剤が1個のバイアルに含有されてもよい。ある特定の実施形態では、12、27、または45個のバイアルからのフリーズドライされた製剤は、静脈内薬物製剤中に治療用量のタンパク質を得るために組み合わせられてもよい。ある特定の実施形態では、製剤は液体製剤であってもよく、約250mg/バイアル～約1000mg/バイアルとして保存されてもよい。ある特定の実施形態では、製剤は液体製剤であってもよく、約600mg/バイアルとして保存されてもよい。ある特定の実施形態では、製剤は液体製剤であってもよく、約250mg/バイアルとして保存されてもよい。

30

【 0 1 4 9 】

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

【 0 1 5 0 】

40

これらの組成物は従来の滅菌技術によって滅菌されてもよく、または濾過滅菌されてもよい。得られた水溶液はそのまま使用するためにパッケージ化されてもよく、または凍結乾燥されてもよく、凍結乾燥された調製物は投与前に滅菌水性担体と組み合わせられる。調製物のpHは、典型的に、3から11の間、より好ましくは5から9の間または6から8の間、最も好ましくは7から8の間、例えば7～7.5である。得られた固形の組成物は複数の単回用量単位でパッケージ化されてもよく、各々は一定量の上述の1つまたは複数の薬剤を含有する。固形の組成物はまた、柔軟な量のための容器にパッケージ化されてもよい。

【 0 1 5 1 】

ある特定の実施形態では、本開示は、マンニトール、クエン酸一水和物、クエン酸ナト

50

リウム、リン酸二ナトリウム二水和物、リン酸二水素ナトリウム二水和物、塩化ナトリウム、ポリソルベート 80、水、および酸化ナトリウムと組み合わせて本開示のタンパク質を含む、延長された貯蔵寿命を有する製剤を提供する。

【0152】

ある特定の実施形態では、pH 緩衝溶液中に本開示のタンパク質を含む水性製剤が調製される。本発明の緩衝液は、約 4 ~ 約 8、例えば、約 4.5 ~ 約 6.0、もしくは約 4.8 ~ 約 5.5 の範囲の pH を有してもよく、または約 5.0 ~ 約 5.2 の pH を有してもよい。上記に列挙した pH の中間の範囲も、本開示の一部であることが意図される。例えば、上限および / または下限として上記に列挙した値のいずれかの組合せを使用する値の範囲が含まれることが意図される。pH をこの範囲内に制御する緩衝液の例には、酢酸塩（例えば、酢酸ナトリウム）、コハク酸塩（コハク酸ナトリウムなど）、グルコン酸塩、ヒスチジン、クエン酸塩および他の有機酸緩衝液が含まれる。

10

【0153】

ある特定の実施形態では、製剤は、pH を約 4 ~ 約 8 の範囲に維持するためにクエン酸塩およびリン酸塩を含有する緩衝系を含む。ある特定の実施形態では、pH の範囲は、約 4.5 ~ 約 6.0、または約 pH 4.8 ~ 約 5.5、または約 5.0 ~ 約 5.2 の pH 範囲であってもよい。ある特定の実施形態では、緩衝系には、クエン酸一水和物、クエン酸ナトリウム、リン酸二ナトリウム二水和物、および / またはリン酸二水素ナトリウム二水和物が含まれる。ある特定の実施形態では、緩衝系は、約 1.3 mg / ml のクエン酸（例えば、1.305 mg / ml）、約 0.3 mg / ml のクエン酸ナトリウム（例えば、0.305 mg / ml）、約 1.5 mg / ml のリン酸二ナトリウム二水和物（例えば、1.53 mg / ml）、約 0.9 mg / ml のリン酸二水素ナトリウム二水和物（例えば、0.86）、および約 6.2 mg / ml の塩化ナトリウム（例えば、6.165 mg / ml）を含む。ある特定の実施形態では、緩衝系は、1 ~ 1.5 mg / ml のクエン酸、0.25 ~ 0.5 mg / ml のクエン酸ナトリウム、1.25 ~ 1.75 mg / ml のリン酸二ナトリウム二水和物、0.7 ~ 1.1 mg / ml のリン酸二水素ナトリウム二水和物、および 6.0 ~ 6.4 mg / ml の塩化ナトリウムを含む。ある特定の実施形態では、製剤の pH は水酸化ナトリウムを用いて調整される。

20

【0154】

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

30

40

【0155】

洗剤または界面活性剤もまた、製剤に添加してもよい。例示的な洗剤としては、ポリソルベート（例えば、ポリソルベート 20、80 など）またはボロクサマー（例えば、ボロクサマー 188）などの非イオン性洗剤が挙げられる。添加される洗剤の量は、製剤化された抗体の凝集を低減させ、かつ / または製剤中の微粒子の形成を最低限に抑え、かつ / または吸着を低減させるようなものである。ある特定の実施形態では、製剤は、ポリソルベートである界面活性剤を含み得る。ある特定の実施形態では、製剤は、洗剤のポリソルベート 80 または Tween 80 を含有し得る。Tween 80 は、ポリオキシエチレン（20）ソルピタンモノオレエートを表すために使用される用語である（Fiedler、Lex

50

ikon der Hifsstoffe、Editio Cantor Verlag Aulendorf、第4版、1996年を参照されたい)。ある特定の実施形態では、製剤は、約0.1mg/mLから約10mg/mLの間のポリソルベート80、または約0.5mg/mLから約5mg/mLの間を含有し得る。ある特定の実施形態では、約0.1%のポリソルベート80が製剤に添加され得る。

【0156】

実施形態では、本開示のタンパク質産物は、液体製剤として製剤化される。液体製剤は、ゴム栓で閉じ、アルミニウムクリンプシールクロージャで密封した、USP/PhEurいずれかのタイプI 50Rバイアルにおいて、10mg/mLの濃度で提供され得る。栓は、USPおよびPhEurに準拠したエラストマーで作られていてもよい。ある特定の実施形態では、60mLの採取容量を可能にするために、バイアルに61.2mLのタンパク質産物溶液が充填され得る。ある特定の実施形態では、液体製剤は、0.9%の生理食塩水で希釈され得る。

10

【0157】

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

20

【0158】

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

【0159】

凝集に加えて、脱アミドは、発酵、採取/細胞清澄化、精製、薬物物質/薬物製品貯蔵の間および試料分析の間に発生し得るペプチドおよびタンパク質の一般的な産物のバリエーションである。脱アミドは、加水分解を受け得るスクシンイミド中間体を形成するタンパク質からのNH₃の喪失である。スクシンイミド中間体は、親ペプチドの17ダルトンの質量減少をもたらす。その後の加水分解は、18ダルトンの質量増加をもたらす。スクシンイミド中間体の単離は、水性条件下での不安定性に起因して困難である。したがって、脱アミドは、典型的に1ダルトンの質量増加として検出可能である。アスパラギンの脱アミドは、アスパラギン酸またはイソアスパラギン酸のいずれかを生じる。脱アミドの速度に影響を及ぼすパラメータには、pH、温度、溶媒誘電率、イオン強度、一次配列、局所ポリペプチド立体配座および三次構造が含まれる。ペプチド鎖におけるAsnに隣接するアミノ酸残基は、脱アミド化速度に影響を及ぼす。タンパク質配列におけるAsnに続くGlyおよびSerは、脱アミドに対してより高い感受性を生じる。

30

【0160】

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

40

【0161】

本明細書における目的の水性担体は、薬学的に許容され（ヒトへの投与に安全かつ無毒であり）、液体製剤の調製に有用であるものである。例示的な担体には、注射用滅菌水（SWFI）、注射用静菌水（BWF I）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンガー液またはデキストロース溶液が含まれる。

【0162】

保存剤は必要に応じて、細菌作用を低減させるために本明細書における製剤に添加することができる。保存剤の添加は、例えば、多数回使用（複数回投与）製剤の製造を容易にすることができる。

【0163】

50

静脈内（IV）製剤は、患者が、移植後に入院しており、IV経路を介してすべての薬物を受けている場合などの特定の場合に好ましい投与経路であり得る。ある特定の実施形態では、液体製剤は、投与前に0.9%の塩化ナトリウム溶液により希釈される。ある特定の実施形態では、注射のための希釈された薬物製品は等張であり、静脈内注入による投与に適している。

【0164】

ある特定の実施形態では、塩または緩衝成分は10mM～200mMの量で添加することができる。塩および/または緩衝液は薬学的に許容され、「塩基形成」金属またはアミンを用いて種々の公知の酸（無機および有機）から誘導される。ある特定の実施形態では、緩衝液はリン酸緩衝液であり得る。ある特定の実施形態では、緩衝液は、グリシネート、炭酸、クエン酸緩衝液であってもよく、これらの場合、ナトリウム、カリウムまたはアンモニウムイオンが対イオンとして機能し得る。

10

【0165】

保存剤は必要に応じて、細菌作用を低減させるために本明細書における製剤に添加することができる。保存剤の添加は、例えば、多数回使用（複数回投与）製剤の製造を容易にすることができる。

【0166】

本明細書における目的の水性担体は、薬学的に許容され（ヒトへの投与に安全かつ無毒であり）、液体製剤の調製に有用であるものである。例示的な担体には、注射用滅菌水（SWFI）、注射用静菌水（BWFI）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンガー液またはデキストロース溶液が含まれる。

20

【0167】

本開示は、タンパク質およびリオプロテクタントを含む凍結乾燥製剤として存在することもできる。リオプロテクタントは糖、例えば二糖であり得る。ある特定の実施形態では、リオプロテクタント（lycoprotectant）は、スクロースまたはマルトースであり得る。凍結乾燥製剤は、緩衝剤、界面活性剤、増量剤、および/または保存剤のうちの1つまたは複数を含んでもよい。

【0168】

凍結乾燥された薬物製品の安定化に有用なスクロースまたはマルトースの量は、少なくとも1:2のタンパク質対スクロースまたはマルトースの重量比であり得る。ある特定の実施形態では、タンパク質対スクロースまたはマルトースの重量比は1:2～1:5であり得る。

30

【0169】

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

【0170】

凍結乾燥前に、本開示のタンパク質を含有する溶液のpHは6から8の間に調整され得る。ある特定の実施形態では、凍結乾燥した薬物製品についてのpH範囲は7～8であり得る。

40

【0171】

ある特定の実施形態では、塩または緩衝成分は10mM～200mMの量で添加することができる。塩および/または緩衝液は薬学的に許容され、「塩基形成」金属またはアミンを用いて種々の公知の酸（無機および有機）から誘導される。ある特定の実施形態では、緩衝液はリン酸緩衝液であり得る。ある特定の実施形態では、緩衝液は、グリシネート、炭酸、クエン酸緩衝液であってもよく、これらの場合、ナトリウム、カリウムまたはアンモニウムイオンが対イオンとして機能し得る。

【0172】

ある特定の実施形態では、「増量剤」を添加することができる。「増量剤」は、凍結乾

50

乾燥混合物に質量を付加し、凍結乾燥ケーキの物理的構造に寄与する（例えば、開放気孔構造を維持する本質的に均一な凍結乾燥ケーキの製造を容易にする）化合物である。例示的な増量剤には、マンニトール、グリシン、ポリエチレングリコールおよびソルビトールが含まれる。本発明の凍結乾燥製剤はこのような増量剤を含有し得る。

【0173】

保存剤は必要に応じて、細菌作用を低減させるために本明細書における製剤に添加することができる。保存剤の添加は、例えば、多数回使用（複数回投与）製剤の製造を容易にすることができる。

【0174】

ある特定の実施形態では、凍結乾燥薬物製品は水性担体で構成され得る。本明細書における目的の水性担体は、薬学的に許容され（例えば、ヒトへの投与に安全かつ無毒であり）、凍結乾燥後、液体製剤の調製に有用であるものである。例示的な希釈剤には、注射用滅菌水（SWFI）、注射用静菌水（BWFI）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩水、リンガー液またはデキストロース溶液が含まれる。

10

【0175】

ある特定の実施形態では、本開示の凍結乾燥薬物製品は、注射用滅菌水、USP（SWFI）または0.9%の塩化ナトリウム注射液、USPのいずれかで再構成される。再構成の間、凍結乾燥粉末は溶液に溶解する。

【0176】

ある特定の実施形態では、本開示の凍結乾燥タンパク質製品は、約4.5 mLの注射用水に構成され、0.9%の生理食塩水溶液（塩化ナトリウム溶液）により希釈される。

20

【0177】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、患者に毒性を生じず、特定の患者、組成物、および投与様式に対して所望の治療応答を達成するのに有効である活性成分の量を得るように変化し得る。

【0178】

特定の用量は、各患者に対して均一な用量、例えば、50～5000 mgのタンパク質であってもよい。代替的に、患者の用量は、患者のおおよその体重または表面積に合わせられ得る。適切な投薬量を決定する際の他の要因には、処置または予防される疾患または状態、疾患の重症度、投与経路、ならびに患者の年齢、性別および医学的状态が含まれ得る。処置のための適切な投薬量を決定するために必要な計算のさらなる改良は、特に、本明細書に開示される投薬量情報およびアッセイを考慮して当業者によって慣用的になされる。投薬量はまた、適切な用量応答データと併せて使用される投薬量を決定するための公知のアッセイの使用によって決定することができる。個々の患者の投薬量は、疾患の進行がモニターされるにつれて調節されてもよい。患者における標的化可能な構築物または複合物の血中レベルは、有効濃度に達するか、または有効濃度を維持するように投薬量が調節される必要があるかどうかを調べるために測定され得る。どの標的化可能な構築物および/または複合物、ならびにそれらの投薬量が、所与の個体に対して効果的である可能性が高いかを決定するために薬理ゲノム学が使用され得る（Schmitzら、Clinica Chimica Acta 308巻：43～53頁、2001年；Steimerら、Clinica Chimica Acta 308巻：33～41頁、2001年）。

30

40

【0179】

一般に、体重に基づく投薬量は、約0.01 μg～約100 mg/kg体重、例えば、約0.01 μg～約100 mg/kg体重、約0.01 μg～約50 mg/kg体重、約0.01 μg～約10 mg/kg体重、約0.01 μg～約1 mg/kg体重、約0.01 μg～約100 μg/kg体重、約0.01 μg～約50 μg/kg体重、約0.01 μg～約10 μg/kg体重、約0.01 μg～約1 μg/kg体重、約0.01 μg～約0.1 μg/kg体重、約0.1 μg～約100 mg/kg体重、約0.1 μg～約50 mg/kg体重、約0.1 μg～約10 mg/kg体重、約0.1 μg～約1 mg/kg体重、約0.1 μg～約100 μg/kg体重、約0.1 μg～約10 μg/kg体重

50

、約 0.1 μg ~ 約 1 μg / kg 体重、約 1 μg ~ 約 100 mg / kg 体重、約 1 μg ~ 約 50 mg / kg 体重、約 1 μg ~ 約 10 mg / kg 体重、約 1 μg ~ 約 1 mg / kg 体重、約 1 μg ~ 約 100 μg / kg 体重、約 1 μg ~ 約 50 μg / kg 体重、約 1 μg ~ 約 10 μg / kg 体重、約 10 μg ~ 約 100 mg / kg 体重、約 10 μg ~ 約 50 mg / kg 体重、約 10 μg ~ 約 10 mg / kg 体重、約 10 μg ~ 約 1 mg / kg 体重、約 10 μg ~ 約 100 μg / kg 体重、約 10 μg ~ 約 50 μg / kg 体重、約 50 μg ~ 約 100 mg / kg 体重、約 50 μg ~ 約 50 mg / kg 体重、約 50 μg ~ 約 10 mg / kg 体重、約 50 μg ~ 約 1 mg / kg 体重、約 50 μg ~ 約 100 μg / kg 体重、約 100 μg ~ 約 100 mg / kg 体重、約 100 μg ~ 約 50 mg / kg 体重、約 100 μg ~ 約 10 mg / kg 体重、約 100 μg ~ 約 1 mg / kg 体重、約 1 mg ~ 約 100 mg / kg 体重、約 1 mg ~ 約 50 mg / kg 体重、約 1 mg ~ 約 10 mg / kg 体重、約 10 mg ~ 約 100 mg / kg 体重、約 10 mg ~ 約 50 mg / kg 体重、約 50 mg ~ 約 100 mg / kg 体重である。

【0180】

用量は、1日に1回もしくは複数回、1週間に1回もしくは複数回、1ヶ月に1回もしくは複数回または1年に1回もしくは複数回、またはさらに2~20年に1回与えられ得る。当業者は、体液または組織中の標的化可能な構築物または複合体の測定された滞留時間および濃度に基づいて投薬のための反復率を容易に推定することができる。本発明の投与は、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、髄腔内、腔内であってもよく、カテーテルを介する灌流によってでもよく、または直接的な病巣内注射によってでもよい。これは、1日に1回または複数回、1週間に1回または複数回、1ヶ月に1回または複数回、および1年に1回または複数回、投与され得る。

【0181】

上記の説明は本発明の複数の態様および実施形態を記載している。本出願は特に、態様および実施形態のすべての組合せおよび置換を意図する。

【実施例】

【0182】

ここで概して記載されている本発明は、以下の実施例を参照することによってより容易に理解され、これらの実施例は本発明のある特定の態様および実施形態の例示の目的のためにのみ含まれ、本発明を限定することを意図していない。

(実施例1)

NKG2D結合ドメインはNKG2Dに結合する
NKG2D結合ドメインは精製した組換えNKG2Dに結合する

【0183】

ヒト、マウスまたはカニクイザルNKG2D細胞外ドメインの核酸配列を、ヒトIgG1Fcドメインをコードする核酸配列と融合させ、発現させる哺乳動物細胞に導入した。精製後、NKG2D-Fc融合タンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させた。非特異的結合を防ぐためにウシ血清アルブミンでウェルを阻止した後、NKG2D結合ドメインを滴定し、NKG2D-Fc融合タンパク質を予め吸着させたウェルに添加した。一次抗体結合を、西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートし、Fc交差反応を回避するためにヒトカップ軽鎖を特異的に認識する二次抗体を使用して検出した。西洋ワサビペルオキシダーゼに対する基質である3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)をウェルに添加して結合シグナルを可視化し、その吸光度を450nmにて測定し、540nmにて補正した。NKG2D結合ドメインクローン、アイソタイプ対照または陽性対照(配列番号45~48、またはeBioscienceにて入手可能な抗マウスNKG2DクローンMI-6およびCX-5から選択した)を各ウェルに添加した。

【0184】

アイソタイプ対照は組換えNKG2D-Fcタンパク質に対してわずかな結合を示したが、陽性対照が組換え抗原に対して最も強く結合した。クローン毎に親和性は異なったが、すべてのクローンによって産生されたNKG2D結合ドメインが、ヒト、マウス、およ

びカニクイザルの組換えNK G 2 D - F cタンパク質のすべてで結合を示した。概して、各抗NK G 2 Dクローンは、ヒト（図3）およびカニクイザル（図4）の組換えNK G 2 D - F cに同様の親和性で結合したが、マウス（図5）の組換えNK G 2 D - F cに対する親和性は比較的低かった。

NK G 2 D結合ドメインはNK G 2 Dを発現する細胞に結合する

【0185】

E L 4マウスリンパ腫細胞株を、ヒトまたはマウスのNK G 2 D - C D 3ゼータシグナル伝達ドメインキメラ抗原受容体を発現するように工学操作した。NK G 2 D結合クローン、アイソタイプ対照または陽性対照を100 nM濃度にて使用して、E L 4細胞において発現した細胞外NK G 2 Dを染色した。フルオロフォアコンジュゲート抗ヒトI g G二次抗体を使用して抗体結合を検出した。細胞をフローサイトメトリーによって分析し、親E L 4細胞と比較したNK G 2 D発現細胞の平均蛍光強度（M F I）を使用してバックグラウンドに対する倍率（F O B）を計算した。

【0186】

すべてのクローンによって産生されたNK G 2 D結合ドメインが、ヒトおよびマウスのNK G 2 Dを発現するE L 4細胞に結合した。陽性対照抗体（配列番号45～48、またはe B i o s c i e n c eにて入手可能な抗マウスNK G 2 DクローンM I - 6およびC X - 5から選択される）が最も良好なF O B結合シグナルをもたらした。各クローンのNK G 2 D結合親和性は、ヒトNK G 2 Dを発現する細胞（図6）とマウスNK G 2 Dを発現する細胞（図7）との間で同様であった。

（実施例2）

NK G 2 D結合ドメインはNK G 2 Dへの天然リガンドの結合を阻止する

U L B P - 6との競合

【0187】

組換えヒトNK G 2 D - F cタンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異的結合を低減させるためにウシ血清アルブミンでウェルを阻止した。飽和濃度のU L B P - 6 - H i s - ビオチンをウェルに添加し、続いてNK G 2 D結合ドメインクローンを添加した。2時間のインキュベーション後、ウェルを洗浄し、NK G 2 D - F cでコーティングされたウェルに結合したままであったU L B P - 6 - H i s - ビオチンを、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびT M B基質とコンジュゲートしたストレプトアビジンによって検出した。吸光度を450 nMにて測定し、540 nMにて補正した。バックグラウンドを差し引いた後、NK G 2 D - F cタンパク質へのNK G 2 D結合ドメインの特異的結合を、ウェル中のNK G 2 D - F cタンパク質への結合を阻止されたU L B P - 6 - H i s - ビオチンのパーセンテージから計算した。陽性対照抗体（配列番号45～48から選択される）および種々のNK G 2 D結合ドメインは、NK G 2 DへのU L B P - 6結合を阻止したが、アイソタイプ対照はU L B P - 6との競合をほとんど示さなかった（図8）。

M I C Aとの競合

【0188】

組換えヒトM I C A - F cタンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異的結合を低減させるためにウシ血清アルブミンでウェルを阻止した。NK G 2 D - F c - ビオチンをウェルに添加し、続いてNK G 2 D結合ドメインを添加した。インキュベーションおよび洗浄後、M I C A - F cでコーティングされたウェルに結合したままであったNK G 2 D - F c - ビオチンを、ストレプトアビジン - H R PおよびT M B基質を使用して検出した。吸光度を450 nMにて測定し、540 nMにて補正した。バックグラウンドを差し引いた後、NK G 2 D - F cタンパク質へのNK G 2 D結合ドメインの特異的結合を、M I C A - F cでコーティングされたウェルへの結合を阻止されたNK G 2 D - F c - ビオチンのパーセンテージから計算した。陽性対照抗体（配列番号45～48から選択される）および種々のNK G 2 D結合ドメインはNK G 2 DへのM I C A結合を阻止したが、アイソタイプ対照はM I C Aとの競合をほとんど示さなかった（図9）。

R a e - 1デルタとの競合

【0189】

組換えマウス R a e - 1 デルタ - F c (R & D S y s t e m s から購入した) をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異的結合を低減させるためにウェルをウシ血清アルブミンで阻止した。マウス N K G 2 D - F c - ビオチンをウェルに添加し、続いて N K G 2 D 結合ドメインを添加した。インキュベーションおよび洗浄後、R a e - 1 デルタ - F c でコーティングされたウェルに結合したままであった N K G 2 D - F c - ビオチンを、ストレプトアビジン - H R P および T M B 基質を使用して検出した。吸光度を 4 5 0 n M にて測定し、5 4 0 n M にて補正した。バックグラウンドを差し引いた後、N K G 2 D - F c タンパク質への N K G 2 D 結合ドメインの特異的結合を、R a e - 1 デルタ - F c でコーティングされたウェルへの結合を阻止された N K G 2 D - F c - ビオチンのパーセンテージから計算した。陽性対照抗体 (配列番号 4 5 ~ 4 8、または e B i o s c i e n c e にて入手可能な抗マウス N K G 2 D クローン M I - 6 および C X - 5 から選択される) および種々の N K G 2 D - 結合ドメインクローンはマウス N K G 2 D への R a e - 1 デルタ結合を阻止したが、アイソタイプ対照抗体は R a e - 1 デルタとの競合をほとんど示さなかった (図 1 0)。

10

(実施例 3)

N K G 2 D 結合ドメインクローンは N K G 2 D を活性化させる

【0190】

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

20

【0191】

N K G 2 D 結合ドメインが N K G 2 D を活性化させるかどうかを判定するために、それらをマイクロプレートのウェルに吸着させ、抗体断片でコーティングされたウェルにおいて N K G 2 D - C A R E L 4 細胞をプレフェルジン - A およびモネンシンの存在下で 4 時間にわたって培養した。N K G 2 D 活性化の指標である細胞内 T N F 産生をフローサイトメトリーによってアッセイした。陽性対照で処置した細胞に対して T N F 陽性細胞のパーセンテージを正規化した。すべての N K G 2 D 結合ドメインがヒト N K G 2 D (図 1 1) およびマウス N K G 2 D (図 1 2) の両方を活性化させた。

30

(実施例 4)

N K G 2 D 結合ドメインは N K 細胞を活性化させる

初代ヒト N K 細胞

【0192】

密度勾配遠心分離を使用し、ヒト末梢血軟膜から末梢血単核細胞 (P B M C) を単離した。磁気ビーズを用いたネガティブセクションを使用して P B M C から N K 細胞 (C D 3 - C D 5 6 +) を単離した。単離された N K 細胞の純度は典型的には > 9 5 % であった。次に、単離された N K 細胞を、1 0 0 n g / m L の I L - 2 を含有する培地中で 2 4 ~ 4 8 時間にわたって培養した後、それらを、N K G 2 D 結合ドメインを吸着させたマイクロプレートのウェルに移し、フルオロフォアコンジュゲート抗 C D 1 0 7 a 抗体、プレフェルジン - A、およびモネンシンを含有する培地中で培養した。培養後、C D 3、C D 5 6、および I F N に対するフルオロフォアコンジュゲート抗体を使用したフローサイトメトリーによって N K 細胞をアッセイした。C D 3 - C D 5 6 + 細胞における C D 1 0 7 a および I F N の染色を分析して、N K 細胞の活性化を評価した。C D 1 0 7 a / I F N 二重陽性細胞の増加は、1 つの受容体ではなく 2 つの活性化受容体の会合による、より良好な N K 細胞の活性化を示す。N K G 2 D 結合ドメインおよび陽性対照 (配列番号 4

40

50

5 ~ 48 から選択される) は、アイソタイプ対照よりも高いパーセンテージのNK細胞がCD107a⁺およびIFN⁺になることを示した(図13および図14は、NK細胞の調製のために異なるドナーのPBMCをそれぞれ使用した、2つの独立した実験を表す)。初代マウスNK細胞

【0193】

C57BL/6マウスから脾臓を得、70μmのセルストレイナーを通して押しつぶして、単一細胞懸濁液を得た。細胞をペレット化し、ACK溶解緩衝液(Thermo Fisher Scientificから購入した、#A1049201; 155mM塩化アンモニウム、10mM炭酸水素カリウム、0.01mMEDTA)に再懸濁して赤血球を除去した。残りの細胞を100ng/mLのhIL-2と共に72時間にわたって培養し、その後採取し、NK細胞単離の準備をした。次に、磁気ビーズを用いたネガティブディプリーション技術を使用し、典型的には>90%の純度で脾臓細胞からNK細胞(CD3⁺NK1.1⁺)を単離した。精製されたNK細胞を、100ng/mLのmIL-15を含有する培地中で48時間にわたって培養した後、NKGD結合ドメインを吸着させたマイクロプレートのウェルに移し、フルオロフォアコンジュゲート抗CD107a抗体、プレフェルジン-A、およびモネンシンを含有する培地中で培養した。NKGD結合ドメインでコーティングされたウェルにおいて培養した後、CD3、NK1.1、およびIFN⁺に対するフルオロフォアコンジュゲート抗体を使用したフローサイトメトリーによってNK細胞をアッセイした。CD3⁺NK1.1⁺細胞におけるCD107aおよびIFN⁺の染色を分析して、NK細胞の活性化を評価した。CD107a/IFN⁺二重陽性細胞の増加は、1つの受容体ではなく2つの活性化受容体の会合による、より良好なNK細胞の活性化を示す。NKGD結合ドメインおよび陽性対照(eBioscienceから入手可能な抗マウスNKGDクローンMI-6およびCX-5から選択される)は、アイソタイプ対照よりも高いパーセンテージのNK細胞がCD107a⁺およびIFN⁺になることを示した(図15および図16は、NK細胞の調製のために異なるマウスをそれぞれ使用した、2つの独立した実験を表す)。

(実施例5)

NKGD結合ドメインは標的腫瘍細胞の細胞傷害性を可能にする

【0194】

ヒトおよびマウス初代NK細胞活性化アッセイは、NKGD結合ドメインとのインキュベーション後、NK細胞にある増加した細胞傷害性マーカーを示す。これが腫瘍細胞溶解の増加につながるかどうかに対処するために、各NKGD結合ドメインが単一特異的抗体になる細胞ベースのアッセイを利用した。Fc領域を1つの標的化アームとして使用し、一方、Fab領域(NKGD結合ドメイン)はNK細胞を活性化するための別の標的化アームとして作用した。ヒト起源であり、高レベルのFc受容体を発現するTHP-1細胞を腫瘍標的として使用し、Perkin Elmer DELFIA細胞傷害性キットを使用した。THP-1細胞をBATDA試薬で標識化し、10⁵/mLにて培養培地に再懸濁した。次に、標識化したTHP-1細胞をNKGD抗体と合わせ、マイクロタイタープレートのウェル中で37℃にて3時間、マウスNK細胞を単離した。インキュベーション後、20μLの培養上清を取り出し、200μLのユーロピウム溶液と混合し、暗所で15分間振盪しながらインキュベートした。時間分解蛍光モジュール(励起337nm、発光620nm)を備えたPheraStarプレートリーダーによって蛍光を経時的に測定し、キットの説明書に従って特異的溶解率を計算した。

【0195】

NKGDに対する天然リガンドである陽性対照のULBP-6は、マウスNK細胞によるTHP-1標的細胞の特異的溶解率の増加を示した。NKGD抗体も、THP-1標的細胞の特異的溶解率を増加させたが、アイソタイプ対照抗体は特異的溶解率の低減を示した。点線は、抗体を添加していないマウスNK細胞によるTHP-1細胞の特異的溶解率を示す(図17)。

(実施例6)

10

20

30

40

50

NKG2D抗体は高い熱安定性を示す

【0196】

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

(実施例7)

多重特異性結合タンパク質はNK細胞を活性化させる能力の増強を示す

【0197】

密度勾配遠心分離を使用し、ヒト末梢血軟膜から末梢血単核細胞(PBMC)を単離した。磁気ビーズを用いたネガティブセレクションを使用してPBMCからNK細胞(CD3⁻CD56⁺)を単離した。単離されたNK細胞の純度は典型的には>95%であった。次に、単離されたNK細胞を、100ng/mLのIL-2を含有する培地中で24~48時間にわたって培養した後、それらを、多重特異性および二重特異性結合タンパク質をそれぞれ吸着させたマイクロプレートのウェルに移し、フルオロフォアコンジュゲート抗CD107a抗体、プレフェルジン-A、およびモネンシンを含有する培地中で培養した。培養後、CD3、CD56、およびIFN γ に対するフルオロフォアコンジュゲート抗体を使用したフローサイトメトリーによってNK細胞をアッセイした。CD3⁻CD56⁺細胞におけるCD107aおよびIFN γ の染色を分析して、NK細胞の活性化を評価した。CD107a/IFN γ 二重陽性細胞の増加は、より良好なNK細胞の活性化を示す。AL2.2は、HER2結合ドメイン(トラスツズマブ)、NKG2D結合ドメイン(ULBP-6)およびヒトIgG1Fcドメインを含有する多重特異性結合タンパク質である。それは、トラスツズマブホモ二量体およびULBP-6-Fcホモ二量体から開始する、制御されたFabアーム交換反応(cFAE)によって作製した(Labrijnら、Nature Protocols 9巻、2450~2463頁を参照されたい)。SC2.2は、トラスツズマブに由来するscFv、およびULBP-6(配列番号93)を含む一本鎖タンパク質である。

【化4】

配列番号 93

MAAAAIPALLLCLPLLFLLFGWSRARRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGGQVD
EKTFLHYDCGNKTVTPVSPLGKKLNVTMAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENY
TPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSIDGQTFLFDSEKRMWTTVHPGARKMK
EKWENDKDVAMSFHYISMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSGTTQLRA
TATTLLCCLLIILPCFILPGI

【0198】

CD107aおよびIFN γ 染色の分析により、アイソタイプ対照IgGはNK細胞の活性化を示さなかったが、多重特異性結合タンパク質での刺激後、二重特異性タンパク質と比較して、より高いパーセンテージのNK細胞がCD107a⁺およびIFN γ ⁺になることが示され、ただ1つ(NKG2D)よりもむしろ2つの活性化受容体(NKG2DおよびCD16)の会合による、より強力なNK細胞の活性化が示された(図19)。NK細胞活性化のこの増加は、より強力な腫瘍細胞殺傷につながると予想される。

(実施例8)

多重特異性結合タンパク質は標的腫瘍細胞に対して増強した細胞傷害性を示す
初代ヒトNK細胞傷害性アッセイ

【0199】

密度勾配遠心分離を使用し、ヒト末梢血軟膜から末梢血単核細胞(PBMC)を単離した。磁気ビーズを用いたネガティブセレクションを使用してPBMCからNK細胞(CD3⁻CD56⁺)を単離した。単離されたNK細胞の純度は典型的には>95%であった。次に、NK細胞を、100ng/mLのIL-2を含有する培地中で一晩培養し、その

後、細胞傷害性アッセイに使用した。翌日、NK細胞を $5 \times 10^5 / \text{mL}$ にて新鮮な培養培地に再懸濁した。ヒト乳がん細胞SkBr-3細胞を、Perkin Elmer DELFIA細胞傷害性キットに従ってBATDA試薬で標識化し、 $5 \times 10^4 / \text{mL}$ にて培養培地に再懸濁した。多重特異性結合タンパク質の種々の希釈を培養培地中で行った。次に、NK細胞、標識化したSkBr-3細胞および多重特異性結合タンパク質をマイクロタイタープレートのウェル内で合わせ、37℃にて3時間インキュベートした。インキュベーション後、20 μL の培養上清を取り出し、200 μL のユーロピウム溶液と混合し、暗所で15分間振盪しながらインキュベートした。時間分解蛍光モジュール（励起337 nm、発光620 nm）を備えたPheraStarプレートリーダーによって蛍光を経時的に測定し、キットの説明書に従って特異的溶解率を計算した。AL0.2は、HER2結合ドメイン（トラスツズマブ）、NKGD2D結合ドメイン（配列番号1～44から選択される）およびヒトIgG1 Fcドメインを含有する多重特異性結合タンパク質である。それは、トラスツズマブホモ二量体および抗NKGD2Dホモ二量体から開始する、制御されたFabアーム交換反応（cFAE）によって作製した。AL0.2 siはAL0.2に基づき、CD16結合を無効にするFcドメイン内のさらなるD265A突然変異を含有する。トラスツズマブ-siはトラスツズマブに基づき、CD16結合を無効にするFcドメイン内のさらなるD265A突然変異を含有する。AL2.2は、HER2結合ドメイン（トラスツズマブ）、NKGD2D結合ドメイン（ULBP-6）およびヒトIgG1 Fcドメインを含有する多重特異性結合タンパク質である。SC2.2は、トラスツズマブに由来するscFv、およびULBP-6を含む一本鎖タンパク質である。

【0200】

AL0.2は、用量依存的にトラスツズマブよりヒトNK細胞によるSkBr-3標的細胞の増強した溶解を示し、EC50において0.0311のp値であった（図20）。AL0.2 si（図21）およびトラスツズマブ-si（図22）は、AL0.2と比較してSkBr-3細胞の効力および最大特異的溶解率の両方の低減を示し、それぞれEC50において0.0002、および0.0001のp値であった（図21～22）。さらに、AL0.2は、用量依存的にAL2.2よりSkBr-3細胞の増強した溶解を示した（図23）。アイソタイプ対照IgGは、試験した濃度のいずれにおいても特異的溶解率の増加を示さなかった。データを合わせると、NK細胞における2つの活性化受容体および1つの腫瘍抗原と会合する多重特異性結合タンパク質は、NK細胞における1つの活性化受容体および1つの腫瘍抗原と会合する二重特異性タンパク質と比較して、ヒトNK細胞による腫瘍細胞のより強力な殺傷を誘導することが示された。

初代マウスNK細胞の細胞傷害性アッセイ

【0201】

C57BL/6マウスから脾臓を得、70 μm のセルストレイナーを通して押しつぶして、単一細胞懸濁液を得た。細胞をペレット化し、ACK溶解緩衝液（Thermo Fisher Scientificから購入した、#A1049201；155 mM塩化アンモニウム、10 mM炭酸水素カリウム、0.01 mM EDTA）に再懸濁して赤血球を除去した。残りの細胞を100 ng/mLのhIL-2と共に72時間にわたって培養し、その後採取し、NK細胞単離の準備をした。次に、磁気ビーズを用いたネガティブディブリーション技術を使用し、典型的には>90%の純度で脾臓細胞からNK細胞（CD3-NK1.1⁺）を単離した。精製されたNK細胞を、100 ng/mLのmIL-15を含有する培地中で48時間にわたって培養した後、細胞傷害性アッセイのために $10^6 / \text{mL}$ にて培養培地に再懸濁した。HER2およびdTomatoを発現するように工学操作されたマウス腫瘍細胞株であるRMA-HER2-dTomato、ならびにその対照対応物である、zsGreenを発現するRMA細胞を標的として使用した。それらを $2 \times 10^5 / \text{mL}$ にて培養培地に再懸濁し、1:1の比にてマイクロプレートのウェルに播種した。多重特異性タンパク質の希釈を培養培地中で行い、NK細胞と共にRMA細胞に添加した。37℃にて5%CO₂での一晚のインキュベーション後、RMA-HER2-dTomatoおよびRMA-zsGreen細胞のパーセンテージを、蛍光レポ

ータを使用するフローサイトメトリーによって決定して2つの細胞型を同定した。特異的標的細胞死 = $(1 - ((\text{処置群における RMA - Ca2T - dTomato 細胞の \%} * \text{対照群における RMA - zsGreen 細胞の \%}) / (\text{対照群における RMA - Ca2T - dTomato 細胞の \%} * \text{処置群における RMA - zsGreen 細胞の \%}))) * 100 \%$ 。

【0202】

AL2.2は、SC2.2(図25)およびトラスツマブ(図24)よりも腫瘍標的に対するNK細胞応答の再指向においてより強力である。対照タンパク質は、特異的標的死にほとんど影響を与えないことが示された。これらのデータは、NK細胞における2つの活性化受容体および1つの腫瘍抗原と会合する多重特異性結合タンパク質が、NK細胞における1つの活性化受容体および1つの腫瘍抗原と会合する二重特異性タンパク質と比較して、マウスNK細胞による腫瘍細胞のより強力な殺傷を誘導することを示す。

10

(実施例9)

多重特異性結合タンパク質はNKGD2に結合する

【0203】

図1に示すように、NKGD2結合ドメイン、HER2結合ドメインおよびCD16に結合するFcドメインを各々含有するヒトNKGD2三重特異性結合タンパク質(TrinKET)を発現するように、EL4マウスリンパ腫細胞株を工学操作し、EL4細胞において発現した細胞外NKGD2に対するそれらの親和性について試験した。NKGD2への多重特異性結合タンパク質の結合を、フルオロフォアコンジュゲート抗ヒトIgG二次抗体を使用して検出した。細胞をフローサイトメトリーによって分析し、親EL4細胞と比較したNKGD2発現細胞の平均蛍光強度(MFI)を使用してバックグラウンドに対する倍率(FOB)を計算した。

20

【0204】

試験したTrinKETは、HER2-TrinKET-C26(ADI-28226およびHER2結合ドメイン)およびHER2-TrinKET-F04(ADI-29404およびHER2結合ドメイン)を含む。試験した分子で使用したHER2結合ドメインは、トラスツマブの重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインから構成された。

【0205】

データは、本開示のHER2標的化TrinKETがNKGD2に結合することを示している(図26)。

30

(実施例10)

ヒト腫瘍抗原に結合する多重特異性結合タンパク質

HER2に結合する三重特異性結合タンパク質

【0206】

HER2を発現するヒトがん細胞株を使用して、TrinKETを腫瘍関連抗原へと標的化するHER2の結合をアッセイした。腎細胞癌細胞株786-Oは低レベルのHER2を発現する。TrinKETおよび必要に応じて親抗HER2モノクローナル抗体(トラスツマブ)を細胞とインキュベートし、フルオロフォアコンジュゲート抗ヒトIgG二次抗体を使用して結合を検出した。細胞をフローサイトメトリーによって分析し、バックグラウンドに対する倍率(FOB)を、二次抗体対照に対して正規化したTrinKETおよびトラスツマブからの平均蛍光強度(MFI)を使用して計算した。HER2-TrinKET-C26、およびHER2-TrinKET-F04は、トラスツマブと比較して786-O細胞において発現したHER2への結合の同等のレベルを示す(図27A)。

40

【0207】

ヒトHER2を用いて形質導入したRMA細胞を、HER2標的化TrinKETによる細胞発現ヒトHER2への結合を試験するために使用した。TrinKETを20μg/mLに希釈し、結合をフルオロフォアコンジュゲート抗ヒトIgG二次抗体を使用して検出した。細胞をフローサイトメトリーによって分析し、細胞発現HER2への結合をア

50

イソタイプ染色および未染色細胞集団と比較した。図 27B および図 27C は、2 つの異なる NKG2D 結合ドメインを含有しているが、同じ HER- 結合ドメインを有する Tr i N K E T の結合プロファイルを示す (HER2 結合部位を有する C26 . 2 Tr i N K E T の結合プロファイルを図 27B に示し、HER2 結合部位を有する F04 . 2 Tr i N K E T の結合プロファイルを図 27C に示す)。両方の Tr i N K E T は、RMA 細胞上の細胞表面 HER2 への同様のレベルの結合を示す。

(実施例 11)

多重特異性結合タンパク質活性化 NK 細胞

【0208】

密度勾配遠心分離を使用し、ヒト末梢血軟膜から末梢血単核細胞 (P B M C) を単離した。磁気ビーズを用いたネガティブセレクションを使用して P B M C から NK 細胞 (C D 3⁺ C D 5 6⁺) を単離した。単離された NK 細胞の純度は典型的には > 90 % であった。単離された NK 細胞を、活性化のために 100 ng / mL の I L - 2 を含有する培地中で培養したか、またはサイトカインなしで一晩休止させた。I L - 2 活性化 NK 細胞を、活性化後 24 ~ 48 時間以内に使用した。

【0209】

腫瘍抗原を発現するヒトがん細胞を採取し、 2×10^6 / mL にて培養培地に再懸濁した。腫瘍抗原を標的とするモノクローナル抗体または Tr i N K E T を培養培地中で希釈した。活性化 NK 細胞を採取し、洗浄し、培養培地に 2×10^6 / mL にて再懸濁した。次に、がん細胞をモノクローナル抗体 / Tr i N K E T と混合し、I L - 2 の存在下で NK 細胞を活性化させた。プレフェルジン - A およびモネンシンも混合培養物に添加して、細胞内サイトカイン染色のために細胞からのタンパク質輸送を阻止した。フルオロフォアコンジュゲート抗 C D 107a を混合培養物に添加し、培養物を 4 時間インキュベートした後、C D 3、C D 5 6 および I F N に対するフルオロフォアコンジュゲート抗体を使用した F A C S 分析のために試料を調製した。C D 107a および I F N 染色を C D 3⁺ C D 5 6⁺ 細胞において分析して NK 細胞活性化を評価した。C D 107a / I F N 二重陽性細胞の増加は、1 つの受容体よりもむしろ 2 つの活性化受容体の会合による、より良好な NK 細胞活性化を示す。

【0210】

Tr i N K E T は、C D 107a 脱顆粒および I F N 産生の増加によって示されるように、HER2 を発現する、S k B r - 3 細胞 (図 28A)、C o l o 201 細胞 (図 28B)、および H C C 1954 細胞 (図 28C) のそれぞれと共培養したヒト NK 細胞の活性化を媒介する。S k B r - 3 細胞および H C C 1954 細胞は高レベルの表面 HER2 を発現し、C o l o 201 は中程度の HER2 を発現する。モノクローナル抗体トラスツズマブと比較して、Tr i N K E T はヒトがん細胞の存在下でヒト NK 細胞の優れた活性化を示す。NK 細胞単独、NK 細胞 + S k B r - 3 細胞を陰性対照として使用する。

【0211】

Tr i N K E T (C26 - Tr i N K E T - HER2 および F04 - Tr i N K E T - HER2) は、C D 33 発現ヒト A M L M v 4 - 11 細胞と共培養したヒト NK 細胞の活性化を媒介し、C D 107a 脱顆粒および I F N 産生の増加を示した。モノクローナル抗 C D 33 抗体と比較して、Tr i N K E T (C26 - Tr i N K E T - HER2 および F04 - Tr i N K E T - HER2) は、HER2 を発現するヒトがん細胞の存在下でヒト NK 細胞の優れた活性化を示した (図 28A ~ 28C)。

初代ヒト NK 細胞は、標的発現ヒトがん細胞株との共培養において Tr i N K E T によって活性化される

(実施例 12)

三重特異性結合タンパク質は標的がん細胞の細胞傷害性を可能にする

【0212】

密度勾配遠心分離を使用し、ヒト末梢血軟膜から末梢血単核細胞 (P B M C) を単離した。磁気ビーズを用いたネガティブセレクションを使用して P B M C から NK 細胞 (C D

10

20

30

40

50

3⁻CD56⁺)を単離した。単離されたNK細胞の純度は典型的には>90%であった。単離されたNK細胞を、活性化のために100ng/mLのIL-2を含有する培地中で培養したか、またはサイトカインなしで一晩休止させた。IL-2活性化NK細胞または休止NK細胞を、翌日、細胞傷害性アッセイにおいて使用した。

【0213】

Tr i N K E Tの存在下でがん細胞を溶解するヒトNK細胞の能力を試験するために、Promega (G1780)からのcyto Tox 96非放射性細胞傷害性アッセイを製造業者の説明書に従って使用した。簡潔に述べると、腫瘍抗原を発現するヒトがん細胞を採取し、洗浄し、 $1 \sim 2 \times 10^5$ /mLにて培養培地に再懸濁した。休止NK細胞および/または活性化NK細胞を採取し、洗浄し、がん細胞の培養培地と同じ培養培地に $10^5 \sim 2.0 \times 10^6$ /mLにて再懸濁した。96ウェルプレートの各ウェルにおいて、50μLのがん細胞懸濁液を、がん細胞において発現した腫瘍抗原を標的とするTr i N K E Tを有するか、または有さない50μLのNK細胞懸濁液と混合した。37℃にて5%CO₂での3時間および15分間のインキュベーション後、10×溶解緩衝液を、がん細胞のみを含有するウェル、ならびに最大限の溶解および陰性試薬対照のための培地のみを含有するウェルにそれぞれ添加した。次に、プレートをインキュベーターにさらに45分間戻して合計4時間のインキュベーションを達成した。次に、細胞をペレット化し、培養上清を新たな96ウェルプレートに移し、発色のために基質と混合した。新たなプレートを室温にて30分間インキュベートし、吸光度をSpectraMax i3xにおいて492nmにて読み取った。がん細胞の特異的溶解率(パーセンテージ)を以下のように計算した：特異的溶解% = ((実験的溶解 - NK細胞単独からの自発的溶解 - がん細胞単独からの自発的溶解) / (最大溶解 - 陰性試薬対照)) × 100%。

【0214】

Tr i N K E Tは、抗HER2モノクローナル抗体であるトラスツズマブの細胞傷害活性と比較して低い表面発現で標的に対するNK細胞の細胞傷害性を増強する。休止ヒトNK細胞を高HER2発現SkBr腫瘍細胞および低HER2発現786-Oがん細胞と混合し、高および低HER2発現がん細胞に対する休止ヒトNK細胞の細胞傷害活性を用量応答的に増強するTr i N K E Tの能力をアッセイした。図29Aおよび図29Bの点線は、Tr i N K E Tの非存在下でのがん細胞に対する休止NK細胞の細胞傷害活性を示す。図29Bに示すように、活性化ヒトNK細胞を低HER2発現786-O細胞、およびHER2への結合ドメインを含むTr i N K E T(例えば、CD26-Tr i N K E TおよびF04-Tr i N K E T)と混合すると、がん細胞に対する活性化ヒトNK細胞の用量応答性細胞傷害活性が観察された。

(実施例13)

NKG2DおよびCD16の架橋によるヒトNK細胞の相乗的活性化
初代ヒトNK細胞活性化アッセイ

【0215】

密度勾配遠心分離を使用し、末梢ヒト血液軟膜から末梢血単核細胞(PBMC)を単離した。ネガティブ磁気ビーズ(StemCell #17955)を使用してPBMCからNK細胞を精製した。NK細胞は、フローサイトメトリーによって決定して>90%のCD3⁺CD56⁺であった。次に、細胞を、活性化アッセイに使用する前に100ng/mLのhIL-2(Peprotech #200-02)を含有する培地中で48時間増殖させた。抗体を、100μLの滅菌PBS中で2μg/mL(抗CD16、Biolegend #302013)および5μg/mL(抗NKG2D、R&D #MAB139)の濃度にて4℃で一晩、96ウェル平底プレート上にコーティングし、続いてウェルを十分に洗浄して過剰の抗体を除去した。脱顆粒の評価のために、IL-2活性化NK細胞を、100ng/mLのhIL2および1μg/mLのAPCコンジュゲート抗CD107a mAb(Biolegend #328619)を補充した培養培地に 5×10^5 個の細胞/mLにて再懸濁した。次に、 1×10^5 個の細胞/ウェルを、抗体でコーティングされたプレート上に添加した。タンパク質輸送阻害剤であるブレフェルジンA(B

F A、B i o l e g e n d # 4 2 0 6 0 1) およびモネンシン (B i o l e g e n d # 4 2 0 7 0 1) を、それぞれ 1 : 1 0 0 0 および 1 : 2 7 0 の最終希釈にて添加した。播いた細胞を、3 7 にて 4 時間にわたって 5 % C O ₂ においてインキュベートした。I F N - の細胞内染色のために、NK 細胞を、抗 C D 3 (B i o l e g e n d # 3 0 0 4 5 2) および抗 C D 5 6 m A b (B i o l e g e n d # 3 1 8 3 2 8) で標識化し、続いて固定し、透過処理し、抗 I F N - m A b (B i o l e g e n d # 5 0 6 5 0 7) で標識化した。NK 細胞を、生 C D 5 6 + C D 3 - 細胞においてゲーティングした後、フローサイトメトリーによって C D 1 0 7 a および I F N - の発現について分析した。

【 0 2 1 6 】

受容体の組合せの相対的効力を調査するため、プレート結合刺激により、N K G 2 D または C D 1 6 の架橋および両受容体の共架橋を行った。図 3 0 (図 3 0 A ~ 3 0 C) に示したように、C D 1 6 および N K G 2 D の組み合わせた刺激は、C D 1 0 7 a (脱顆粒) レベル (図 3 0 A) および / または I F N - 産生レベル (図 3 0 B) の大きな上昇をもたらした。点線は、各受容体の個々の刺激の相加効果を表す。

10

【 0 2 1 7 】

抗 C D 1 6、抗 N K G 2 D または両方のモノクローナル抗体の組合せを用いた 4 時間のプレート結合刺激の後、I L - 2 活性化 N K 細胞の C D 1 0 7 a レベルおよび細胞内 I F N - 産生を分析した。グラフは平均 (n = 2) ± S D を示している。図 1 9 A は C D 1 0 7 a のレベルを示し、図 1 9 B は I F N - のレベルを示し、図 3 0 C は C D 1 0 7 a および I F N - のレベルを示す。図 3 0 A ~ 3 0 C に示したデータは、5 名の異なる健康なドナーを使用した、5 つの独立した実験を代表するものである。

20

【 0 2 1 8 】

トラスツズマブ、抗 N K G 2 D、またはトラスツズマブおよび抗 N K G 2 D 抗体の結合ドメインに由来する T r i N K E T を用いた 4 時間のプレート結合刺激の後、I L - 2 活性化 N K 細胞の C D 1 0 7 a 脱顆粒および細胞内 I F N - 産生を分析した (図 3 1)。すべての場合において、試験した抗体はヒト I g G 1 アイソタイプのものであった。グラフは平均 (n = 2) ± S D を示す。

(実施例 1 4)

細胞により発現されたヒト N K G 2 D への T r i N K E T 結合の評価

【 0 2 1 9 】

ヒト N K G 2 D を形質導入した E L 4 細胞を使用して、細胞により発現されたヒト N K G 2 D への結合を試験した。T r i N K E T を 2 0 μ g / m L に希釈し、次に連続希釈した。m A b または T r i N K E T 希釈液を使用して細胞を染色し、フルオロフォアコンジュゲート抗ヒト I g G 二次抗体を使用して T r i N K E T または m A b の結合を検出した。細胞をフローサイトメトリーによって分析し、結合 M F I を二次抗体対照に対して正規化してバックグラウンド値に対する倍率を得た。

30

細胞により発現されたヒトがん抗原への T r i N K E T 結合の評価

【 0 2 2 0 】

H E R 2 を発現するヒトがん細胞株を使用して、異なる N K G 2 D を標的とするクローンに由来する T r i N K E T の腫瘍抗原結合を評価した。ヒト腎細胞癌細胞株 7 8 6 - O は低レベルの H E R 2 を発現し、細胞により発現された H E R 2 への T r i N K E T 結合を評価するために使用した。T r i N K E T を 2 0 μ g / m L に希釈し、それぞれの細胞とインキュベートした。T r i N K E T の結合を、フルオロフォアコンジュゲート抗ヒト I g G 二次抗体を使用して検出した。細胞をフローサイトメトリーによって分析し、細胞により発現された H E R 2 への結合 M F I を二次抗体対照に対して正規化してバックグラウンド値に対する倍率を得た。

40

ヒト H E R 2 陽性がん細胞株の抗体結合能の決定

【 0 2 2 1 】

H E R 2 陽性ヒトがん細胞株の抗体結合能 (A B C) を測定した。B a n g s L a b 製の Q u a n t u m S i m p l y C e l l u l a r キットを使用し (# 8 1 5)、製造

50

業者の説明書に従って抗体標識化ビーズを準備した。簡潔に述べると、ビーズの4つの集団の各々を飽和量の抗HER2抗体で染色し、細胞集団も飽和量の同じ抗体で染色した。試料データを各ビーズ集団、および細胞集団について獲得した。キットに備えられたQuickCalワークシートを、標準曲線の作成および細胞株の各々についてのABC値の外挿のために使用した。

Tr i N K E Tによる初代NK細胞の活性化

【0222】

密度勾配遠心分離を使用し、ヒト末梢血軟膜からPBMCを単離した。単離されたPBMCを洗浄し、NK細胞単離のために準備した。磁気ビーズを用いたネガティブセレクション技術を使用してNK細胞を単離した。単離されたNK細胞の純度は典型的には>90%のCD3-CD56+であった。単離されたNK細胞を、活性化のために100ng/mLのIL-2を含有する培地中で培養したか、またはサイトカインなしで一晩休止させた。IL-2活性化NK細胞を24~48時間後に使用した。休止NK細胞は常に精製の翌日に使用した。

10

【0223】

目的のがん標的を発現するヒトがん細胞株を培養物から採取し、細胞を 2×10^6 /mLに調整した。目的のがん標的を標的とするモノクローナル抗体またはTr i N K E Tを培養培地中で希釈した。休止NK細胞および/または活性化NK細胞を培養物から採取し、細胞を洗浄し、 2×10^6 /mLにて培養培地に再懸濁した。IL-2、およびフルオロフォアコンジュゲート抗CD107aを、活性化培養のためにNK細胞に添加した。プレフェルジン-Aおよびモネンシンを培養培地中で希釈して、細胞内サイトカイン染色のために細胞からのタンパク質輸送を阻止した。96ウェルプレートに、50μlの腫瘍標的、mAb/Tr i N K E T、BFA/モネンシン、およびNK細胞を200μlの総培養体積で添加した。プレートを4時間培養した後、試料をFACS分析のために準備した。

20

【0224】

4時間の活性化培養後、細胞を、CD3、CD56およびIFN γ に対するフルオロフォアコンジュゲート抗体を使用したフローサイトメトリーによる分析のために準備した。CD107aおよびIFN γ 染色をCD3-CD56+集団において分析してNK細胞活性化を評価した。

初代ヒトNK細胞の細胞傷害性アッセイ

30

【0225】

密度勾配遠心分離を使用し、ヒト末梢血軟膜からPBMCを単離した。単離されたPBMCを洗浄し、NK細胞単離のために準備した。磁気ビーズを用いたネガティブセレクション技術を使用してNK細胞を単離した。単離されたNK細胞の純度は典型的に>90%のCD3-CD56+であった。単離されたNK細胞を、100ng/mLのIL-2を含有する培地中で培養したか、またはサイトカインなしで一晩休止させた。翌日、IL-2活性化NK細胞または休止NK細胞を細胞傷害性アッセイに使用した。

Cyto Tox 96 LHD放出アッセイ:

【0226】

腫瘍細胞を溶解するヒトNK細胞の能力を、Promega(G1780)製のCyto Tox 96非放射性細胞傷害性アッセイを使用して、Tr i N K E Tを添加してまたは添加せずに測定した。目的のがん標的を発現するヒトがん細胞株を培養物から採取し、細胞をPBSで洗浄し、標的細胞として使用するために $1 \sim 2 \times 10^5$ /mLにて成長培地に再懸濁した。50μlの標的細胞懸濁液を各ウェルに添加した。目的のがん抗原を標的とするモノクローナル抗体またはTr i N K E Tを培養培地中で希釈し、50μlの希釈したmAbまたはTr i N K E Tを各ウェルに添加した。休止NK細胞および/または活性化NK細胞を培養物から採取し、細胞を洗浄し、所望のE:T比に応じて培養培地に $10^5 \sim 2.0 \times 10^6$ /mLにて再懸濁した。50μlのNK細胞をプレートの各ウェルに添加して合計150μlの培養体積にした。プレートを37℃にて5%CO₂で3時間および15分にわたってインキュベートした。インキュベーション後、10×溶解緩衝液

40

50

を、最大溶解および体積調節のために標的細胞のみのウェルおよび培地のみを含有するウェルに添加した。次に、プレートをインキュベーターにさらに45分間戻し、発色前に合計4時間のインキュベーションを行った。

【0227】

インキュベーション後、プレートをインキュベーターから取り出し、細胞を200gにて5分間の遠心分離によってペレット化した。50μlの培養上清を清浄なマイクロプレートに移し、50μlの基質溶液を各ウェルに添加した。プレートを光から保護し、室温にて30分にわたってインキュベートした。50μlの停止溶液を各ウェルに添加し、吸光度をSpectraMax i3xにおいて492nmにて読み取った。特異的溶解%を以下のように計算した：特異的溶解% = ((実験的放出 - エフェクターからの自然放出 - 標的からの自然放出) / (最大放出 - 自然放出)) * 100%。

10

DELFIA細胞傷害性アッセイ：

【0228】

目的の標的を発現するヒトがん細胞株を培養物から採取し、細胞をPBSで洗浄し、BATDA試薬(Perkin Elmer AD0116)で標識化するために 10^6 /mLにて成長培地に再懸濁した。製造業者の説明書に従って標的細胞を標識化した。標識化後、細胞をPBSで3回洗浄し、 $0.5 \sim 1.0 \times 10^5$ /mLにて培養培地に再懸濁した。バックグラウンドウェルを準備するために、標識化した細胞のアリコートを取っておき、細胞を培地からスピアウトした。100μlの培地を、ペレット化した細胞を乱さないように3連でウェルに注意深く添加した。100μlのBATDA標識化細胞を96ウェルプレートの各ウェルに添加した。ウェルを標的細胞からの自然放出のために保存し、ウェルを1%のTriton-Xの添加による標的細胞の最大溶解のために準備した。目的の腫瘍標的に対するモノクローナル抗体またはTrinKETを培養培地で希釈し、50μlの希釈したmAbまたはTrinKETを各ウェルに添加した。休止NK細胞および/または活性化NK細胞を培養物から採取し、細胞を洗浄し、所望のE:T比に応じて培養培地に $10^5 \sim 2.0 \times 10^6$ /mLにて再懸濁した。50μlのNK細胞をプレートの各ウェルに添加して合計200μlの培養体積にした。アッセイの発色前にプレートを37にて5%CO₂で2~3時間にわたってインキュベートした。

20

【0229】

2~3時間培養した後、プレートをインキュベーターから取り出し、細胞を200gにて5分間の遠心分離によってペレット化した。20μlの培養上清を、製造業者から提供された清浄なマイクロプレートに移し、200μlの室温ユーロピウム溶液を各ウェルに添加した。プレートを光から保護し、プレートシェーカーにおいて250rpmにて15分にわたってインキュベートした。プレートを、Victor 3またはSpectraMax i3X機器のいずれかを使用して読み取った。特異的溶解%を以下のように計算した：特異的溶解% = ((実験的放出 - 自然放出) / (最大放出 - 自然放出)) * 100%。

30

長期のヒトPBMC細胞傷害性アッセイ：

【0230】

SkBr-3標的細胞を、BacMam 3.0 NucLight Green (#4622)で標識化して標的細胞の追跡を可能にした。製造業者のプロトコルに従って、SkBr-3標的細胞を標識化した。アネキシンVレッド(Essen Bioscience #4641)を希釈し、製造業者の説明書に従って準備した。モノクローナル抗体またはTrinKETを培養培地中で希釈した。50μlのmAbまたはTrinKET、アネキシンV、および休止NK細胞を、既に標識化したSkBr-3細胞を含有する96ウェルプレートのウェルに添加した。50μlの完全培養培地を合計200μlの培養体積で添加した。

40

【0231】

画像収集をIncucyte S3においてセットアップした。フェーズ、緑色、および赤色チャネルについての画像を1時間毎に収集し、ウェル当たり2つの画像を得た。画

50

像分析はIncucyte S3ソフトウェアを使用して行った。緑色および赤色チャンネルのためのマスクを作製して、腫瘍細胞、およびアネキシンV陽性細胞の数をそれぞれ計数した。アネキシンV陽性Mv4-11標的細胞の%を計算するために以下の式を使用した。アネキシンV陽性SkBr-3細胞の% = ((重複物体数) / (緑色物体数)) * 100%。

HER+がん細胞を標的とするTrinKETとSC2.2との比較

【0232】

HER2を標的とするTrinKETは、SkBr-3細胞数を低減させるのにトラスツズマブより効果的であり、時間ゼロからの細胞の60%のみが60時間後に残っていた。HER2発現腫瘍/がん細胞を標的とする本開示のTrinKETは、NKGD2Dに対するリガンドであるULBP-6に連結したトラスツズマブに由来するscFvから構築された一本鎖二重特異性分子であるSC2.2より効果的である。SC2.2は、HER2+がん細胞およびNKGD2D+NK細胞に同時に結合する。したがって、HER2+がん細胞数を低減させる際のSC2.2の有効性を調査した。in vitro活性化および細胞傷害性アッセイは、SC2.2がNK細胞を活性化させ、殺傷するのに効果的であることを示した。しかしながら、SC2.2は、RMA/S-HER2皮下腫瘍モデルにおいて有効性を示すことができなかった。SC2.2の有効性をまた、RMA/S-HER2過剰発現同系マウスモデルを使用してin vivoで試験した。このマウスモデルにおいて、SC2.2は、ビヒクル対照と比較して腫瘍成長の制御を示すことができなかった。したがって、SC2.2は、NK細胞を活性化させ、殺傷することができ、HER2+がん細胞に結合するが、これらの特性はHER2+腫瘍成長を効果的に制御するには不十分であった。

C57BL/6マウスにおけるSC2.2血清半減期の評価

【0233】

C57BL/6マウスにおけるSC2.2の血清半減期を判定するために、SC2.2を蛍光タグで標識化してin vivoでその濃度を追跡した。SC2.2をIRDye 800CW (Licor #929-70020)で標識化した。標識化したタンパク質を3匹のC57BL/6マウスに静脈内注射し、示した時点において各マウスから血液を採取した。採取後、血液を1000gにて15分間遠心分離し、血清を各試料から採取し、すべての時点が採取されるまで4℃にて保存した。

【0234】

血清を、Odyssey CLx赤外線イメージングシステムを使用して画像化し、800チャンネルからの蛍光シグナルをImage Jソフトウェアを使用して定量した。画像強度を第1の時点に正規化し、データを二相減衰方程式に適合させた。この実験系では、SC2.2のベータ半減期は約7時間であると計算した。

RMA/S-HER2皮下腫瘍に対するSC2.2のin vivo試験

【0235】

皮下RMA/S-HER2腫瘍に対するSC2.2の有効性を試験するために、in vivo研究を図37に従って設計した。ヒトHER2を形質導入した 10^6 個のRMA/S細胞を、20匹のC57BL/6マウスの脇腹に皮下注射した。腫瘍接種 (innoculation) の2日後から開始して、SC2.2をIP注射により毎日投与した。SC2.2をビヒクル対照と共に高濃度および低濃度にて投与した。腫瘍接種の4日後から開始して、腫瘍を、研究期間中、月曜日、水曜日、および金曜日に測定した。腫瘍体積を以下の式を使用して計算した：腫瘍体積 = 長さ × 幅 × 高さ。

ヒトHER2陽性がん細胞株の抗体結合能力

【0236】

表10はHER2表面定量の結果を示す。SkBr-3およびHCC1954細胞は高い(+++)レベルの表面HER2を有することが確認された。ZR-75-1およびColo201は中レベル(++)の表面HER2を示し、786-Oは最も低いレベルのHER2(+)を示した。

【 0 2 3 7 】

【 表 1 0 】

表10:HER2陽性がん細胞株のABC

細胞株	HER2 発現	ABC
786-0	低度	28,162
Colo201	中程度	273,568
ZR-75-1	中程度	281,026
SkBr-3	高度	6,820,532
HCC1954	高度	10,569,869

10

初代ヒトNK細胞は、様々なレベルのHER2を発現するヒトがん株との共培養においてTr i N K E Tによって活性化される

【 0 2 3 8 】

20

図28A~28Cは、Tr i N K E TおよびトラスツズマブがHER2陽性ヒト腫瘍細胞との共培養において初代ヒトNK細胞を活性化させることができたことを示し、このことはCD107a脱顆粒およびIFN サイトカイン産生の増加によって示される。モノクローナル抗体トラスツズマブと比較して、両方のTr i N K E T (HER2 - Tr i N K E T - C26およびHER2 - Tr i N K E T - F04)は、様々なヒトHER2がん細胞でヒトNK細胞の優れた活性化を示した。

【 0 2 3 9 】

図28Aは、ヒトNK細胞が、SkBr-3細胞と培養された場合、Tr i N K E Tによって活性化されることを示す。図28Bは、ヒトNK細胞が、Colo201細胞と培養された場合、Tr i N K E Tによって活性化されることを示す。図28Cは、ヒトNK細胞が、HCC1954細胞と培養された場合、Tr i N K E Tによって活性化されることを示す。

30

Tr i N K E Tは休止ヒトNK細胞およびIL-2活性化ヒトNK細胞の細胞傷害性を増強する

【 0 2 4 0 】

図32A~32Bは、IL-2活性化ヒトNK細胞および休止ヒトNK細胞を使用した細胞傷害活性のTr i N K E T増強を示す。図32Aは、休止ヒトNK細胞によるSkBr-3腫瘍細胞の特異的溶解パーセントを示す。図32Bは、IL-2活性化ヒトNK細胞によるSkBr-3腫瘍細胞の特異的溶解パーセントを示す。IL-2活性化NK細胞集団および休止NK細胞集団は同じドナーに由来した。トラスツズマブと比較して、Tr i N K E Tは、活性化NK細胞集団または休止NK細胞集団のいずれかによるSkBr-3細胞に対する応答をより強力に指向する。図32Cは、ヒト休止NK細胞によるHER2発現NCI-H661肺がん細胞の特異的溶解パーセントを示す。異なるNKGD2結合ドメインを有する2つのTr i N K E Tは、モノクローナル抗体トラスツズマブと比較して、NCI-H661 HER2+がん細胞のさらに高い最大溶解を誘導することができる。

40

Tr i N K E Tは表面発現が低い標的に対するNK細胞の細胞傷害性を増強する

【 0 2 4 1 】

低いHER2表面発現を有する標的細胞に対するTr i N K E Tの効果を調査した。図29A~29Bは、Tr i N K E Tが、トラスツズマブと比較してHER2が中程度のが

50

んおよび低度のがんに対して、より大きな利点をもたらすことを示す。図 29 A は、H E R 2 高 S k B r - 3 腫瘍細胞の活性化されたヒト N K 細胞殺傷を示す。図 29 B は、H E R 2 低 7 8 6 - O 腫瘍細胞のヒト N K 細胞殺傷を示す。

F c R の発現が高いがんを処置する際の T r i N K E T の利点、または高レベルの F c R を有する腫瘍微小環境における T r i N K E T の利点

【 0 2 4 2 】

モノクローナル抗体療法は、血液系腫瘍および固形腫瘍の両方を含む、多くのがんの種類の処置のために承認されている。がんの処置におけるモノクローナル抗体の使用は患者の転帰を改善したが、依然として限界がある。機構研究により、モノクローナル抗体が、とりわけ、A D C C、C D C、食作用、およびシグナル遮断を含む複数の機構を介して腫瘍成長に対してそれらの効果を発揮することが示されている。

10

【 0 2 4 3 】

中でも注目すべきは、A D C C は、モノクローナル抗体がそれらの効果を発揮する主要な機構であると考えられている。A D C C は、腫瘍細胞の直接溶解を媒介するナチュラルキラー細胞の表面における低親和性 F c R I I I (C D 1 6) の抗体 F c 会合に依存する。F c R の中で、C D 1 6 は I g G F c に対して最も低い親和性を有し、F c R I (C D 6 4) は高親和性 F c R であり、C D 1 6 よりも I g G F c に対して約 1 0 0 0 倍強く結合する。

【 0 2 4 4 】

C D 6 4 は、通常、骨髄細胞系列などの多くの造血系列において発現され、急性骨髄性白血病 (A M L) などの、これらの細胞型に由来する腫瘍において発現され得る。M D S C および単球などの、腫瘍に浸潤する免疫細胞も、C D 6 4 を発現し、腫瘍微小環境に浸潤することが知られている。腫瘍による、または腫瘍微小環境における C D 6 4 の発現は、モノクローナル抗体療法に対して有害な効果を有し得る。腫瘍微小環境における C D 6 4 の発現は、抗体が高親和性受容体に結合することを好むので、これらの抗体が N K 細胞の表面における C D 1 6 と会合することを困難にする。N K 細胞の表面における 2 つの活性化受容体を標的とすることにより、T r i N K E T は、モノクローナル抗体療法に対する C D 6 4 発現の有害な効果を克服することができる。

20

P B M C 培養における正常な骨髄細胞および正常な B 細胞の殺傷：T r i N K E T は、少ないオンターゲット・オフ腫瘍副作用によって、より良好な安全性プロファイルを提供する

30

【 0 2 4 5 】

ナチュラルキラー細胞および C D 8 T 細胞は両方とも腫瘍細胞を直接的に溶解させることができるが、N K 細胞および C D 8 T 細胞が腫瘍細胞から正常な自己を認識する機構は異なる。N K 細胞の活性は、活性化受容体 (N C R、N K G 2 D、C D 1 6 など) および阻害受容体 (K I R、N K G 2 A など) からのシグナルのバランスによって調節される。これらの活性化シグナルおよび阻害シグナルのバランスにより、N K 細胞が、ストレスを受けた自己細胞、ウイルスに感染した自己細胞、または形質転換した自己細胞から健康な自己細胞を判定することが可能になる。この「内蔵された」自己寛容機構は、正常で健康な組織を N K 細胞応答から保護するのに役立つ。この原理を拡大適用すると、N K 細胞の自己寛容により、T r i N K E T が、腫瘍外の副作用を伴わず、または治療域の増加を伴って、自己および腫瘍の両方で発現する抗原を標的とすることが可能になる。

40

【 0 2 4 6 】

ナチュラルキラー細胞とは異なり、T 細胞は、活性化およびエフェクター機能のために、M H C 分子によって提示される特定のペプチドの認識を必要とする。T 細胞は免疫療法の主要な標的であり、腫瘍に対する T 細胞応答を再指向するために多くの方策が立てられてきた。T 細胞二重特異性薬、チェックポイント阻害剤、および C A R - T 細胞はすべて F D A に承認されているが、用量制限毒性を有することが多い。T 細胞二重特異性薬および C A R - T 細胞は、結合ドメインを使用して腫瘍細胞の表面にある抗原を標的とすること、および工学操作されたシグナル伝達ドメインを使用して活性化シグナルをエフェクタ

50

一細胞に伝達することにより、T C R - M H C 認識システムを回避する。これらの療法は、抗腫瘍免疫応答を誘発するのに効果的であるが、サイトカイン放出症候群（C R S）およびオンターゲット・オフ腫瘍副作用を伴うことが多い。これに関連して、T r i N K E Tが独特であるのは、それらが、N K細胞の活性化および阻害の天然のシステムを「無効化」しないからである。むしろT r i N K E Tは、このバランスを傾け、N Kの健康な自己に対する寛容性を維持しながら、さらなる活性化シグナルをN K細胞にもたらすようにデザインされている。

【0247】

密度勾配遠心分離によって全血からP B M Cを単離した。あらゆる混入赤血球を、A C K溶解緩衝液中でのインキュベーションによって溶解した。P B M CをP B S中で3回洗浄し、総P B M Cを計数した。P B M Cを初代細胞培養培地中で $10^6 / \text{mL}$ に調整した。1 mLのP B M Cを24ウェルプレートのウェルに播種し、示したT r i N K E Tまたはm A bを $10 \text{ ug} / \text{mL}$ にてP B M C培養物に添加した。細胞を 37°C にて5% C O ₂で一晩培養した。翌日（24時間後）、P B M Cを培養物から採取し、F A C S分析のために調製した。C D 4 5 + ; C D 1 9 + B細胞およびC D 4 5 + ; C D 3 3 + ; C D 1 1 b + 骨髄細胞のパーセンテージを、異なる処置群にわたって分析した。

10

【0248】

図33Aおよび33Bは、健康なドナー由来のB細胞が、T r i N K E T媒介溶解に感受性であることを示し、図33Cおよび33Dは、自己骨髄性細胞が、T r i N K E T媒介N K細胞応答から保護されており、したがってT r i N K E T溶解に抵抗性であることを示す。C D 2 0を標的とするT r i N K E Tを用いて処置されたP B M Cは、C D 4 5 + リンパ球集団（図33A）でのC D 1 9 + B細胞の頻度の低下を示したが、C D 4 5 + 、C D 3 - 、C D 5 6 - リンパ球集団では効果を示さなかった（図33B）。これらの培養物では、C D 4 5 + 、C D 3 3 + 、C D 1 1 b + 骨髄細胞の頻度（図33C）、またはC D 4 5 + 、C D 3 3 + 、C D 1 1 b + 骨髄細胞の頻度（図33D）は変化しなかった。

20

T r i N K E Tは長期の共培養においてS k B r - 3腫瘍細胞のh P B M C殺傷を媒介する

初代ヒトP B M C細胞傷害性アッセイ

【0249】

図34は、ヒトP B M Cとの培養におけるS k B r - 3細胞の長期殺傷を示す。単独で培養すると、S k B r - 3細胞は増殖し、60時間でほぼ倍増する。ヒトP B M Cを培養物中のS k B r - 3細胞に添加すると、増殖速度が遅くなり、C D 3 3を標的とするアイソタイプ対照T r i N K E Tを添加しても、比較的程度は少ないが、増殖が遅くなる。培養物をトラスツズマブS k B r - 3で処置すると、もはや増殖せず、60時間後、時間ゼロからの細胞の80%のみが残る。S k B r - 3細胞はH E R 2シグナル遮断に対して感受性があるので、S k B r - 3細胞成長に対する効果は、H E R 2シグナル遮断によって、またはA D C CなどのF cエフェクター機能を介して媒介され得る。

30

（実施例15）

H E R 2陽性細胞に対する、T r i N K E T、モノクローナル抗体、または二重特異性抗体によって媒介される休止ヒトN K細胞の細胞傷害活性

40

【0250】

密度勾配遠心分離を使用し、ヒト末梢血軟膜からP B M Cを単離した。単離されたP B M Cを洗浄し、N K細胞単離の準備をした。磁気ビーズを用いたネガティブセクション技術を使用してN K細胞を単離した。単離されたN K細胞の純度は典型的には $> 90\%$ のC D 3 - C D 5 6 + であった。単離されたN K細胞を、 $100 \text{ ng} / \text{mL}$ のI L - 2を含む培地中で培養したか、またはサイトカインなしで一晩休止させた。I L - 2活性化N K細胞または休止N K細胞を、翌日、細胞傷害性アッセイに使用した。

D E L F I A細胞傷害性アッセイ：

【0251】

目的の標的を発現するヒトがん細胞株を培養物から採取し、細胞をH B Sで洗浄し、B

50

A T D A 試薬 (P e r k i n E l m e r A D 0 1 1 6) で標識化するために $10^6 / \text{mL}$ にて成長培地に再懸濁した。製造業者の説明書に従って標的細胞を標識化した。標識化後、細胞を H B S で 3 回洗浄し、 $0.5 \sim 1.0 \times 10^5 / \text{mL}$ にて培養培地に再懸濁した。バックグラウンドウェルを準備するために、標識化した細胞のアリコートを取っておき、細胞を培地からスピアウトした。 $100 \mu\text{l}$ の培地を、ペレット化した細胞を乱さないように 3 連でウェルに注意深く添加した。 $100 \mu\text{l}$ の B A T D A 標識化細胞を 96 ウェルプレートの各ウェルに添加した。ウェルを標的細胞からの自然放出のために保存し、ウェルを 1 % の T r i t o n - X の添加による標的細胞の最大溶解のために準備した。目的の腫瘍標的に対するモノクローナル抗体または T r i N K E T を培養培地中で希釈し、 $50 \mu\text{l}$ の希釈した m A b または T r i N K E T を各ウェルに添加した。休止 N K 細胞および / または活性化 N K 細胞を培養物から採取し、細胞を洗浄し、所望の E : T 比に応じて培養培地に $10^5 \sim 2.0 \times 10^6 / \text{mL}$ にて再懸濁した。 $50 \mu\text{l}$ の N K 細胞をプレートの各ウェルに添加して合計 $200 \mu\text{l}$ の培養体積にした。アッセイの発色前にプレートを 37 にて 5 % C O 2 で 2 ~ 3 時間にわたってインキュベートした。

【 0 2 5 2 】

2 ~ 3 時間培養した後、プレートをインキュベーターから取り出し、細胞を 200g にて 5 分間の遠心分離によってペレット化した。 $20 \mu\text{l}$ の培養上清を、製造業者から提供された清浄なマイクロプレートに移し、 $200 \mu\text{l}$ の室温ユーロピウム溶液を各ウェルに添加した。プレートを光から保護し、プレートシェーカーにおいて 250rpm にて 15 分にわたってインキュベートした。プレートを、V i c t o r 3 または S p e c t r a M a x i 3 X 機器のいずれかを使用して読み取った。特異的溶解 % を以下のように計算した：特異的溶解 % = ((実験的放出 - 自然放出) / (最大放出 - 自然放出)) * 100 %。

モノクローナル抗体および二重特異性 N K 細胞エンゲージャーの組合せは T r i N K E T 活性を再現しない：

【 0 2 5 3 】

図 3 5 は、H E R 2 陽性 C o l o - 2 0 1 細胞株に対する T r i N K E T、モノクローナル抗体、または二重特異性抗体によって媒介される休止ヒト N K 細胞の細胞傷害活性を示す。H E R 2 を標的とする T r i N K E T (A D I - 2 9 4 0 4 (F 0 4)) は、休止ヒト N K 細胞による C o l o - 2 0 1 細胞の最大溶解を誘導した。D 2 6 5 A 突然変異を T r i N K E T の C H 2 ドメインに導入して F c R 結合を無効にした。H E R 2 - T r i N K E T (A D I - 2 9 4 0 4 (F 0 4)) - D 2 6 5 A は C o l o - 2 0 1 細胞の溶解を媒介することができず、N K 細胞に対する C D 1 6 および N K G 2 D の二重標的化の重要性が示される。N K 細胞に対する二重標的化の重要性をさらに実証するために、モノクローナル抗体トラスツズマブを使用して H E R 2 を標的とし、N K 細胞により A D C C を媒介した。トラスツズマブ単独では C o l o - 2 0 1 細胞の N K 細胞溶解を増加させることができたが、トラスツズマブ単独によって達成された最大溶解は T r i N K E T と比較して約 4 分の 1 だった。C D 1 6 および N K G 2 D が同じ分子を標的とすることの重要性を理解するために、T r i N K E T (A D I - 2 9 4 0 4 (F 0 4)) 活性を、トラスツズマブと組み合わせた H E R 2 および N K G 2 D を標的とする二重特異性抗体の活性と比較した。等モル濃度で使用した場合、二重特異性およびトラスツズマブの組合せは、休止ヒト N K 細胞による C o l o - 2 0 1 細胞の最大溶解を媒介することができなかった。トラスツズマブ + 二重特異性の組合せの不成功は、1 つの分子中に T r i N K E T の三重特異性結合を含有することの重要性を示す。

参照による組み込み

(実施例 1 6)

架橋アッセイ

【 0 2 5 4 】

ヒト H E R 2 を用いて形質導入した R M A 細胞を、H E R 2 標的化 T r i N K E T による H E R 2 および N K G 2 D への同時結合を試験するために使用した。T r i N K E T を

表面HER2を染色するために20 µg/mLで使用した。次に、Tr i N K E Tの結合をビオチン化組換えヒトNK G 2 D - F cを使用して検出した。次に、結合NK G 2 D - F cをストレプトアビジン - A P Cを使用して検出した。細胞をフローサイトメトリーによって分析し、Tr i N K E T架橋をアイソタイプ染色および未染色細胞集団と比較した。図38Aは、HER2の結合ドメインを含むTr i N K E T - C 2 6が、hNK G 2 D - F cをRMA - HER2細胞に架橋することを示し、図38Bは、HER2の結合ドメインを含むTr i N K E T - F 0 4が、hNK G 2 D - F cをRMA - HER2細胞に架橋することを示す。

【0255】

本明細書で参照される特許文献および科学論文の各々の開示全体は、すべての目的のために参照により組み込まれる。

10

等価物

【0256】

本発明は、その精神または本質的な特徴から逸脱せずに他の特定の形態で実現されてもよい。したがって、前述の実施形態は、本明細書で記載している本発明を限定するのではなく、すべての点で例示的であると見なされるべきである。したがって、本発明の範囲は、前述の記載によってではなく、添付の特許請求の範囲によって示され、特許請求の範囲の等価の意味および範囲内に入るすべての変更はその中に包含されることが意図される。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

20

(a) NK G 2 Dに結合する第1の抗原結合部位と、

(b) HER2に結合する第2の抗原結合部位と、

(c) C D 1 6に結合するに十分な抗体F cドメインもしくはその一部分、またはC D 1 6に結合する第3の抗原結合部位とを含むタンパク質。

(項目2)

前記第1の抗原結合部位が、ヒト、非ヒト霊長類、およびげっ歯動物のNK G 2 Dに結合する、項目1に記載のタンパク質。

(項目3)

前記第1の抗原結合部位が、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、項目1または2に記載のタンパク質。

30

(項目4)

前記重鎖可変ドメインおよび前記軽鎖可変ドメインが、同じポリペプチド上に存在する、項目3に記載のタンパク質。

(項目5)

前記第2の抗原結合部位が、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、項目3または4に記載のタンパク質。

(項目6)

前記第2の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインおよび前記軽鎖可変ドメインが、同じポリペプチド上に存在する、項目5に記載のタンパク質。

40

(項目7)

前記第1の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、前記第2の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する、項目5または6に記載のタンパク質。

(項目8)

前記第1の抗原結合部位が、配列番号1と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインを含む、先行する項目先行する項目のいずれか一項に記載のタンパク質。

(項目9)

前記第1の抗原結合部位が、配列番号41と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号42と少なくとも90%同一の軽鎖可変ドメインとを含む、項目1から7の

50

いずれかに記載のタンパク質。

(項目 1 0)

前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 4 3 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインと、配列番号 4 4 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインとを含む、項目 1 から 7 のいずれかに記載のタンパク質。

(項目 1 1)

前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 4 5 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインと、配列番号 4 6 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインとを含む、項目 1 から 7 のいずれかに記載のタンパク質。

(項目 1 2)

前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 4 7 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインと、配列番号 4 8 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインとを含む、項目 1 から 7 のいずれかに記載のタンパク質。

(項目 1 3)

前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 9 4 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインと、配列番号 9 5 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインとを含む、項目 1 から 7 のいずれかに記載のタンパク質。

(項目 1 4)

前記第 1 の抗原結合部位が、配列番号 1 0 2 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインと、配列番号 1 0 3 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメインとを含む、項目 1 から 7 のいずれかに記載のタンパク質。

(項目 1 5)

前記第 1 の抗原結合部位が、単ドメイン抗体である、項目 1 または 2 に記載のタンパク質。

(項目 1 6)

前記単ドメイン抗体が、V_HH 断片または V_{NAR} 断片である、項目 1 5 に記載のタンパク質。

(項目 1 7)

前記第 2 の抗原結合部位が、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む、項目 1、2、1 5、または 1 6 のいずれか一項に記載のタンパク質。

(項目 1 8)

前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインおよび前記軽鎖可変ドメインが、同じポリペプチド上に存在する、項目 1 7 に記載のタンパク質。

(項目 1 9)

前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 4 9 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 5 3 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、先行する項目のいずれかに記載のタンパク質。

(項目 2 0)

前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、
配列番号 5 0 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列、
配列番号 5 1 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列、および
配列番号 5 2 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列
を含むアミノ酸配列を含む、先行する項目のいずれかに記載のタンパク質。

(項目 2 1)

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、
配列番号 5 4 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列、
配列番号 5 5 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列、および
配列番号 5 6 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列
を含むアミノ酸配列を含む、項目 2 0 に記載のタンパク質。

10

20

30

40

50

(項目 2 2)

前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 5 7 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 5 8 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載のタンパク質。

(項目 2 3)

前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、
配列番号 7 7 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列、
配列番号 7 8 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列、および
配列番号 7 9 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列
を含むアミノ酸配列を含む、項目 1 から 1 8 または 2 2 のいずれか一項に記載のタンパク質。

10

(項目 2 4)

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、
配列番号 8 0 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列、
配列番号 8 1 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列、および
配列番号 8 2 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列
を含むアミノ酸配列を含む、項目 2 3 に記載のタンパク質。

(項目 2 5)

前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、配列番号 5 9 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含み、前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号 6 0 と少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載のタンパク質。

20

(項目 2 6)

前記第 2 の抗原結合部位の前記重鎖可変ドメインが、
配列番号 8 3 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 1 配列、
配列番号 8 4 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 2 配列、および
配列番号 8 5 のアミノ酸配列と同一の重鎖 C D R 3 配列
を含むアミノ酸配列を含む、項目 1 から 1 8 または 2 5 のいずれか一項に記載のタンパク質。

30

(項目 2 7)

前記第 2 の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、
配列番号 8 6 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 1 配列、
配列番号 8 7 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 2 配列、および
配列番号 8 8 のアミノ酸配列と同一の軽鎖 C D R 3 配列
を含むアミノ酸配列を含む、項目 2 6 に記載のタンパク質。

(項目 2 8)

前記第 2 の抗原結合部位が、単ドメイン抗体である、項目 1 から 4 または 8 から 1 6 のいずれか一項に記載のタンパク質。

(項目 2 9)

前記第 2 の抗原結合部位が、V_HH 断片または V_{NAR} 断片である、項目 2 8 に記載のタンパク質。

40

(項目 3 0)

前記タンパク質が、C D 1 6 に結合するに十分な抗体 F c ドメインの一部分を含み、前記抗体 F c ドメインが、ヒンジおよび C H 2 ドメインを含む、先行する項目のいずれか一項に記載のタンパク質。

(項目 3 1)

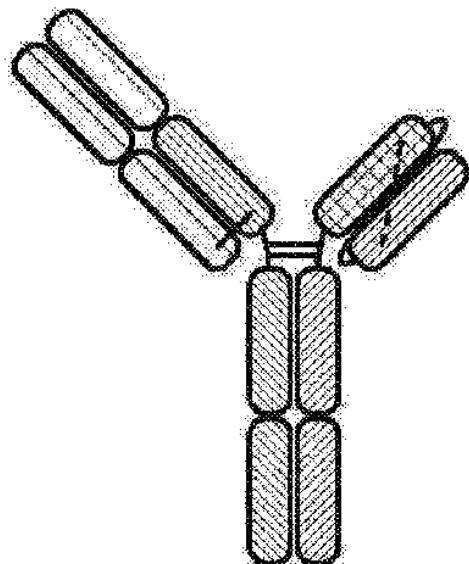
前記抗体 F c ドメインが、ヒト I g G 1 抗体のヒンジおよび C H 2 ドメインを含む、項目 3 0 に記載のタンパク質。

(項目 3 2)

50

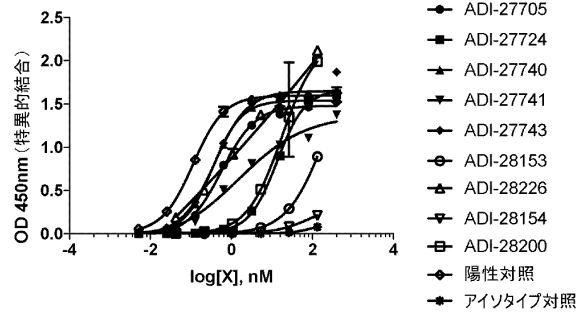
【圖 2】

FIG. 2



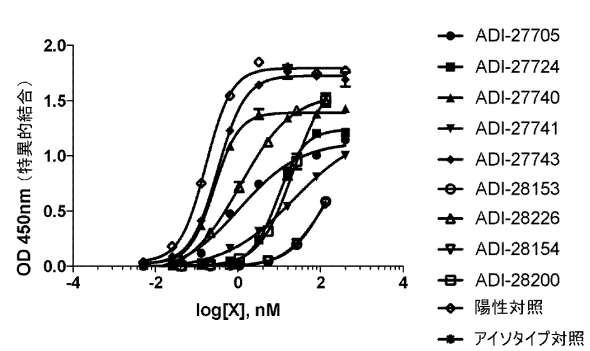
【図 3】

FIG. 3



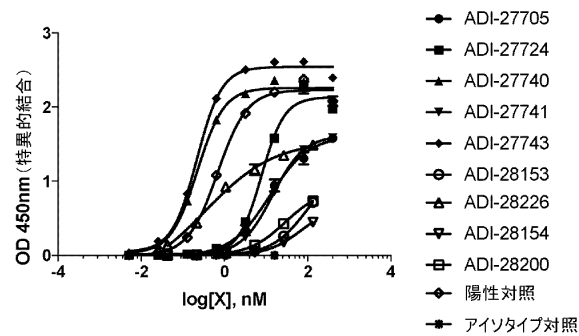
【図 4】

FIG. 4



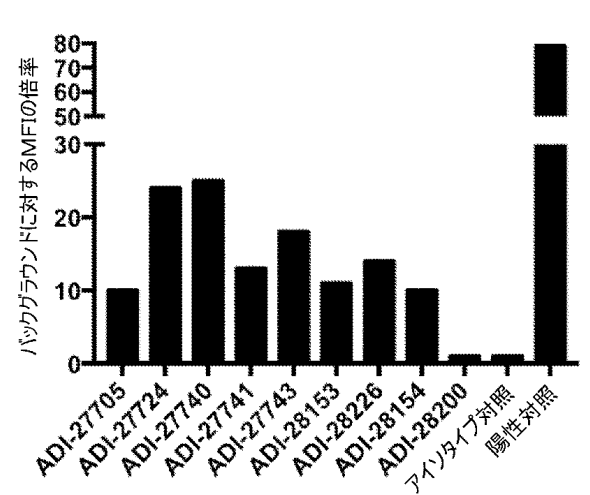
【図 5】

FIG. 5



【図 6】

FIG. 6



10

20

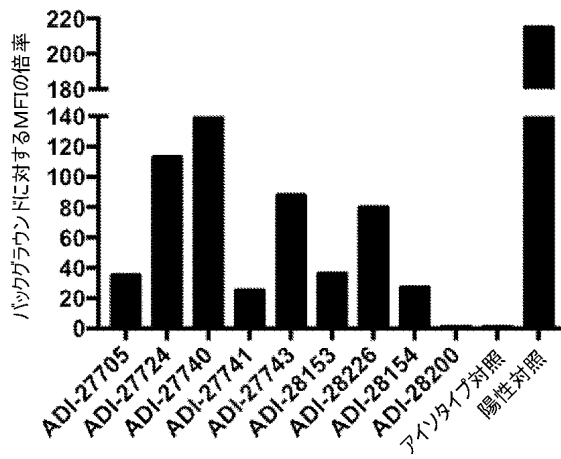
30

40

50

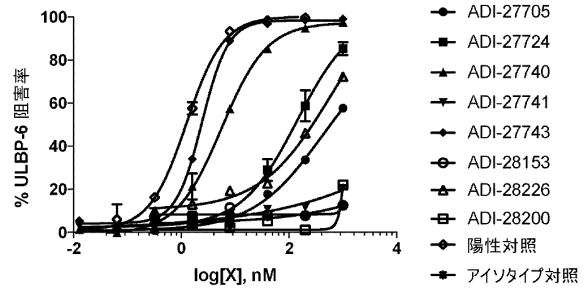
【図 7】

FIG. 7



【図 8】

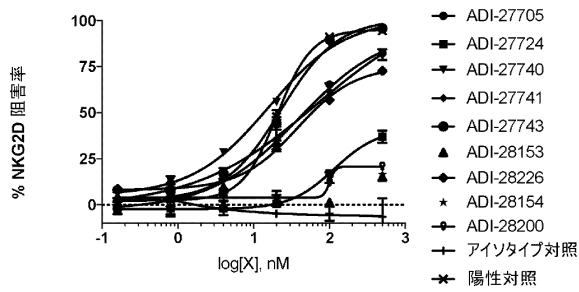
FIG. 8



10

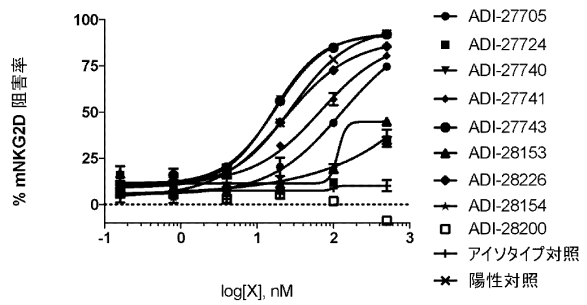
【図 9】

FIG. 9



【図 10】

FIG. 10



20

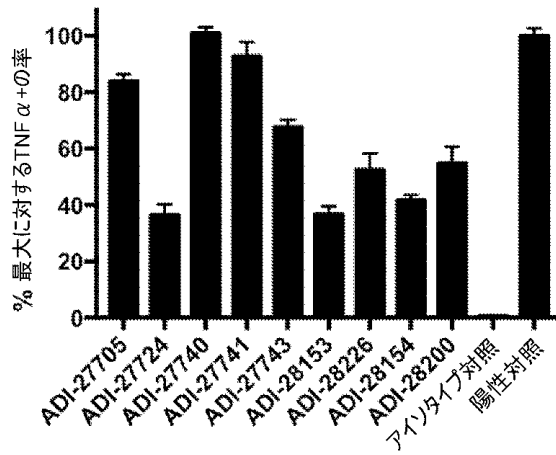
30

40

50

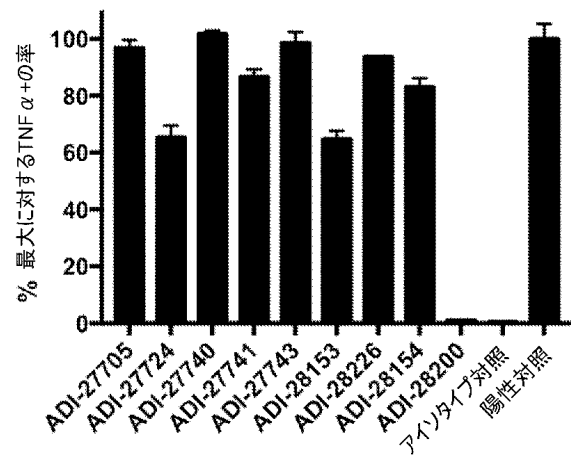
【図 1 1】

FIG. 11



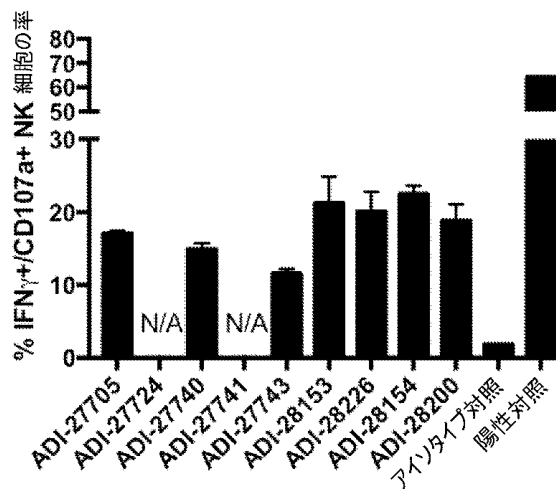
【図 1 2】

FIG. 12



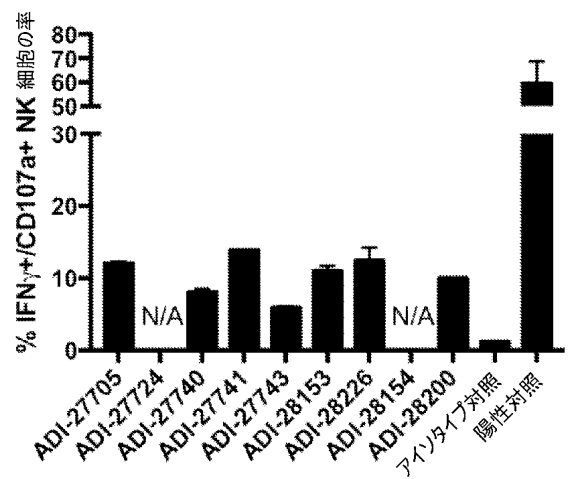
【図 1 3】

FIG. 13



【図 1 4】

FIG. 14



10

20

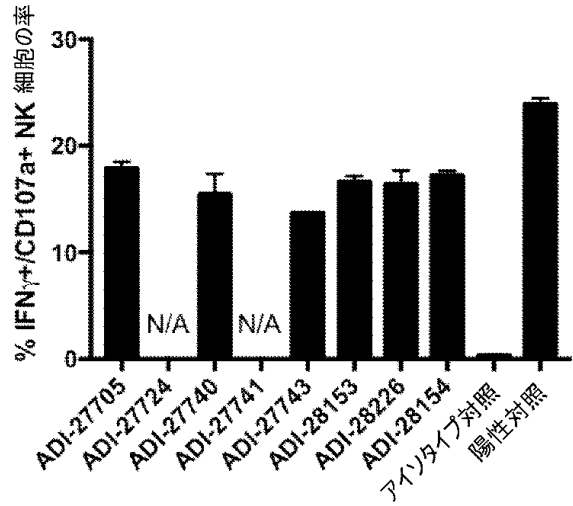
30

40

50

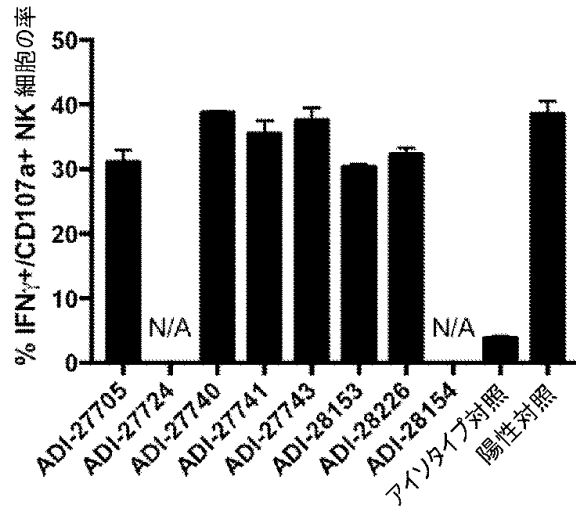
【図 15】

FIG. 15



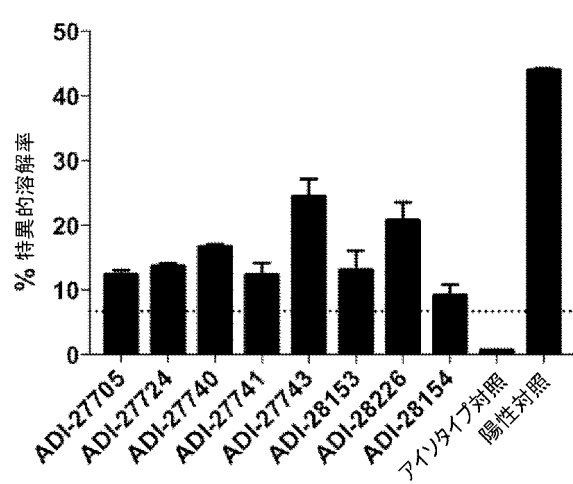
【図 16】

FIG. 16



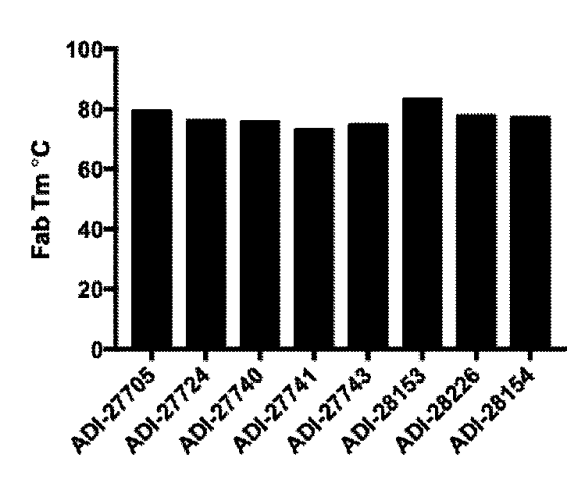
【図 17】

FIG. 17



【図 18】

FIG. 18



10

20

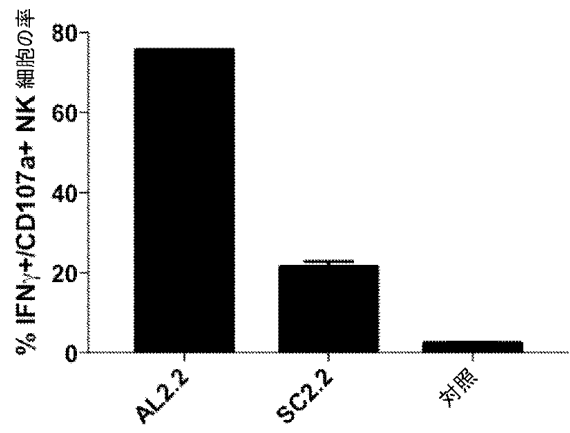
30

40

50

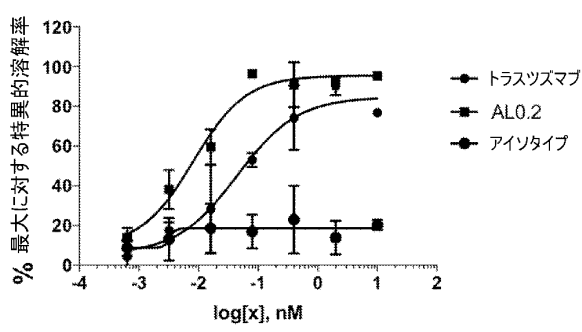
【図 19】

FIG. 19



【図 20】

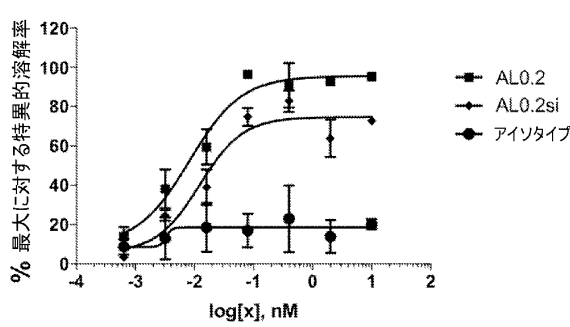
FIG. 20



10

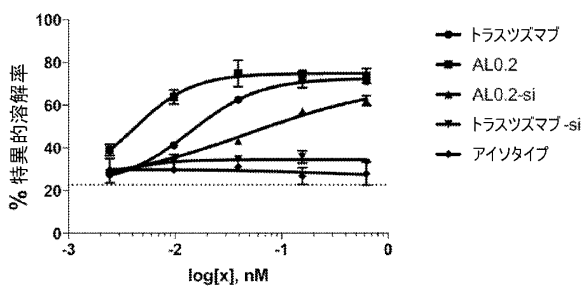
【図 21】

FIG. 21



【図 22】

FIG. 22



20

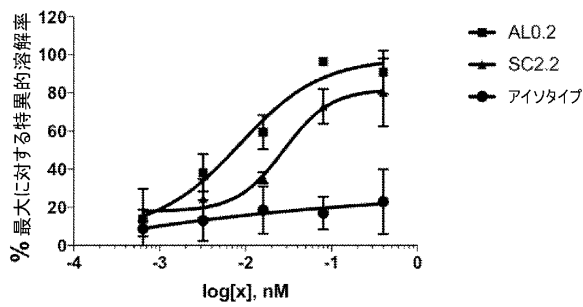
30

40

50

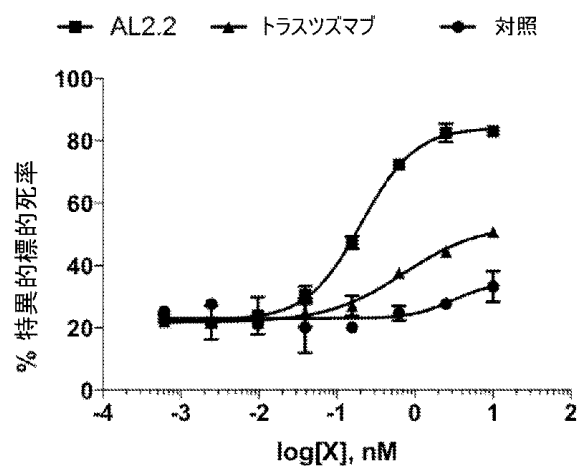
【図 2 3】

FIG. 23



【図 2 4】

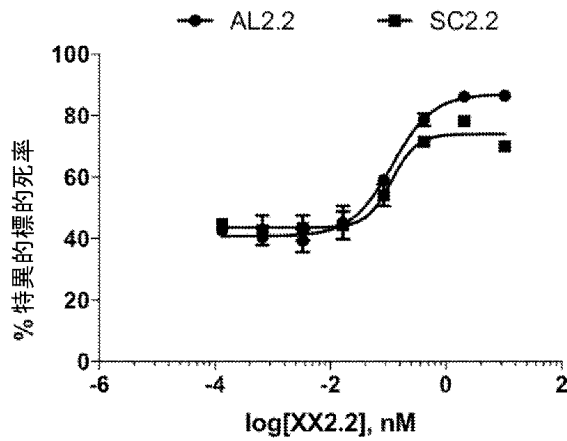
FIG. 24



10

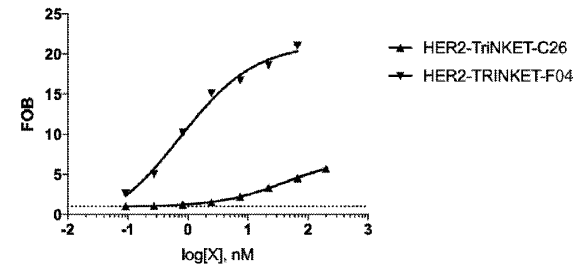
【図 2 5】

FIG. 25



【図 2 6】

FIG. 26



20

30

40

50

【図 27 - 1】

FIG. 27A

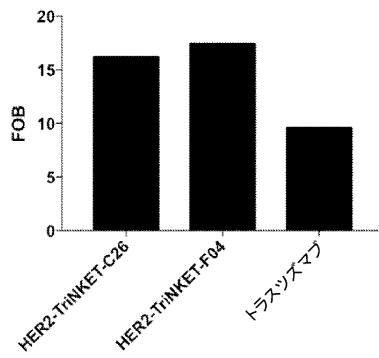
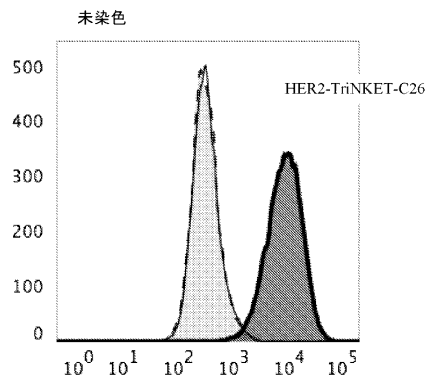
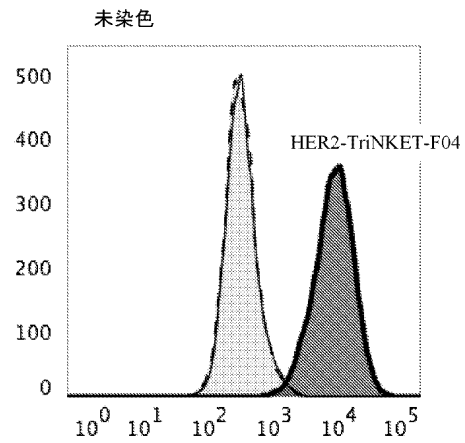


FIG. 27B



【図 27 - 2】

FIG. 27C

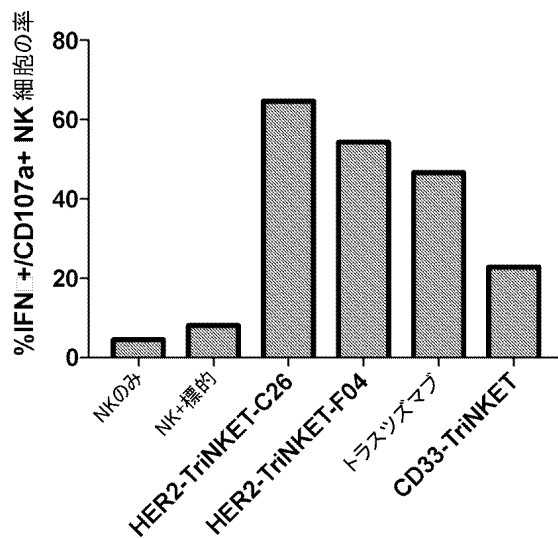


10

20

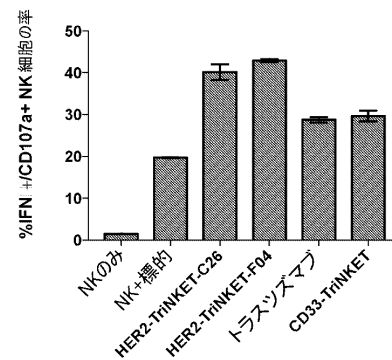
【図 28 - 1】

FIG. 28A



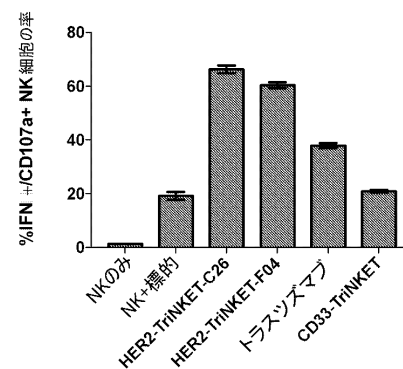
【図 28 - 2】

FIG. 28B



30

FIG. 28C



40

50

【 図 2 9 】

FIG. 29A

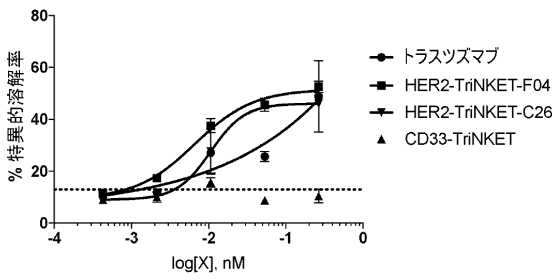
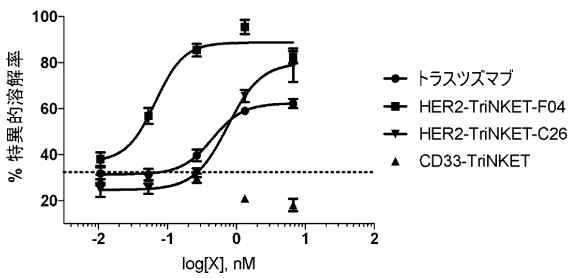
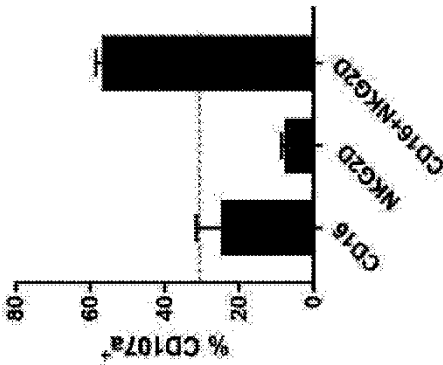


FIG. 29B



【 図 3 0 A 】

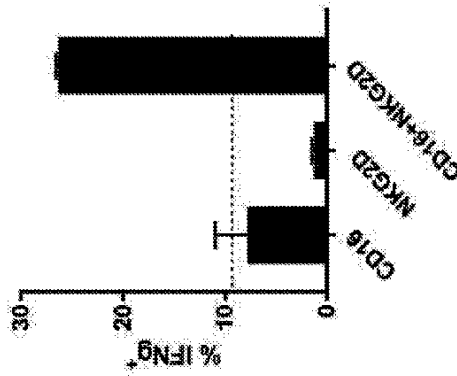
FIG. 30A



10

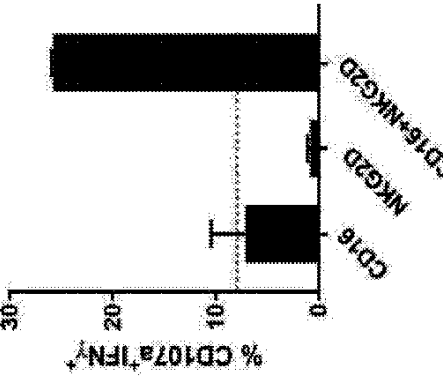
【 図 3 0 B 】

FIG. 30B



【 図 3 0 C 】

FIG. 30C



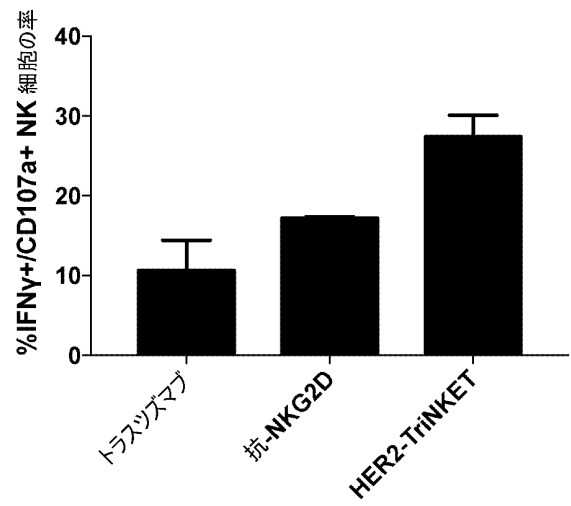
30

40

50

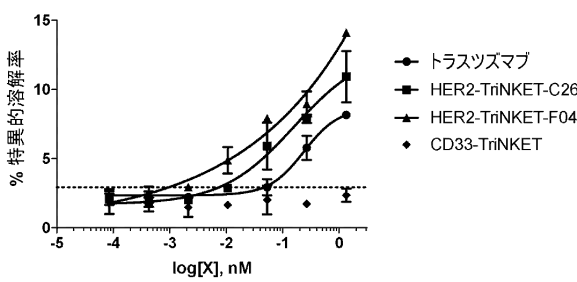
【図 3 1】

FIG. 31



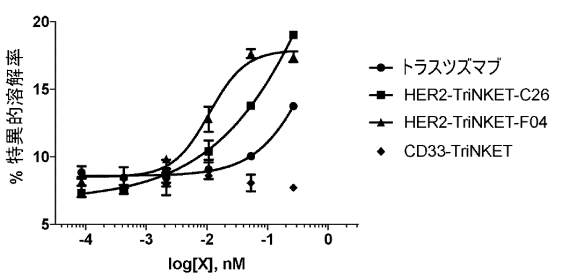
【図 3 2 - 1】

FIG. 32A



10

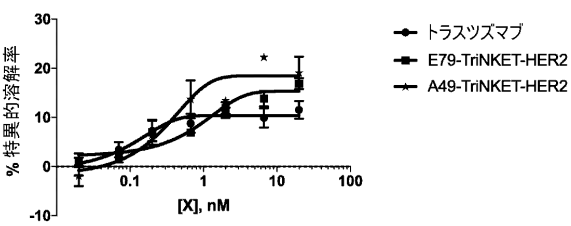
FIG. 32B



20

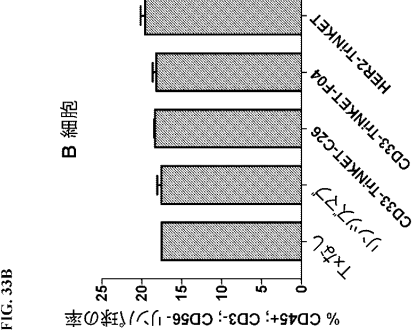
【図 3 2 - 2】

FIG. 32C



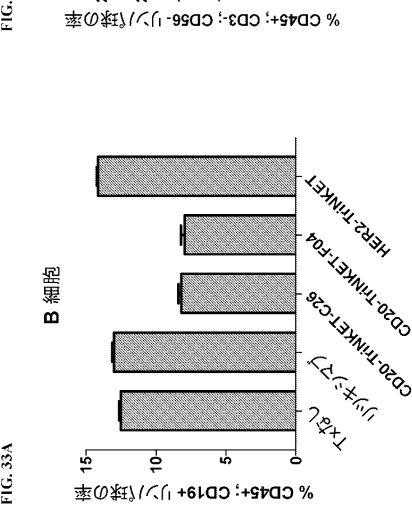
【図 3 3 - 1】

FIG. 33B



30

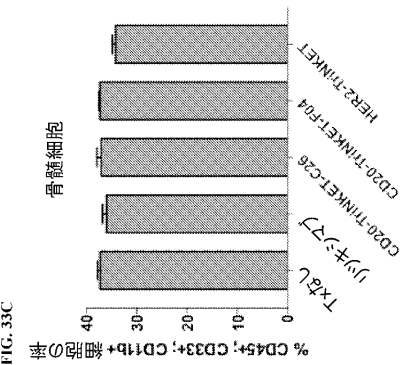
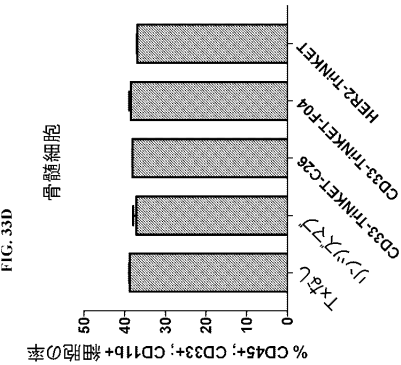
FIG. 33A



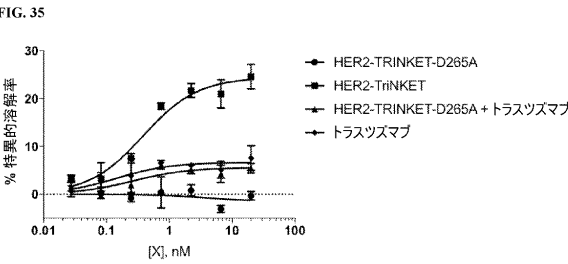
40

50

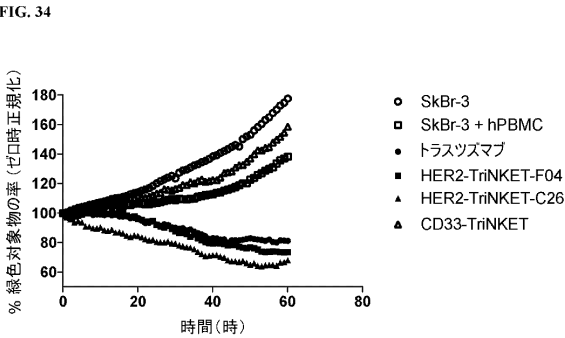
【図 3 3 - 2】



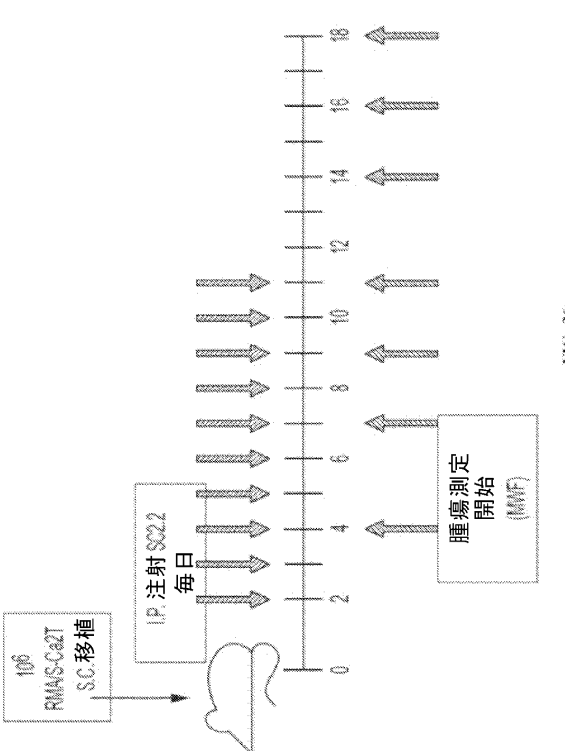
【図 3 5】



【図 3 4】



【図 3 6】



10

20

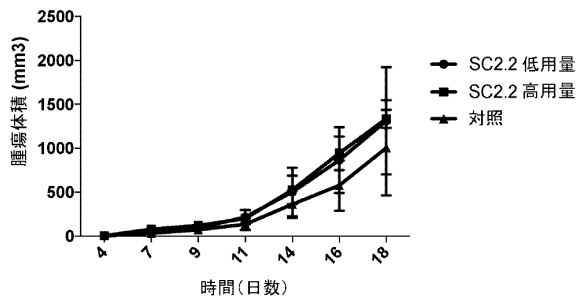
30

40

50

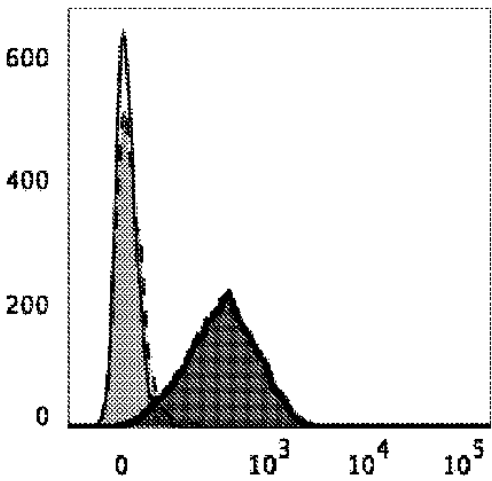
【図 3 7】

FIG. 37



【図 3 8 A】

FIG. 38A

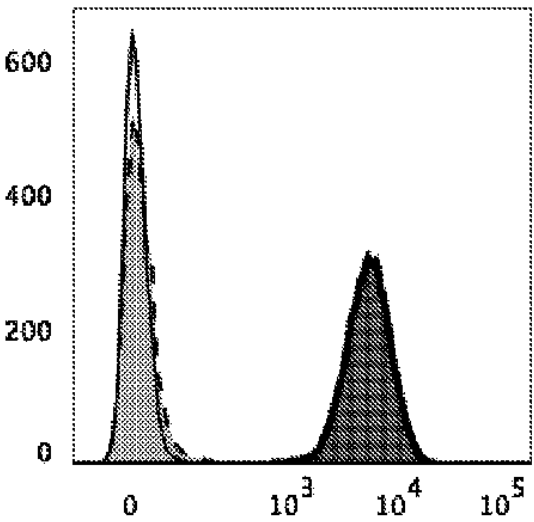


10

20

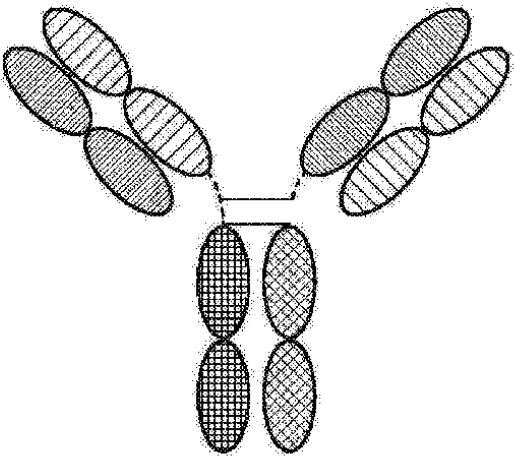
【図 3 8 B】

FIG. 38B



【図 3 9】

FIG. 39



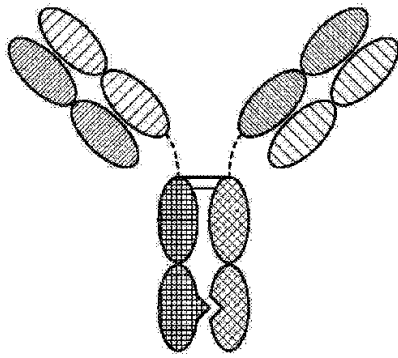
30

40

50

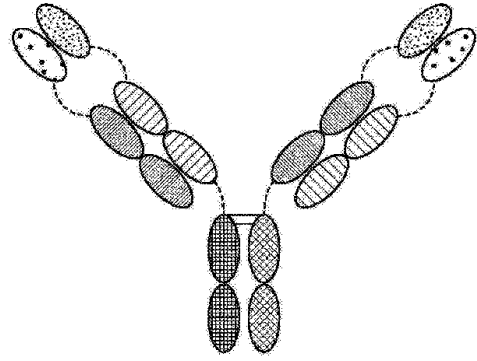
【 図 4 0 】

FIG. 40



【 図 4 1 】

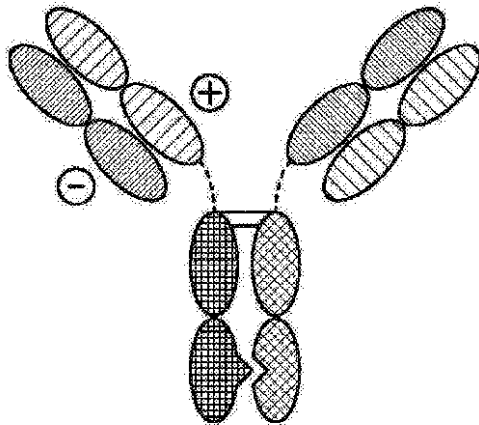
FIG. 41



10

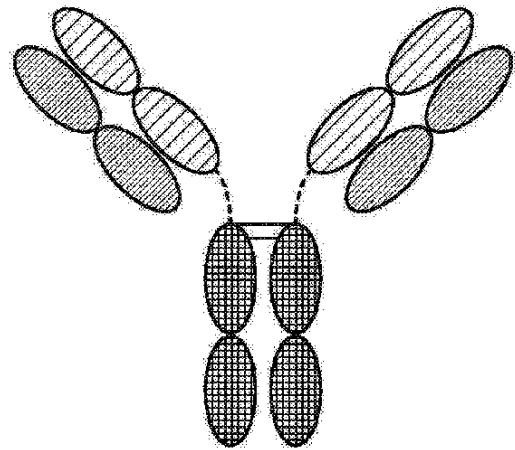
【 図 4 2 】

FIG. 42



【 図 4 3 】

FIG. 43



20

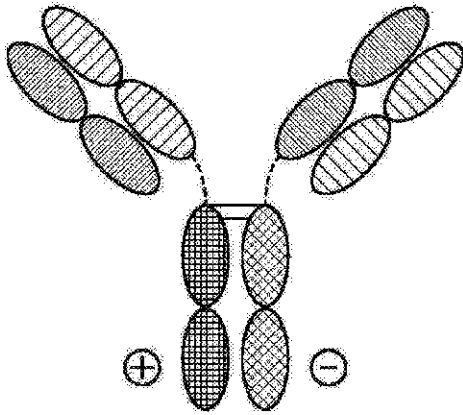
30

40

50

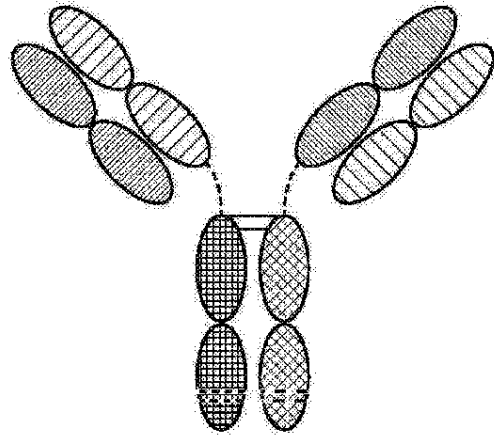
【 図 4 4 】

FIG. 44



【 図 4 5 】

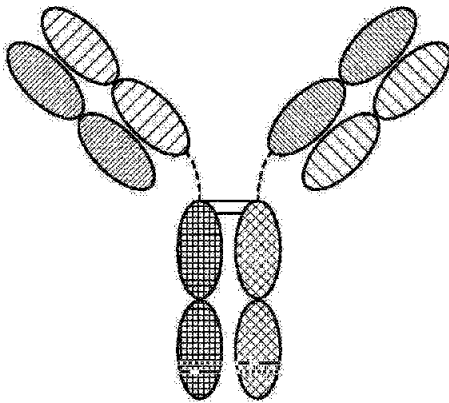
FIG. 45



10

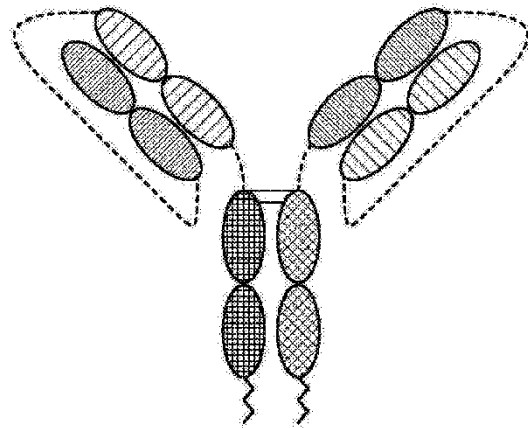
【 図 4 6 】

FIG. 46



【 図 4 7 】

FIG. 47



20

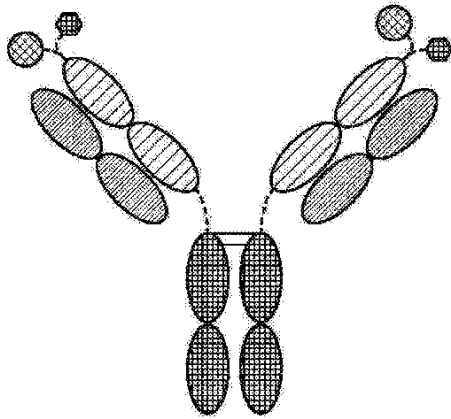
30

40

50

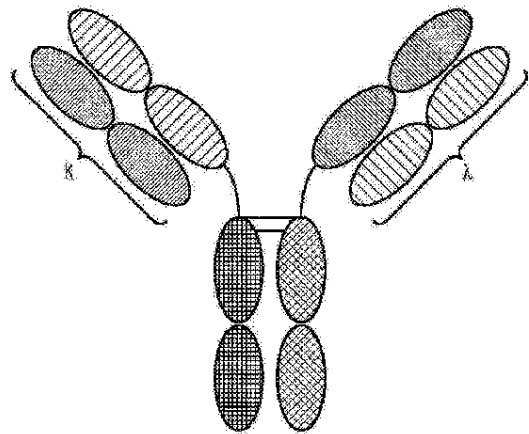
【 図 4 8 】

FIG. 48



【 図 4 9 A 】

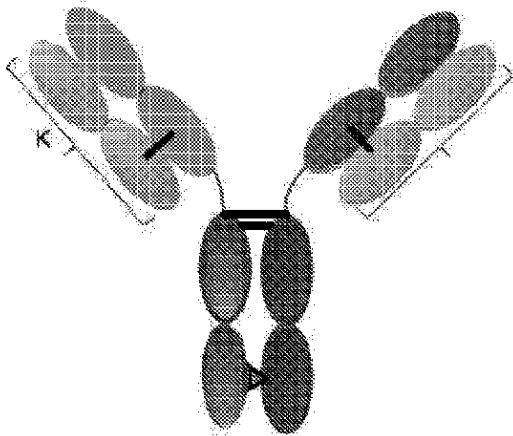
FIG. 49A



10

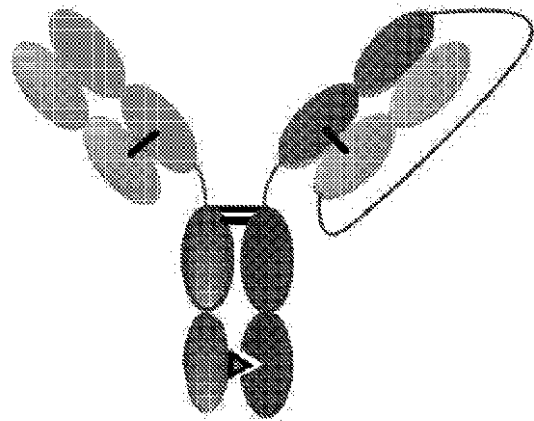
【 図 4 9 B 】

FIG. 49B



【 図 5 0 】

FIG. 50



20

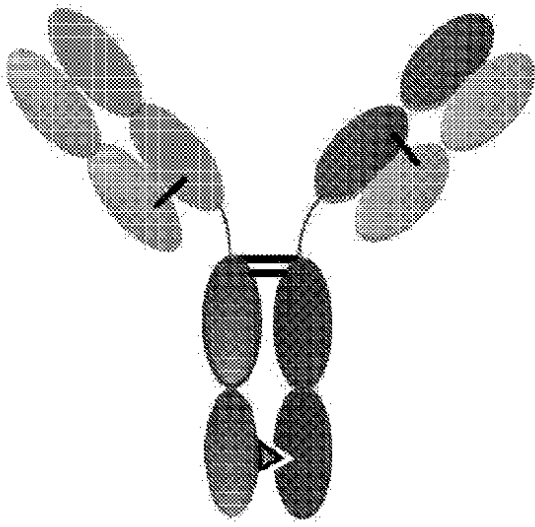
30

40

50

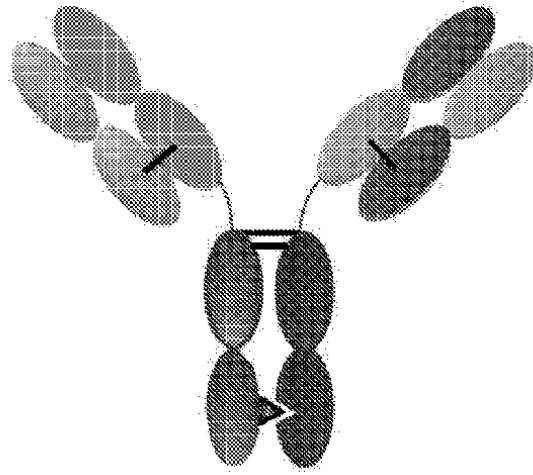
【図 5 1】

FIG. 51



【図 5 2】

FIG. 52

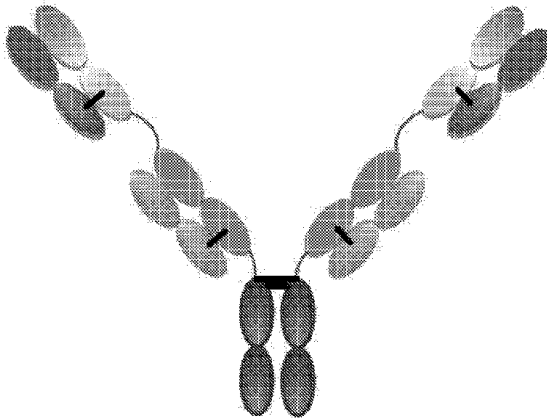


10

20

【図 5 3】

FIG. 53



30

【配列表】

0007685821000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
		C 1 2 P	21/08
			Z N A

- 弁護士 山本 健策
- (72)発明者 チャン, グレゴリー ピー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 5 5, メドフォード, サンダース ストリート 1 4 3
- (72)発明者 チュン, アン エフ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 3, リンカーン, モーニングサイド レーン 2 5
- (72)発明者 ヘイニー, ウィリアム
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 7 8, ウェイランド, リンカーン ロード 6 1
- (72)発明者 ランディ, ブラッドリー エム.
アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 0 3 7 6 6, レバノン, ルーセント ドライブ 7
- (72)発明者 プリンツ, ビアンカ
アメリカ合衆国 ニューハンプシャー 0 3 7 6 6, レバノン, ルーセント ドライブ 7

- 合議体
- 審判長 上條 肇
- 審判官 加々美 一恵
- 審判官 北田 祐介

(56)参考文献 特表 2 0 1 3 - 5 0 0 7 2 1 号公報 (J P , A)

- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)
- C12N15/00-15/90
- JST7580/JSTPlus/JMEDPlus(JDream3)
- PubMed
- BIOSIS/CAPLUS/MEDLINE/EMBASE(STN)
- Uniprot/GeneSeq