

(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

C 1 2 N	15/62 (2006.01)	F I	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)
審判番号	不服2023-30(P2023-30/J1)
審判請求日	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 0 2 4 5 1 マサチューセ
	ツツ州ウォルサム、サード・アベニュー
	1 8 0 、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】 H e r 2 、 N K G 2 D および C D 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) N K 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) 二緒になって 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、ヒトおよび非ヒト靈長類の N K 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。

10

【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omainアミノ酸配列および軽鎖可変ドメインアミノ酸配列；

20

(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omainアミノ酸配列および軽鎖可変ドメインアミノ酸配列；

30

(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omain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omain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

40

(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omain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omain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】

50

前記第1の抗原結合部位が、

(a) 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；

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；および

配列番号109の軽鎖CDR3アミノ酸配列；

(b) 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；

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；および

配列番号70の軽鎖CDR3アミノ酸配列；

(c) 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；

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；および

配列番号76の軽鎖CDR3アミノ酸配列；または

(d) 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；

配列番号99の軽鎖CDR1アミノ酸配列；

配列番号100の軽鎖CDR2アミノ酸配列；および

配列番号101の軽鎖CDR3アミノ酸配列；または

(e) 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；および

配列番号64の重鎖CDR3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10】

前記第1の抗原結合部位が、單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11】

前記單一ドメイン抗体が、V_HH断片またはV_NA_R断片である、請求項10に記載のタンパク質。

【請求項12】

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、10、および11のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項13】

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12に記載のタンパク質。

【請求項14】

前記第2の抗原結合部位が、

(a) 配列番号49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53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50の重鎖CDR1アミノ酸配列、配列番号51の重鎖CDR2アミノ酸配列、配列番号52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54の軽鎖CDR1アミノ酸配列、配列番号55の軽鎖CDR2アミノ酸配列、および配列番号56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；

10

20

30

40

50

(b) 配列番号 5 7 と少なくとも 9 0 % 同一の重鎖可変ドメインアミノ酸配列および配列番号 5 8 と少なくとも 9 0 % 同一の軽鎖可変ドメイン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 7 7 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 7 8 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 7 9 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 8 0 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 8 1 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 8 2 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 5 9 と少なくとも 9 0 % 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 6 0 と少なくとも 9 0 % 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 8 3 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 8 4 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 8 5 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 8 6 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 8 7 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 8 8 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 1 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 1 5】

前記第 2 の抗原結合部位が

(a) 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；

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；

(b) 配列番号 7 7 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 7 8 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列；

配列番号 7 9 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列；

配列番号 8 0 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 8 1 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列；および

配列番号 8 2 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列；または

(c) 配列番号 8 3 の重鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 8 4 の重鎖 C D R 2 アミノ酸配列；

配列番号 8 5 の重鎖 C D R 3 アミノ酸配列

配列番号 8 6 の軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列；

配列番号 8 7 の軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列；および

配列番号 8 8 の軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列

を含む、請求項 1 から 1 3 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 1 6】

前記第 2 の抗原結合部位が、單一ドメイン抗体である、請求項 1 から 4 および 8 から 1 1 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 1 7】

前記第 2 の抗原結合部位が、V H H 断片または V N A R 断片である、請求項 1 6 に記載のタンパク質。

【請求項 1 8】

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 I g G 1 抗体のヒンジおよび C H 2 ドメインを含む、請求項 1 から 1 7 のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項 1 9】

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 I g G 1 の F c ドメインと少なくとも 9 0 % 同一のアミノ酸配列を含み、Q 3 4 7 、 Y 3 4 9 、 T 3 5 0 、 L 3 5 1 、 S 3 5 4 、 E 3 5 6 、 E 3 5 7 、 K 3 6 0 、 Q 3 6 2 、 S 3 6 4 、 T 3 6 6 、 L 3 6 8 、 K 3 7 0 、 N 3 9 0 、 K 3 9 2 、 T 3 9 4 、 D 3 9 9 、 S 4 0 0 、 D 4 0 1 、 F 4 0 5

10

20

30

40

50

、Y407、K409、T411、およびK439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18に記載のタンパク質。

【請求項20】

請求項1から19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21】

請求項1から19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22】

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19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。

10

【請求項23】

治療に使用するための、請求項1から19のいずれか一項に記載のタンパク質または請求項20に記載の製剤を含む、組成物。

【請求項24】

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19のいずれか一項に記載のタンパク質または請求項20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25】

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24に記載の組成物または製剤。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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。

30

【0002】

配列表

本出願は、ASCII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ASCIIコピーは2018年2月16日に作成され、DFY-008PC_SL.txtという名称であり、92,807バイトのサイズである。

【0003】

発明の分野

本発明は、ヒト上皮増殖因子受容体2(HER2またはErbb2)、NKG2D受容体、およびCD16に結合する多重特異性結合タンパク質に関する。

40

【背景技術】

【0004】

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。

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 2016 / 134371 およびWO 2015 / 095412 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- γ 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2016 / 134371号

【文献】国際公開第2015 / 095412号

40

【発明の概要】**【課題を解決するための手段】****【 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が、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VHH抗体もしくは軟骨魚類に見出されるもののようなVNAR抗体などの單一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/または配列番号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%)同一のアミノ酸配列と、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】

10

20

30

40

50

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。

【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。

【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。

【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。

【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する。方法は、本明細書

10

20

30

40

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】

【0020】

【図1】図1は、NKG2D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CD16に結合するFc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。

【0021】

【図2】図2は、scFvフォーマットにおけるNKG2D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CD16に結合するFc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。

【0022】

【図3】図3は、ELISAアッセイにおけるヒト組換えNKG2Dに対するNKG2D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。

【0023】

【図4】図4は、ELISAアッセイにおけるカニクイザル組換えNKG2Dに対するNKG2D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。

【0024】

【図5】図5は、ELISAアッセイにおけるマウス組換えNKG2Dに対するNKG2D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。

【0025】

【図6】図6は、バックグラウンドに対する平均蛍光強度（MFI）倍率を示すフローサイトメトリーによる、ヒトNKG2Dを発現するEL4細胞に対するNKG2D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。

【0026】

【図7】図7は、バックグラウンドに対する平均蛍光強度（MFI）倍率を示すフローサイトメトリーによる、マウスNKG2Dを発現するEL4細胞に対するNKG2D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。

【0027】

【図8】図8は、天然リガンドのULBP-6と競合することによる、組換えヒトNKG2D-Fcに対するNKG2D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。

【0028】

【図9】図9は、天然リガンドのMICAと競合することによる、組換えヒトNKG2D-Fcに対するNKG2D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。

【0029】

【図10】図10は、天然リガンドのRaे-1デルタと競合することによる、組換えマウスNKG2D-Fcに対するNKG2D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。

【0030】

【図11】図11は、ヒトNKG2D-CD3ゼータ融合タンパク質を発現するTNF-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、NKG2D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NKG2Dの活性化を示す棒グラフである。

【0031】

【図12】図12は、マウスNKG2D-CD3ゼータ融合タンパク質を発現するTNF-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、NKG2D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NKG2Dの活性化を示す棒グラフである。

【0032】

【図13】図13は、NKG2D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、NKG2D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、NKG2D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、NKG2D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NKG2D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、NKG2D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】

【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。

20

【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NKG2DへのHER2標的化TruNKE-Tの結合プロファイルである。図26は、同じ2つのNKG2D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TruNKE-Tの結合プロファイルである。図27Bは、TruNKE-Tを含有するNKG2D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、TruNKE-Tを含有するNKG2D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Trineketeの結合プロファイルである。図27Bは、Trineketeを含有するNKG2D結合クローニング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、Trineketeを含有するNKG2D結合クローニング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いる。

【0047】

【図28-1】図28A～28Cは、Trinekete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、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Trinekete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28Aは、ヒトNK細胞が、SKBr-3細胞と培養された場合、Trinekete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、Trinekete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、Trineketeによって活性化されることを示す。

10

【図28-2】図28A～28Cは、Trinekete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、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Trinekete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28Aは、ヒトNK細胞が、SKBr-3細胞と培養された場合、Trinekete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、Trinekete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、Trineketeによって活性化されることを示す。

20

【0048】

【図29】図29Aおよび29Bは、Trinekete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29Aは、HER2高-SKBr-3腫瘍細胞の活性化ヒトNK細胞の殺傷を示す。図29Bは、HER2低-786-O腫瘍細胞のヒトNK細胞の殺傷を示す。Trinekete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30A～30Cは、CD16およびNKG2Dを使用したNK細胞の相乗的活性化の棒グラフである。図30AはCD107aのレベルを示し、図30BはIFNのレベルを示し、図30CはCD107aおよびIFNのレベルを示す。グラフは平均($n = 2$) ± 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。

30

【0050】

【図31】図31は、NKG2DおよびCD16を標的とするTrinekete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IgG1アイソタイプである。グラフは平均($n = 2$) ± SDを示している。

40

【0051】

【図32-1】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Trinekete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。

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hPBM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-intoholes)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】

10

20

30

40

50

【図42】図42は、Fcに融合した標的1および標的2に結合する2つのFabを含有するヘテロ二量体構築物である、直交性Fab界面（オルト-Fab）形態におけるTrinKETの図である。LC-HCの対合は、直交界面によって確実になっている。ヘテロ二量体化は、Fcにおける突然変異によって確実になっている。

【0062】

【図43】図43は、2-in-1 IgフォーマットにおけるTrinKETの図である。

【0063】

【図44】図44は、Fcに融合した標的1および標的2に結合する2つの異なるFabを含有するヘテロ二量体構築物である、ES形態におけるTrinKETの図である。ヘテロ二量体化は、Fcにおける静電的ステアリング突然変異によって確実になっている。

10

【0064】

【図45】図45は、Fabアーム交換形態におけるTrinKET、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Fab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。Fabアーム交換形態（cFae）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。

【0065】

【図46】図46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、SEED Body形態におけるTrinKETの図である。

20

【0066】

【図47】図47は、2つの異なるHC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、LuZ-Y形態におけるTrinKETの図である。LuZ-Y形態は、Fcに融合した標的1および2に結合する2つの異なるscFabを含有するヘテロ二量体である。ヘテロ二量体化は、Fc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なっている。

【0067】

【図48】図48は、Cov-X-Body形態におけるTrinKETの図である。

30

【0068】

【図49】図49Aおよび49Bは、ヘテロ二量体化突然変異によって安定化されたFcに融合した2つの異なるFabを有するヘテロ二量体構築物である、-Body形態におけるTrinKETの図である。抗原1を標的とするFab1はカッパLCを含有し、一方、抗原2を標的とする第2のFabはラムダLCを含有する。図49Aは、-Bodyの一形態の例示的な図であり、図49Bは、別の-Bodyの例示的な図である。

【0069】

【図50】図50は、Fcに融合した、標的1に結合するFabと、標的2に結合するscFabとを含む、Oasc-Fabヘテロ二量体構築物である。ヘテロ二量体化は、Fcにおける突然変異によって確実になっている。

40

【0070】

【図51】図51は、抗原1および2に結合する2つの異なる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構築物である、DuetMabである。Fab1および2は、LCおよびHC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。

【0071】

【図52】図52は、ヘテロ二量体化によって安定化されたFcに融合した標的1および2に結合する2つの異なるFabを有するヘテロ二量体構築物である、CrossmAbである。CLドメインおよびCH1ドメインと、VLドメインおよびVLドメインとが切り換わっており、例えば、CH1は、VLとインラインで融合しており、一方、CL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。

10

【 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。

20

本明細書で使用される場合、「抗原結合部位」という用語は、抗原結合に関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つの高度に分岐したストレッチは、「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に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、「單一ドメイン抗体」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。

30

【 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。

40

【 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

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。10

【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中間体として有用な塩の調製に利用され得る。20

【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C_{1~4}アルキルである）の化合物などが含まれる。30

【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、フルコヘブタン酸塩、グリセロリン酸、ヘミ硫酸塩、ヘブタン酸塩、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、チオシアノ酸塩、トシリ酸塩、ウンデカン酸塩などが含まれる。塩の他の例には、Na⁺、NH₄⁺ および NW₄⁺（式中、WはC_{1~4}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。40

【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50

る、含む (including)、もしくは含む (comprising) 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。

【0086】

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

【0087】

本発明は、がん細胞における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NKG2D受容体およびCD16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HER2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。

10

【0088】

多重特異性結合タンパク質の第1の構成要素は、NK細胞、T細胞およびCD8⁺T細胞を含み得るがこれらに限定されない、NKG2D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、NKG2Dに結合すると、ULBP6およびMICAなどの天然リガンドがNKG2Dに結合することおよびNKG2D受容体を活性化することを阻止し得る。

20

【0089】

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、HER2発現細胞に結合する。

【0090】

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Fc受容体であるCD16を発現する細胞に結合する。

30

【0091】

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Fc(ヒンジ-CH2-CH3)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CH1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、NKG2D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、必要に応じて第2のCH1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、HER2に結合する抗原結合部位を形成する。第1のFcドメインおよび第2のFcドメインは一緒にCD16に結合することができる(図1)。一部の実施形態では、第1の免疫グロブリン軽鎖は、第2の免疫グロブリン軽鎖と同一であつてもよい。

40

【0092】

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

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、NKG2D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、NKG2D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。

20

【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T366W_{CH3A}）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/Y407V_{CH3B}）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 FcγammaRs, 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くことを示した。

30

【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。

40

【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、Sereno A、Huang F、Rick HLら、Generation of bispecific IgG 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 V H - C H 1 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。

【 0 0 9 8 】

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、 - Body 形態におけるものである。抗原 1 を標的とする F a b 1 はカッパ 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、 - Body の一形態の例示的な図であり、図 4 9 B は、別の - Body の例示的な図である。

【 0 0 9 9 】

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 Body 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 30 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, BJ. ら、 J. Biol. Chem. (2012年) 、 287巻 : 43331~9 頁)。

【 0 1 0 0 】

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 - Body 形態におけるものである。二重特異性 C o v X - Body 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ヤ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、抗体スキヤ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、または独特的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)。

【 0 1 0 1 】

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なっている。

【 0 1 0 2 】

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

10

20

30

40

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。

10

【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ことにより、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】

20

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	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 1)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQQNSYPI TFGGGTKVEIK (配列番号 2)

30

40

50

【表 1 - 2】

	CDR3 (配列番号 64) - ARARGPWSFDP	
ADI-27724	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 3)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IYGASSRATGPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPIT FGGGTKVEIK (配列番号 4)
ADI-27740 (A40)	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 5)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYHSFYT FGGGTKVEIK (配列番号 6)
ADI-27741	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 7)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQSNSYYT FGGGTKVEIK (配列番号 8)
ADI-27743	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 9)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYNSYPT FGGGTKVEIK (配列番号 10)
ADI-28153	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW GFDPWGQGTLTVSS (配列番号 11)	ELQMTQSPSSLASVGDRVTTITCR TSQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDSATYYCQQSYDIP YTFGQGTLKLEIK (配列番号 12)

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

ADI-28226 (C26)	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 13)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYGSFPIT FGGGTKVEIK (配列番号 14)
ADI-28154	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 15)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPDDFATYYCQQSKEVP WTFGQGTLTVSS (配列番号 16)
ADI-29399	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 17)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYNFPT FGGGTKVEIK (配列番号 18)
ADI-29401	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 19)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYDIYPT FGGGTKVEIK (配列番号 20)
ADI-29403	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 21)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYDSYPT FGGGTKVEIK (配列番号 22)
ADI-29405	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

	FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 23)	LTISSLQPDDFATYYCQQYGSFPT FGGGTKVEIK (配列番号 24)	
ADI-29407	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 25)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYQSFPT FGGGTKVEIK (配列番号 26)	10
ADI-29419	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 27)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYSSFST FGGGTKVEIK (配列番号 28)	20
ADI-29421	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 29)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYESYST FGGGTKVEIK (配列番号 30)	20
ADI-29424	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 31)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYDSFITF GGGTKEIK (配列番号 32)	30
ADI-29425	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 33)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPDDFATYYCQQYQSYPT FGGGTKVEIK (配列番号 34)	40

【表 1 - 5】

ADI-29426	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 35)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYHSFPT FGGGTKVEIK (配列番号 36)
ADI-29429	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 37)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSIGSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYELYSY TFGGGTKEIK (配列番号 38)
ADI-29447 (F47)	QVQLQQWGAGLLKPSETSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 39)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAQYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCQQYDTFIT FGGGTKVEIK (配列番号 40)
ADI-27727	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKAS GGTFSSYAIISWVRQAPGQGLEWMGG IIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARGDSSI RHAYYYYYGMDVVGQGTTTVSS (配列番号 41)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSVLVYSSNNKNYLAQYQQKP GQPKLLIYWASTRESGVPDFRSG SGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QQYYSTPITFGGGTKVEIK (配列番号 42)
	CDR1 (配列番号 65) – GTFSSYAIIS	CDR1 (配列番号 68) – KSSQSVLVYSSNNKNYLA
	CDR2 (配列番号 66) – GIPIFGTANYAQKFQG	CDR2 (配列番号 69) – WASTRES
	CDR3 (配列番号 67) – ARGDSSIRHAYYYYYGMDV	CDR3 (配列番号 70) – QQYYSTPIT
ADI-29443 (F43)	QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSG GSISSSYYWGWRQPPGKGLEWIGSI YYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQ	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA SQSVSRYLAQYQQKPGQAPRLLI YDASN RATGIPARFSGSGSGTDFT

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

	FSLKLSSVTAADTA VYYCARGSDRF HPYFDYW GQGTLTVSS (配列番号 43) CDR1 (配列番号 71) - GSISSSSYYWG CDR2 (配列番号 72) - SIYYSGSTYYNPSLKS CDR3 (配列番号 73) - ARGSDRFHPYFDY	LTISSLEPEDFAVYYCQQFDTWPP TFGGGKVEIK (配列番号 44) CDR1 (配列番号 74) - RASQSVSRYLA CDR2 (配列番号 75) - DASN RAT CDR3 (配列番号 76) - QQFDTWPPT	10
ADI-29404 (F04)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVY GGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEI DHSGSTNYNPSLKS RVTISV DTSKNQ FSLKLSSVTAADTA VYYCARARGPW SFDPWGQGTLTVSS (配列番号 89)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCR ASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPDDFATYYCEQYDSYPT FGGGKVEIK (配列番号 90)	
ADI-28200	QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKAS GGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGG IPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARRGRK ASGSFYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (配列番号 91)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCE SSQSLLN SGNQKNYL TWYQQKP GQPPKPLIYWA STRESGV PDR FSG SGSGTDFTLTISLQAEDVA VYYC QNDYSYPYTFGQGTKLEIK (配列番号 92)	20
ADI-29379 (E79)	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKAS GYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWM GHINPSGGSTS YAQKFQGRVTMTRDT STSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARG APNYGD TTHDYYMDVWGKGTTVT VSS (配列番号 94) CDR1 (配列番号 96) - YTFTSYYMH CDR2 (配列番号 97) - IIINPSGGSTS YAQKFQG CDR3 (配列番号 98) - ARGAPNYGD TTHDYYMDV	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCR ASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLL IYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFT LTISLQSEDFAVYYCQQYDDWP FTFGGGKVEIK (配列番号 95) CDR1 (配列番号 99) - RASQSVSSNL A CDR2 (配列番号 100) - GASTRAT CDR3 (配列番号 101) - QQYDDWPFT	30

40

50

【表 1 - 7】

ADI-27749 (A49)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSS ISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAP MGAAAGWFDPWGQGTLTVSS (配列番号 102)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTTITCR ASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQGVSF RTFGGGTKVEIK (配列番号 103)
	CDR1 (配列番号 104) - FTFSSYSMN	CDR1 (配列番号 107) -
	CDR2 (配列番号 105) -	RASQGISSWLA
	SISSSSSYIYYADSVKG	CDR2 (配列番号 108) - AASSLQS
	CDR3 (配列番号 106) -	CDR3 (配列番号 109) -
	ARGAPMGAAAGWFDP	QQGVSFPR

10

【0107】

代替的に、U S 9 , 2 7 3 , 1 3 6において説明されているように、配列番号 4 5 によって定義される重鎖可変ドメインを、配列番号 4 6 によって定義される軽鎖可変ドメインと対合させて、N K G 2 D 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】

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLGLDGTYFDYW
GQGTTTVSS (配列番号 45)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYDDLLPSG
VSDRFSGSKSGTS AFLAISGLQSEDEADYYCAA WDDSLNGPVFGGGTKLTVL (配列
番号 46)

30

【0108】

代替的に、U S 7 , 8 7 9 , 9 8 5において説明されているように、配列番号 4 7 によって定義される重鎖可変ドメインを、配列番号 4 8 によって定義される軽鎖可変ドメインと対合させて、N K G 2 D 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】

QVHLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSDDSISYYWSWIRQPPGKGLEWIGHISYSGSAN
YNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCANWDDAFNIWGQGTMVTVS
S (配列番号 47)

40

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPWTFQGQGTKVEIK (配列番号
48)

【0109】

表 2 は、組み合わせて H E R 2 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
トラスツズマブ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFNKDTYIHWVRQAPGKGLEWV ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS S (配列番号 49)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSRSQGTDFTL 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) - QQHYTTPPPT
ペルツズマブ	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFTDYTMWDWVRQAPGKGLEW VADVNPNSSGSIYNQRFKGRFTLS VDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVS SA (配列番号 57)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIY SASYRYTGVPSPRSQSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFG QG GTKVEIKR (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) - QQYYIYPYTFG
MGAH22 (US 8,802,093)	QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCTA SGFNKDTYIHWVKQRPEQGLEWI GRIYPTNGYTRYDPKFQDKATITAD TSSNTAYLQVSRLTSEDTAVYYCS	DIVMTQSHKFMSTSVDRLVSITCK ASQDVNTAVAWYQQKPGHSPKLL IYSASFRTGVPDRFTGSRSQGTDFT FTISSLVQAEDLAVYYCQQHYTTPP

【表 2 - 2】

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

10

20

30

40

50

【0110】

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 61 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】

MELAALCRWGLLALLPPGAASTQVCTGTDMLRRLPASPETHLDMLRHLYQGCQV
 VQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEYQGYVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNY
 ALAVLDNGDPLNNNTPVGASPGRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILW
 KDIFHKNNQLALTIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQLTRTVAGGCAR
 CKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFNHSICELHCPALVTYNTDTFESMP
 NPEGRYTGFASCVTACPYNYLSTDVGSCVLVCPLHNQEVTAEDEGQRCEKCSKPCA
 RVCYGLGMEHLREVRTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQL
 QVFETLEEITGYLYISAWPDSLPLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLR
 SLRELGSGLALIHHTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLACH
 QLCARGHCWGPGBTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNRHCLPCHPECQ
 PQNGSVTCFGPEADQCVA CAHYKDPPFCVARPSGVKPDL SYMPIWKFPDEEGACQ
 PCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIR
 KYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRLKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGWI
 PDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVT
 QLMPYGCLLDHVRENRRGLGSQDLLNWCQMIAKGMSTLEDVRLVHRDLAARNVL
 VKSPNVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVPIKWMALESILRRRFTHQSVDWSYG
 VTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPPCTIDVYMIMVKCWMIDSECRP
 RFRELVSEPSRMARDPQRFVVIQNEEDLGPA SPLDSTFYRSLL EDMMGDLVDAE EYL
 VPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGLEPSEEAPRSPLAPSEG
 GSDVFDGDLGMGAAKGLQLSPLTHDPSPLQRYSEDPTVPLPSETDGYVAPLTCSPQPE
 YVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPE
 YLTPQGGAAPQPHPPAFSPA FDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLG
 VPV (配列番号 61).

10

20

30

【0111】

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 卷 (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。

【0112】

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、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

【0113】

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 T 3 6 6 W 置換を組み込むことができ、他方のポリペプチドは、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、およびY 4 0 7 V 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來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、Q 3 4 7、Y 3 4 9、L 3 5 1、S 3 5 4、E 3 5 6、E 3 5 7、K 3 6 0、Q 3 6 2、S 3 6 4、T 3 6 6、L 3 6 8、K 3 7 0、N 3 9 0、K 3 9 2、T 3 9 4、D 3 9 9、S 4 0 0、D 4 0 1、F 4 0 5、Y 4 0 7、K 4 0 9、T 4 1 1 および/またはK 4 3 9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、Q 3 4 7 E、Q 3 4 7 R、Y 3 4 9 S、Y 3 4 9 K、Y 3 4 9 T、Y 3 4 9 D、Y 3 4 9 E、Y 3 4 9 C、T 3 5 0 V、L 3 5 1 K、L 3 5 1 D、L 3 5 1 Y、S 3 5 4 C、E 3 5 6 K、E 3 5 7 Q、E 3 5 7 L、E 3 5 7 W、K 3 6 0 E、K 3 6 0 W、Q 3 6 2 E、S 3 6 4 K、S 3 6 4 E、S 3 6 4 H、S 3 6 4 D、T 3 6 6 V、T 3 6 6 I、T 3 6 6 L、T 3 6 6 M、T 3 6 6 K、T 3 6 6 W、T 3 6 6 S、L 3 6 8 E、L 3 6 8 A、L 3 6 8 D、K 3 7 0 S、N 3 9 0 D、N 3 9 0 E、K 3 9 2 L、K 3 9 2 M、K 3 9 2 V、K 3 9 2 F、K 3 9 2 D、K 3 9 2 E、T 3 9 4 F、T 3 9 4 W、D 3 9 9 R、D 3 9 9 K、D 3 9 9 V、S 4 0 0 K、S 4 0 0 R、D 4 0 1 K、F 4 0 5 A、F 4 0 5 T、Y 4 0 7 A、Y 4 0 7 I、Y 4 0 7 V、K 4 0 9 F、K 4 0 9 W、K 4 0 9 D、T 4 1 1 D、T 4 1 1 E、K 4 3 9 D、およびK 4 3 9 E 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V 1 2 5、F 1 2 6、P 1 2 7、T 1 3 5、T 1 3 9、A 1 4 0、F 1 7 0、P 1 7 1、および/またはV 1 7 3 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E 1 2 3、F 1 1 6、S 1 7 6、V 1 6 3、S 1 7 4、および/またはT 1 6 4 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

【0117】

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

【0118】

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

【0119】

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, Y407I, Y407V	T366V, T366I, T366L, T366M, N390D, N390E, K392L, K392M, K392V, K392F K392D, K392E, K409F, K409W, T411D およびT411E

10

【0120】

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

【0121】

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】

30

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

【0122】

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】

40

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

【0123】

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S354Cを導入し、反対のポリペプチド鎖にY349C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。

【0124】

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の発現ベクターと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产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單一クローナンを単離することができる。10

【0126】

クローナンは、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。20

I I . 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、NKG2D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NKG2Dを発現する細胞に結合する。ある特定の実施形態では、NKG2D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、NKG2D結合ドメインおよびトラスツズマブ由来HER2結合ドメインを含む多重特異性結合タンパク質は、トラスツズ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。30

【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、NKG2Dに対するリガンドである、ULB P-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よりも効果的である。SC2.2は、HER2+がん細胞およびNK G2D+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、ビヒクリ对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。40

【0129】

ある特定の実施形態では、NKG2D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ズマブと比較して、HER2結合ドメインを有する本開示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、NKG2D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、TrinekET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、NKG2D結合ドメインおよび腫瘍関連抗原(CD20、BCMA、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IgG Fcに対して最も低い親和性を有し、FcRI(CD64)は、CD16の約1000倍強くIgG Fcに結合する高親和性FcRである。CD64は通常、骨髄系列などの多くの造血系列で発現し、これらの細胞型に由来する腫瘍、例えば急性骨髓性白血病(AML)で発現する場合がある。MDS-C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。

【0133】

一部の実施形態では、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、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CD8⁺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、NK細胞およびCD8⁺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。NK細胞の活性は、活性化受容体（NCR、NKG2D、CD16など）および阻害性受容体（KIR、NKG2A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、NK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NK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、NK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、MHC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CAR-T細胞はすべてFDA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CAR-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、TCR-MHC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（CRS）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、NK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、NK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NK細胞にもたらすようにデザインされている。

【0134】

一部の実施形態では、HER2に対する結合ドメインを含む、NKG2D結合ドメイン（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）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、NKG2D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 II I . 治療用途

【0135】

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、HER2を発現する種々のがんを処置するために使用され得る。

【0136】

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

10

20

30

40

50

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。

【0137】

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、急性骨髓性白血病、腺様囊胞癌（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、骨髓がん、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、慢性骨髓性白血病、明細胞癌、結合組織がん、囊胞腺腫、消化器系がん、十二指腸がん、内分泌系がん、卵黄囊腫瘍、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、ユーディング肉腫、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（hemangiblastoma）、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（intestinal epithelial 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、多発性骨髓腫、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、腫がん、疣状癌、VIP産生腫瘍、外陰部がん、高分化癌、またはウイルムス腫瘍である。

【0138】

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。

【0139】

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/ERBB

10

20

30

40

50

B1、IGF1R、HER3/ERBB3、HER4/ERBB4、MUC1、cMET、SLAMF7、PSCA、MICHA、MICB、TRAILR1、TRAILR2、MAGE-A3、B7.1、B7.2、CTLA4、およびPD1のうちの1つまたは複数を発現し得る。

I V . 併用療法

【0140】

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。

【0141】

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、マイトイシン、トレチノイン、リボムスチン、ゲムシタビン、ピンクリスチン、エトポシド、クラドリビン、ミトプロニトール、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、ネダプラチン、シタラビン、ビカルタミド、ビノレルビン、ベスナリノン、アミノグルテチミド、アムサクリン、プログルミド、酢酸エリプチニウム、ケタンセリン、ドキシフルリジン、エトトレチナート、イソトレチノイン、ストレプトゾシン、ニムスチン、ビンデシン、フルタミド、ドロゲニル、ブトシン、カルモフール、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、テガフール、イホスファミド、プレドニムスチン、ピシバニール、レバミゾール、テニポシド、インプロスルファン、エノシタビン、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、コロニー刺激因子-1、コロニー刺激因子-2、デニロイキンディフィトックス、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。

【0142】

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(CTLA4)、(ii)プログラム細胞死タンパク質1(PD1)、(iii)PDL1、(iv)LAG3、(v)B7-H3、(vi)B7-H4、および(vii)TIM3のうちの1つまたは複数を阻害する薬剤が含まれる。CTLA4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。

【0143】

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。

【0144】

抗がん剤のさらに他のカテゴリーには、例えば、(i)ALK阻害剤、ATR阻害剤、A2Aアンタゴニスト、塩基除去修復阻害剤、Bcr-Ab1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、CDC7阻害剤、CHK1阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、DNA-PK阻害剤、DNA-PKおよびmTORの両方の阻害剤、DNMT1阻害剤、DNMT1阻害剤+2-クロロ-デオキシアデノシン、HDAC阻害剤、ヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤、IDO阻害剤、JAK阻害剤、mTOR阻害剤、MEK阻害剤、MELK阻害剤、MTH1阻害剤、PARP阻害剤、ホスホイノシド3-キナーゼ阻害剤、PARP1およびDHODHの両方の阻害剤、プロテアソーム阻害剤、トポイソメラーゼ-I阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、VEGFR阻害剤、ならびにWEE1阻害剤から選択される阻害剤；(ii)OX40、CD137、CD40、GITR、CD27、HVEM、TNFRSF25、またはICOSのアゴニスト；な

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～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 】

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まで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される。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。

40

【 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pH4.8～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1.3mg/mlのクエン酸(例えば、1.305mg/ml)、約0.3mg/mlのクエン酸ナトリウム(例えば、0.305mg/ml)、約1.5mg/mlのリン酸二ナトリウム二水和物(例えば、1.53mg/ml)、約0.9mg/mlのリン酸二水素ナトリウム二水和物(例えば、0.86)、および約6.2mg/mlの塩化ナトリウム(例えば、6.165mg/ml)を含む。ある特定の実施形態では、緩衝系は、1～1.5mg/mlのクエン酸、0.25～0.5mg/mlのクエン酸ナトリウム、1.25～1.75mg/mlのリン酸二ナトリウム二水和物、0.7～1.1mg/mlのリン酸二水素ナトリウム二水和物、および6.0～6.4mg/mlの塩化ナトリウムを含む。ある特定の実施形態では、製剤のpHは水酸化ナトリウムを用いて調整される。

20

【0154】

トニシファイナー(tonifier)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20mg/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7.5～15mg/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10～14mg/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12mg/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

【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)またはポロクサマー(例えば、ポロクサマー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)ソルビ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

40

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、U S P / P h E u r 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、U S P およびP h E u r 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し得る量以下の量で添加され得る。ある特定の実施形態では、糖は、二糖、例えば、スクロースであり得る。ある特定の実施形態では、液体製剤はまた、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アントである。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(SWF I)、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ます。

【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、グリシネット、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ます。

【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ができる。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、增量剤、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、グリシネット、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、「增量剤」を添加することができる。「增量剤」は、凍結乾

50

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。例示的な增量剤には、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增量剤を含有し得る。

【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ます。

【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（S W F I）、注射用静菌水（B W F 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。

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、U S P（S W F I）または0.9%の塩化ナトリウム注射液、U S P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4.5mL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、50～5000mg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態が含まれ得る。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、ならびにこれらの投薬量が、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

【0179】

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

40

50

、約0.1μg～約1μg/kg体重、約1μg～約100mg/kg体重、約1μg～約50mg/kg体重、約1μg～約10mg/kg体重、約1μg～約1mg/kg体重、約1μg～約100μg/kg体重、約100μg～約1000μg/kg体重、約1μg～約50μg/kg体重、約1μg～約10μg/kg体重、約10μg～約100μg/kg体重、約10μg～約1000μg/kg体重、約10μg～約500μg/kg体重、約50μg～約1000μg/kg体重、約500μg～約500mg/kg体重、約500μg～約100mg/kg体重、約500μg～約10000μg/kg体重、約10000μg～約100000μg/kg体重、約10000μg～約50000μg/kg体重、約50000μg～約100000μg/kg体重、約100000μg～約1000000μg/kg体重、約1000000μg～約10000000μg/kg体重、約10000000μg～約100000000μg/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パ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(TM-B)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ニング、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クローニングM1-6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。クローニング毎に親和性は異なったが、すべてのクローニングによって產生されたNKG2D結合ドメインが、ヒト、マウス、およ

10

20

30

40

50

びカニクイザルの組換えNKG2D-Fcタンパク質のすべてで結合を示した。概して、各抗NKG2Dクローニは、ヒト(図3)およびカニクイザル(図4)の組換えNKG2D-Fcに同様の親和性で結合したが、マウス(図5)の組換えNKG2D-Fcに対する親和性は比較的低かった。

NKG2D結合ドメインはNKG2Dを発現する細胞に結合する

【0185】

EL4マウスリンパ腫細胞株を、ヒトまたはマウスのNKG2D-CD3ゼータシグナル伝達ドメインキメラ抗原受容体を発現するように工学操作した。NKG2D結合クローニ、アイソタイプ対照または陽性対照を100nM濃度にて使用して、EL4細胞において発現した細胞外NKG2Dを染色した。フルオロフォアコンジュゲート抗ヒトIgG二次抗体を使用して抗体結合を検出した。細胞をフローサイトメトリーによって分析し、親EL4細胞と比較したNKG2D発現細胞の平均蛍光強度(MFI)を使用してバックグラウンドに対する倍率(FOB)を計算した。

10

【0186】

すべてのクローニによって産生されたNKG2D結合ドメインが、ヒトおよびマウスのNKG2Dを発現するEL4細胞に結合した。陽性対照抗体(配列番号45~48、またはeBioscienceにて入手可能な抗マウスNKG2DクローニMI-6およびCX-5から選択される)が最も良好なFOB結合シグナルをもたらした。各クローニのNKG2D結合親和性は、ヒトNKG2Dを発現する細胞(図6)とマウスNKG2Dを発現する細胞(図7)との間で同様であった。

20

(実施例2)

NKG2D結合ドメインはNKG2Dへの天然リガンドの結合を阻止する

ULBP-6との競合

【0187】

組換えヒトNKG2D-Fcタンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異的結合を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ULBP-6-His-ビオチンをウェルに添加し、続いてNKG2D結合ドメインクローニを添加した。2時間のインキュベーション後、ウェルを洗浄し、NKG2D-Fcでコーティングされたウェルに結合したままであったULBP-6-His-ビオチンを、西洋ワサビペルオキシダーゼおよびTMB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450nMにて測定し、540nMにて補正した。バックグラウンドを差し引いた後、NKG2D-Fcタンパク質へのNKG2D結合ドメインの特異的結合を、ウェル中のNKG2D-Fcタンパク質への結合を阻止されたULBP-6-His-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NKG2D結合ドメインは、NKG2DへのULBP-6結合を阻止したが、アイソタイプ対照はULBP-6との競合をほとんど示さなかった(図8)。

30

MICAとの競合

【0188】

組換えヒトMICA-Fcタンパク質をマイクロプレートのウェルに吸着させ、非特異的結合を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。NKG2D-Fc-ビオチンをウェルに添加し、続いてNKG2D結合ドメインを添加した。インキュベーションおよび洗浄後、MICA-Fcでコーティングされたウェルに結合したままであったNKG2D-Fc-ビオチンを、ストレプトアビジン-HRPおよびTMB基質を使用して検出した。吸光度を450nMにて測定し、540nMにて補正した。バックグラウンドを差し引いた後、NKG2D-Fcタンパク質へのNKG2D結合ドメインの特異的結合を、MICA-Fcでコーティングされたウェルへの結合を阻止されたNKG2D-Fc-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NKG2D結合ドメインはNKG2DへのMICA結合を阻止したが、アイソタイプ対照はMICAとの競合をほとんど示さなかった(図9)。

40

Rae-1デルタとの競合

50

【0189】

組換えマウスRae-1デルタ-Fc (R&D Systems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NKG2D-Fc-ビオチンをウェルに添加し、続いてNKG2D結合ドメインを添加した。インキュベーションおよび洗浄後、Rae-1デルタ-Fcでコーティングされたウェルに結合したままであったNKG2D-Fc-ビオチンを、ストレプトアビシン-HRPおよびTMB基質を使用して検出した。吸光度を450nmにて測定し、540nmにて補正した。バックグラウンドを差し引いた後、NKG2D-Fcタンパク質へのNKG2D結合ドメインの特異的結合を、Rae-1デルタ-Fcでコーティングされたウェルへの結合を阻止されたNKG2D-Fc-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、またはeBioscienceにて入手可能な抗マウスNKG2DクローニーM1-6およびCX-5から選択される)および種々のNKG2D-結合ドメインクローニーはマウスNKG2DへのRae-1デルタ結合を阻止したが、アイソタイプ対照抗体はRae-1デルタとの競合をほとんど示さなかった(図10)。

(実施例3)

NKG2D結合ドメインクローニーはNKG2Dを活性化させる

【0190】

CD3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NKG2Dの核酸配列を融合させて、キメラ抗原受容体(CAR)構築物を得た。次に、ギブソンアセンブリを使用してNKG2D-CAR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exp293細胞にトランスフェクトした。8μg/mlのポリブレンと共にNKG2D-CARを含有するウイルスにEL4細胞を感染させた。感染の24時間後、EL4細胞中のNKG2D-CAR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NKG2D-CARを発現するクローニーを選択した。

【0191】

NKG2D結合ドメインがNKG2D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NKG2D-CAR EL4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。NKG2D活性化の指標である細胞内TNF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TNF陽性細胞のパーセンテージを正規化した。すべてのNKG2D結合ドメインがヒトNKG2D(図11)およびマウスNKG2D(図12)の両方を活性化させた。

(実施例4)

NKG2D結合ドメインはNK細胞を活性化させる

初代ヒトNK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(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、NKG2D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、ブレフェルジン-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。NKG2D結合ドメインおよび陽性対照(配列番号4

10

20

30

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PBM C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、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チョン技術を使用し、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、NKG2D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、ブレフェルジン-A、およびモネンシンを含有する培地中で培養した。NKG2D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。NKG2D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NKG2DクローニングM1-6 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)

NKG2D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、NKG2D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NKG2D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(NKG2D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BATA試薬で標識化し、10⁵/mLにて培養培地中に再懸濁した。次に、標識化したTHP-1細胞をNKG2D抗体と合わせ、マイクロターブプレートのウェル中で37 °C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、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。

【0195】

NKG2D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。NKG2D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

N K G 2 D 抗体は高い熱安定性を示す

【 0 1 9 6 】

N K G 2 D 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 I g G 1 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N K 細胞を活性化させる能力の増強を示す

【 0 1 9 7 】

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 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、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 C D 1 0 7 a 抗体、ブレフェルジン - A、およびモネンシンを含有する培地中で培養した。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、より良好な N K 細胞の活性化を示す。 A L 2 . 2 は、H E R 2 結合ドメイン(トラスツズマブ)、N K G 2 D 結合ドメイン(U L B P - 6)およびヒト I g G 1 F c 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 U L B P - 6 - F c ホモ二量体から開始する、制御された F a b アーム交換反応(c F A E)によって作製した(La brijnら、Nature Protocols 9巻、2 4 5 0 ~ 2 4 6 3 頁を参照されたい)。 S C 2 . 2 は、トラスツズマブに由来する s c F v 、および U L B P - 6 (配列番号 9 3)を含む一本鎖タンパク質である。

【 化 4 】

配列番号 93

MAAAAIPALLCLPLLFLLFGWSRARRDDPHSLCYDITVIPKFRPGPRWCAVQGQVD
EKTFLHYDCGNKTVTVPVSPLGKKLNVTMAWKAQNPVLREVVDILTEQLLDIQLENY
TPKEPLTLQARMSCEQKAEGHSSGSWQFSIDGQTFLFDSEKRMWTTVHPGARKMK
EKWENDKDVAAMSFYISMGDCIGWLEDFLMGMDSTLEPSAGAPLAMSSGTTQLRA
TATTLILCCLLIILPCFILPGI

【 0 1 9 8 】

C D 1 0 7 a および I F N 染色の分析により、アイソタイプ对照 I g G は N K 細胞の活性化を示さなかつたが、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 N K 細胞が C D 1 0 7 a⁺ および I F N⁺ になることが示され、ただ1つ(N K G 2 D)よりもむしろ2つの活性化受容体(N K G 2 D および C D 1 6)の会合による、より強力な N K 細胞の活性化が示された(図19)。 N K 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 N K 細胞傷害性アッセイ

【 0 1 9 9 】

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 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、 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一晩培養し、その

10

20

30

40

50

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BATA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、 $20 \mu\text{l}$ の培養上清を取り出し、 $200 \mu\text{l}$ のユーロピウム溶液と混合し、暗所で15分間振盪しながらインキュベートした。時間分解蛍光モジュール(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。AL0.2は、HER2結合ドメイン(トラスツズマブ)、NKG2D結合ドメイン(配列番号1~44から選択される)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抗NKG2D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。AL0.2si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)、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。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)。AL0.2si(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、 $70 \mu\text{m}$ 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、0.01mM EDTA)に再懸濁して赤血球を除去した。残りの細胞を $100 \text{ng} / \text{mL}$ 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、 $100 \text{ng} / \text{mL}$ 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dTomo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-dTomo、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での一晩のインキュベーション後、RMA-HER2-dTomoおよびRMA-zSGreen細胞のパーセンテージを、蛍光レポ

10

20

30

40

50

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 - ((処置群における R M A - C a 2 T - d T o m a t o 細胞の % * 対照群における R M A - z s G r e e n 細胞の %) / (対照群における R M A - C a 2 T - d T o m a t o 細胞の % * 処置群における R M A - z s G r e e n 細胞の %))) * 1 0 0 %。

【 0 2 0 2 】

A L 2 . 2 は、 S C 2 . 2 (図 2 5) およびトラスツズマブ (図 2 4) よりも腫瘍標的に対する N K 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、 N K 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、 N K 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 N K 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 N K G 2 D に結合する

【 0 2 0 3 】

図 1 に示すように、 N K G 2 D 結合ドメイン、 H E R 2 結合ドメインおよび C D 1 6 に結合する F c ドメインを各々含有するヒト N K G 2 D 三重特異性結合タンパク質 (T r i N K E T) を発現するように、 E L 4 マウスリンパ腫細胞株を工学操作し、 E L 4 細胞において発現した細胞外 N K G 2 D に対するそれらの親和性について試験した。 N K G 2 D 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 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、親 E L 4 細胞と比較した N K 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。
20

【 0 2 0 4 】

試験した T r i N K E T は、 H E R 2 - T r i N K E T - C 2 6 (A D I - 2 8 2 2 6 および H E R 2 結合ドメイン) および H E R 2 - T r i N K E T - F 0 4 (A D I - 2 9 4 0 4 および H E R 2 結合ドメイン) を含む。試験した分子で使用した H E R 2 結合ドメインは、トラスツズ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。

【 0 2 0 5 】

データは、本開示の H E R 2 標的化 T r i N K E T が N K G 2 D に結合することを示している (図 2 6) 。
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

H E R 2 に結合する三重特異性結合タンパク質

【 0 2 0 6 】

H E R 2 を発現するヒトがん細胞株を使用して、 T r i N K E T を腫瘍関連抗原へと標的化する H E R 2 の結合をアッセイした。腎細胞癌細胞株 7 8 6 - O は低レベルの H E R 2 を発現する。 T r i N K E T および必要に応じて親抗 H E R 2 モノクローナル抗体 (トラスツズマブ) 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 I g G 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 (F O B) を、二次抗体対照に対して正規化した T r i N K E T およびトラスツズマブからの平均蛍光強度 (M F I) を使用して計算した。 H E R 2 - T r i N K E T - C 2 6 、および H E R 2 - T r i N K E T - F 0 4 は、トラスツズマブと比較して 7 8 6 - O 細胞において発現した H E R 2 への結合の同等のレベルを示す (図 2 7 A) 。
40

【 0 2 0 7 】

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 による細胞発現ヒト H E R 2 への結合を試験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、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、細胞発現 H E R 2 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TrinKETの結合プロファイルを示す(HER2結合部位を有するC26.2 TrinKET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 TrinKETの結合プロファイルを図27Cに示す)。両方のTrinKET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(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>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を含有する培地中に培養したか、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、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TrinKET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/TrinKETと混合し、IL-2の存在下でNK細胞を活性化させた。ブレフェルジン-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CD107a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、CD3、CD56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FACS分析のために試料を調製した。CD107aおよびIFN染色をCD3⁻CD56⁺細胞において分析してNK細胞活性化を評価した。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】

TrinKETは、CD107a脱顆粒およびIFN産生の増加によって示されるように、HER2を発現する、SKBr-3細胞(図28A)、Colo201細胞(図28B)、およびHCC1954細胞(図28C)のそれぞれと共に培養したヒトNK細胞の活性化を媒介する。SKBr-3細胞およびHCC1954細胞は高レベルの表面HER2を発現し、Colo201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、TrinKET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+SKBr-3細胞を陰性対照として使用する。

【0211】

TrinKET(C26-TrinKET-HER2およびF04-TrinKET-HER2)は、CD33発現ヒトAML Mv4-11細胞と共に培養したヒトNK細胞の活性化を媒介し、CD107a脱顆粒およびIFN産生の増加を示した。モノクローナル抗CD33抗体と比較して、TrinKET(C26-TrinKET-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TrinKET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(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(CD

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 $100\text{ng}/\text{mL}$ 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】

TriNKE 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cytotoxicity 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、 $1 \sim 2 \times 10^5/\text{mL}$ 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 $10^5 \sim 2.0 \times 10^6/\text{mL}$ にて再懸濁した。96ウェルプレートの各ウェルにおいて、 $50\mu\text{l}$ 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TriNKE Tを有するか、または有さない $50\mu\text{l}$ 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、 $10\times$ 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】

TriNKE 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TriNKE Tの能力をアッセイした。図29Aおよび図29Bの点線は、TriNKE 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TriNKE T（例えば、CD26-TriNKE TおよびF04-TriNKE 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 $100\text{ng}/\text{mL}$ のhIL-2（Peptech #200-02）を含有する培地中で48時間増殖させた。抗体を、 $100\mu\text{l}$ の滅菌PBS中で $2\mu\text{g}/\text{mL}$ （抗CD16、Biolegend #302013）および $5\mu\text{g}/\text{mL}$ （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、 $100\text{ng}/\text{mL}$ のhIL-2および $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 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

10

20

30

40

50

F A、 Bi o l e g e n d # 4 2 0 6 0 1) およびモネンシン (Bi 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 °C にて 4 時間にわたって 5 % C O₂ においてインキュベートした。 I F N - 的細胞内染色のために、 N K 細胞を、 抗 C D 3 (Bi o l e g e n d # 3 0 0 4 5 2) および抗 C D 5 6 m A b (Bi 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 (Bi o l e g e n d # 5 0 6 5 0 7) で標識化した。 N K 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 - 的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 - 的産生レベル (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 - 的産生を分析した。 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 - 的レベルを示し、 図 3 0 C は C D 1 0 7 a および I F N - 的レベルを示す。 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 - 的産生を分析した (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 μg / 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ニングに由来する 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 μg / 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。 Bang s Lab 製の Quantum Simplex Cellular 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QuickCatalyst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。

TriNKE 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 $2 \times 10^6 / ml$ 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TriNKE 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、 $2 \times 10^6 / ml$ 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。ブレフェルジン-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、 $50 \mu l$ の腫瘍標的、mAb/TriNKE T、BFA/モネンシン、およびNK細胞を $200 \mu l$ 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。

Cytotoxicity 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cytotoxicity Tox 96 非放射性細胞傷害性アッセイを使用して、TriNKE 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。 $50 \mu l$ 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するモノクローナル抗体またはTriNKE Tを培養培地中で希釈し、 $50 \mu l$ の希釈したmAbまたはTriNKE 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 $10^5 \sim 2 \cdot 0 \times 10^6 / ml$ にて再懸濁した。 $50 \mu l$ のNK細胞をプレートの各ウェルに添加して合計 $150 \mu l$ 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、 $10 \times$ 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%。

DELFI A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、BATA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ナウトした。 $100\mu l$ 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。 $100\mu l$ のBATA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Trition-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TriNKE Tを培養培地で希釈し、 $50\mu l$ の希釈したmAbまたはTriNKE 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。 $50\mu l$ のNK細胞をプレートの各ウェルに添加して合計 $200\mu l$ 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%CO₂で2~3時間にわたってインキュベートした。

【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。 $20\mu l$ 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、 $200\mu l$ 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、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%。

長期のヒトPBM C細胞傷害性アッセイ：

【0230】

SkB r - 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TriNKE Tを培養培地中で希釈した。 $50\mu l$ のmAbまたはTriNKE T、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。 $50\mu l$ の完全培養培地を合計 $200\mu l$ の培養体積で添加した。

【0231】

画像収集をIncubate 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

10

20

30

40

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 TruNKE T と SC2.2との比較

【0232】

HER2を標的とする TruNKE T 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 TruNKE T 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 1000 g 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°C 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。

10

20

30

40

50

【0237】

【表10】

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TrinKEtによって活性化される

【0238】

20

図28A～28Cは、TrinKEt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- 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TrinKEt(HER2-TrinKEt-C26およびHER2-TrinKEt-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。

【0239】

図28Aは、ヒトNK細胞が、SkBr-3細胞と培養された場合、TrinKEt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、TrinKEt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、TrinKEtによって活性化されることを示す。

30

TrinKEt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

【0240】

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TrinKEt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來した。トラスツズマブと比較して、TrinKEt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NKGD2D-結合ドメインを有する2つのTrinKEt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

TrinKEt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

【0241】

低いHER2表面発現を有する標的細胞に対するTrinKEtの効果を調査した。図29A～29Bは、TrinKEt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29A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29B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

【0242】

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

【0243】

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。

【0244】

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、急性骨髓性白血病 (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

【0245】

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

【0246】

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）およびオントーゲット・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内で 10^6 / m L に調整した。1m L 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 $10\text{ }\mu\text{g}$ / m L にてP B M C 培養物に添加した。細胞を37°Cにて5% CO₂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。

【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、自己骨髓性細胞が、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。

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。

（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

【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レ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 ng / m L 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

10

20

30

40

50

ATDA試薬(Perkin Elmer AD0116)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HBS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ンアウトした。 $100 \mu\text{l}$ 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Trition-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を培養培地中で希釈し、 $50 \mu\text{l}$ 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 $10^5 \sim 2.0 \times 10^6 / \text{mL}$ にて再懸濁した。 $50 \mu\text{l}$ のNK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%CO₂で2~3時間にわたってインキュベートした。

【0252】

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 200 g 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 250 rpm 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Spectra Max 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%。

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

【0253】

図35は、HER2陽性Colo-201細胞株に対するTrinKET、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NK細胞の細胞傷害活性を示す。HER2を標的とするTrinKET(ADI-29404(F04))は、休止ヒトNK細胞によるColo-201細胞の最大溶解を誘導した。D265A突然変異をTrinKETのCH2ドメインに導入してFcR結合を無効にした。HER2-TrinKET(ADI-29404(F04))-D265AはColo-201細胞の溶解を媒介することができず、NK細胞に対するCD16およびNKG2Dの二重標的化の重要性が示される。NK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HER2を標的とし、NK細胞によりADCCを媒介した。トラスツズマブ単独ではColo-201細胞のNK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TrinKETと比較して約4分の1だった。CD16およびNKG2Dが同じ分子を標的とするこの重要性を理解するために、TrinKET(ADI-29404(F04))活性を、トラスツズマブと組み合わせたHER2およびNKG2D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NK細胞によるColo-201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TrinKET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16)

架橋アッセイ

【0254】

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HER2およびNKG2Dへの同時結合を試験するために使用した。TrinKETを

10

20

30

40

50

表面HER2を染色するために $20\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ で使用した。次に、TruNKEETの結合をビオチン化組換えヒトNKG2D-Fcを使用して検出した。次に、結合NKG2D-Fcをストレプトアビシン-APC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、TruNKEET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TruNKEET-C26が、hNKG2D-Fc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TruNKEET-F04が、hNKG2D-Fc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) NKG2D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) CD16に結合するに十分な抗体Fcドメインもしくはその一部分、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NKG2Dに結合する、項目1に記載のタンパク質。

(項目3)

30

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。

(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43と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号44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45と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号46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47と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号48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94と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号95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102と少なくとも90%同一の重鎖可変ドメインと、配列番号103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のいずれかに記載のタンパク質。

10

(項目 1 5)

前記第1の抗原結合部位が、單一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)

前記單一ドメイン抗体が、V_H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。

20

(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。

30

(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49と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、前記第2の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号53と少なくとも90%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50のアミノ酸配列と同一の重鎖CDR1配列、配列番号51のアミノ酸配列と同一の重鎖CDR2配列、および配列番号52のアミノ酸配列と同一の重鎖CDR3配列を含むアミノ酸配列を含む、先行する項目のいずれかに記載のタンパク質。

40

(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54のアミノ酸配列と同一の軽鎖CDR1配列、配列番号55のアミノ酸配列と同一の軽鎖CDR2配列、および配列番号56のアミノ酸配列と同一の軽鎖CDR3配列を含むアミノ酸配列を含む、項目2.0に記載のタンパク質。

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57と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、前記第2の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号58と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、項目1から18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77のアミノ酸配列と同一の重鎖CDR1配列、
配列番号78のアミノ酸配列と同一の重鎖CDR2配列、および
配列番号79のアミノ酸配列と同一の重鎖CDR3配列

を含むアミノ酸配列を含む、項目1から18または22のいずれか一項に記載のタンパク質。

(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80のアミノ酸配列と同一の軽鎖CDR1配列、
配列番号81のアミノ酸配列と同一の軽鎖CDR2配列、および
配列番号82のアミノ酸配列と同一の軽鎖CDR3配列

を含むアミノ酸配列を含む、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59と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、前記第2の抗原結合部位の前記軽鎖可変ドメインが、配列番号60と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、項目1から18のいずれか一項に記載のタンパク質。

(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83のアミノ酸配列と同一の重鎖CDR1配列、
配列番号84のアミノ酸配列と同一の重鎖CDR2配列、および
配列番号85のアミノ酸配列と同一の重鎖CDR3配列

を含むアミノ酸配列を含む、項目1から18または25のいずれか一項に記載のタンパク質。

(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86のアミノ酸配列と同一の軽鎖CDR1配列、
配列番号87のアミノ酸配列と同一の軽鎖CDR2配列、および
配列番号88のアミノ酸配列と同一の軽鎖CDR3配列

を含むアミノ酸配列を含む、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、單一ドメイン抗体である、項目1から4または8から16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。

(項目 3.0)

前記タンパク質が、CD16に結合するに十分な抗体Fcドメインの一部分を含み、前記抗体Fcドメインが、ヒンジおよびCH2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Fcドメインが、ヒトIgG1抗体のヒンジおよびCH2ドメインを含む、項目3.0に記載のタンパク質。

(項目 3.2)

10

20

30

40

50

前記 Fc ドメインが、ヒト IgG1 抗体のアミノ酸 234～332 と少なくとも 90% 同一のアミノ酸配列を含む、項目 30 または 31 に記載のタンパク質。

(項目 33)

前記 Fc ドメインが、ヒト IgG1 の Fc 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、Y407、K409、T411、K439 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、項目 30 から 32 のいずれか一項に記載のタンパク質。

(項目 34)

10

先行する項目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。

(項目 35)

項目 1 から 33 のいずれか一項に記載のタンパク質を発現する 1 つまたは複数の核酸を含む細胞。

(項目 36)

項目 1 から 33 のいずれか一項に記載のタンパク質に腫瘍およびナチュラルキラー細胞を曝露することを含む、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。

(項目 37)

20

項目 1 から 33 のいずれか一項に記載のタンパク質または項目 34 に記載の製剤を患者に投与することを含む、がんを処置する方法。

(項目 38)

前記がんが、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からなる群から選択される、項目 37 に記載の方法。

【図面】

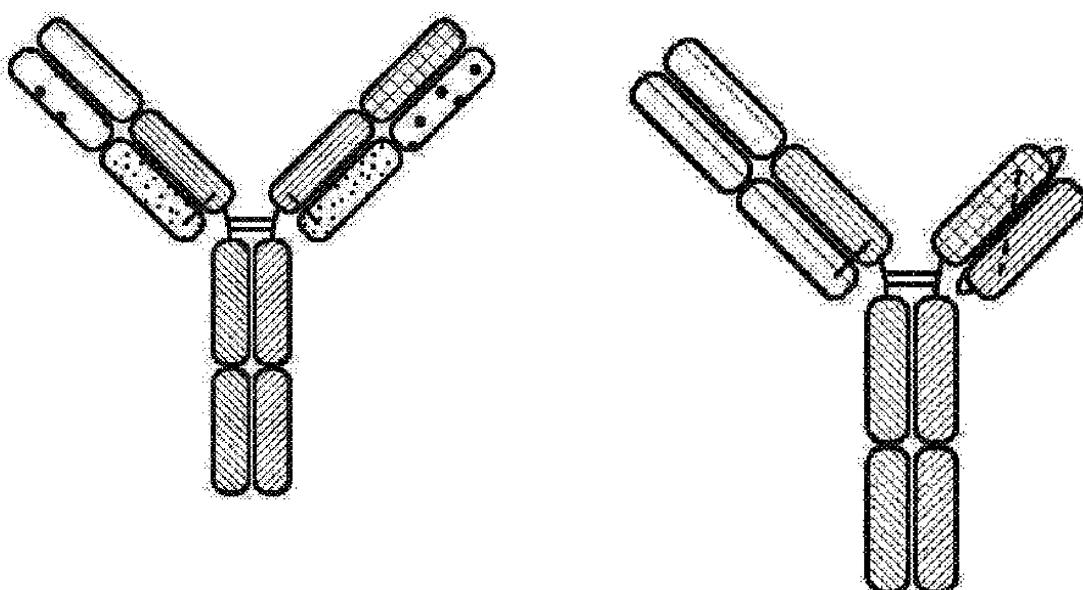
【図 1】

【図 2】

FIG. 1

FIG. 2

30

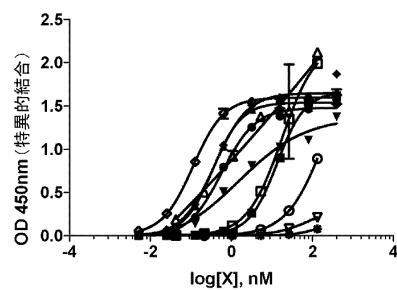


40

50

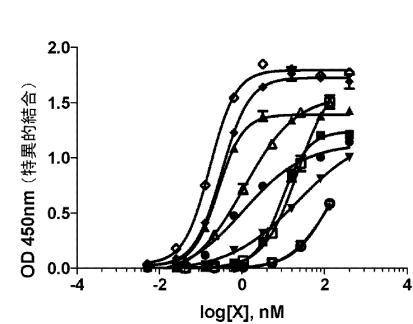
【図3】

FIG. 3



【図4】

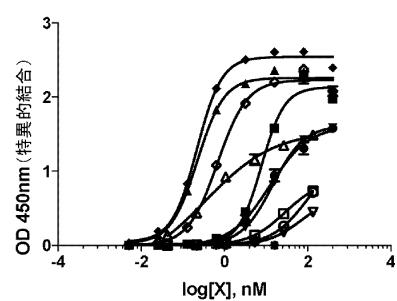
FIG. 4



10

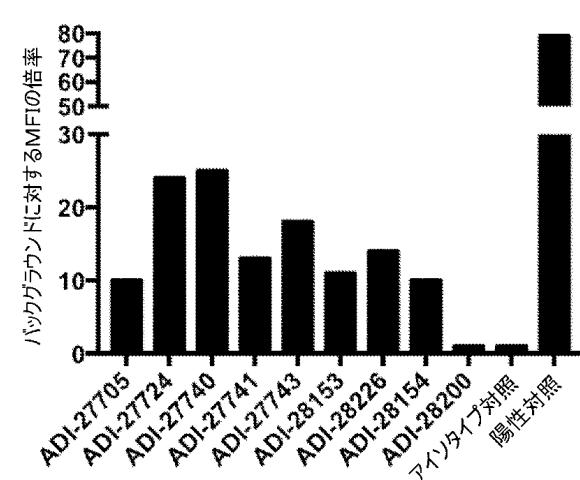
【図5】

FIG. 5



【図6】

FIG. 6



20

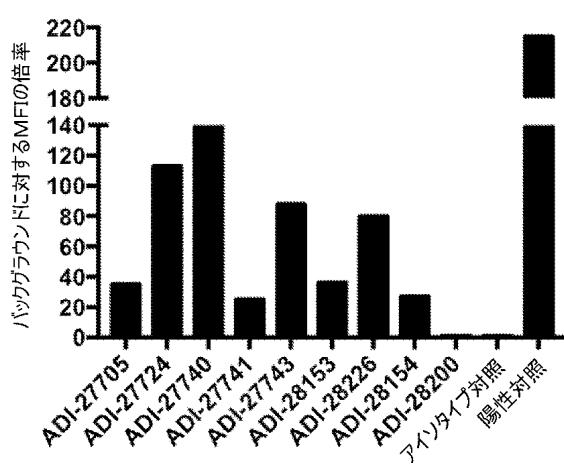
30

40

50

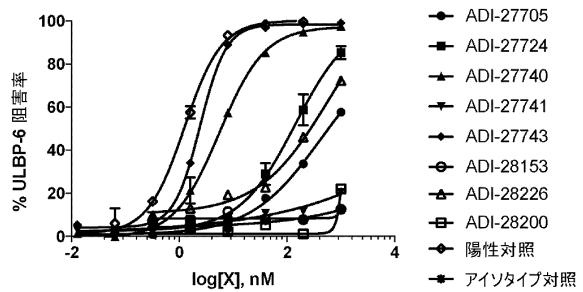
【図 7】

FIG. 7



【図 8】

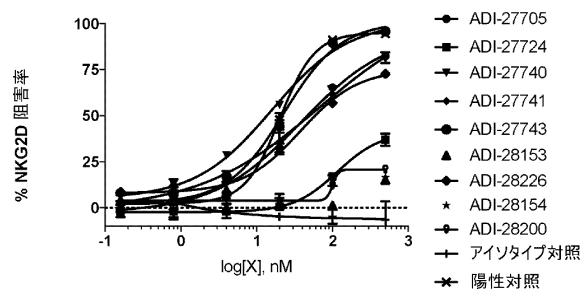
FIG. 8



10

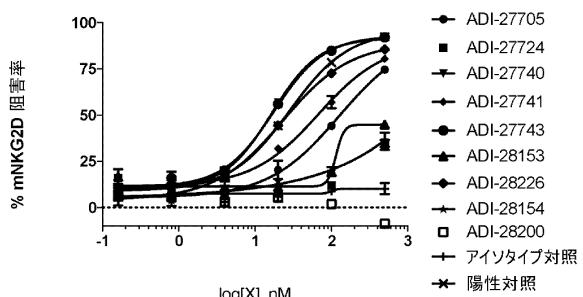
【図 9】

FIG. 9



【図 10】

FIG. 10



20

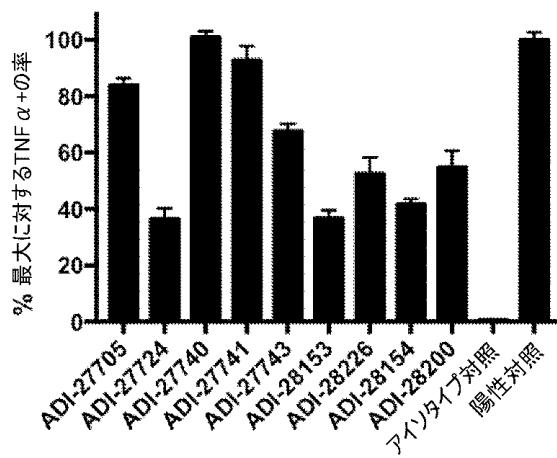
30

40

50

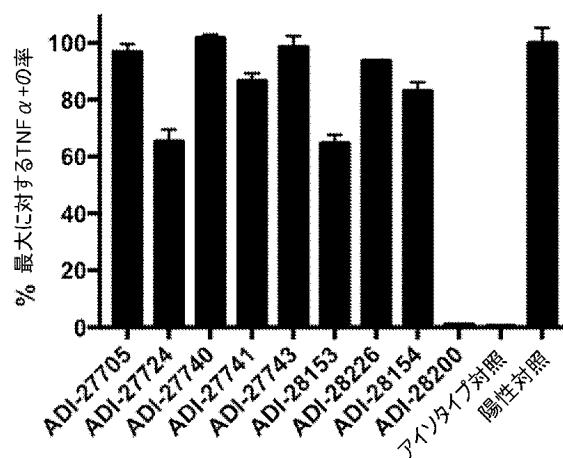
【図 1 1】

FIG. 11



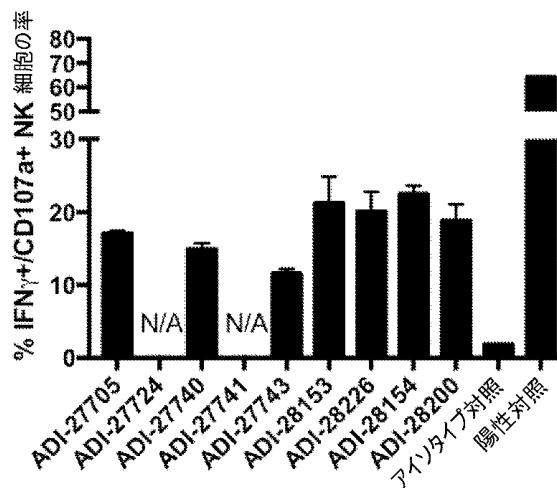
【図 1 2】

FIG. 12



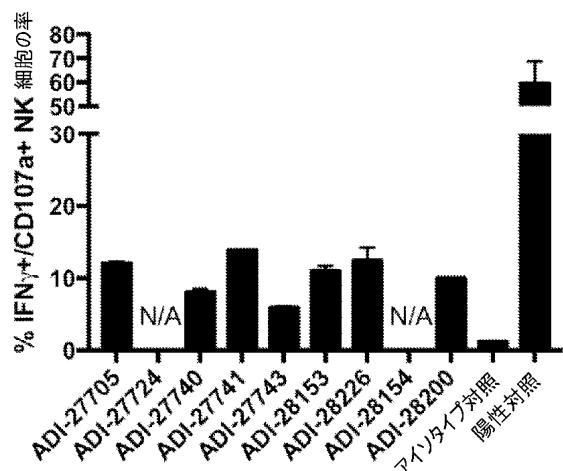
【図 1 3】

FIG. 13



【図 1 4】

FIG. 14



10

20

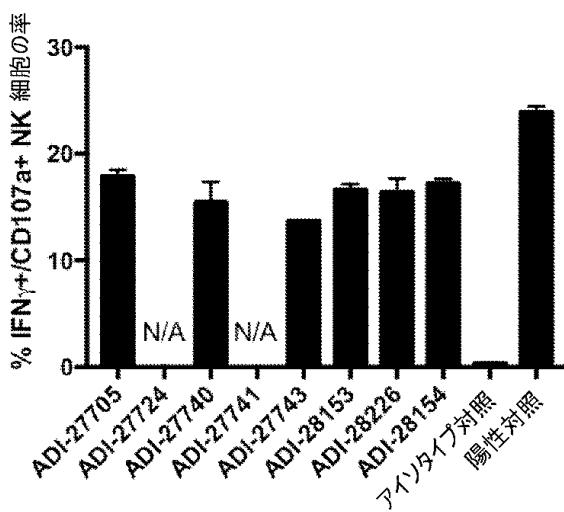
30

40

50

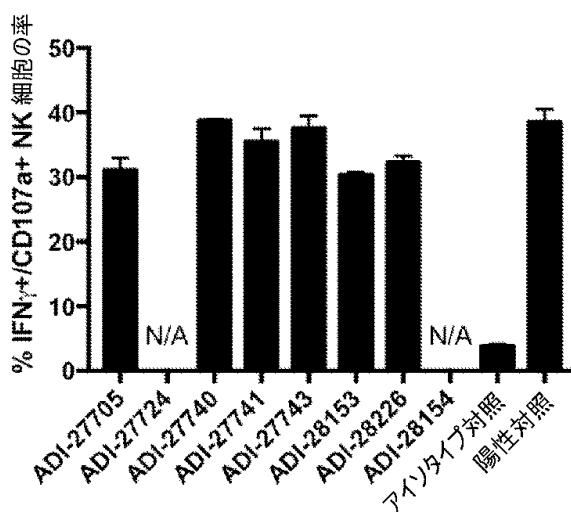
【図 15】

FIG. 15



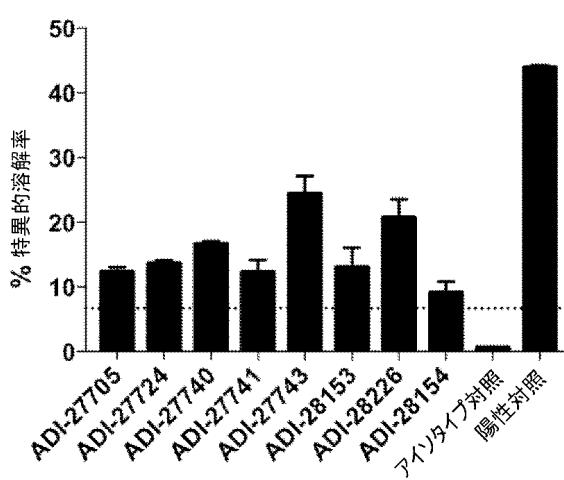
【図 16】

FIG. 16



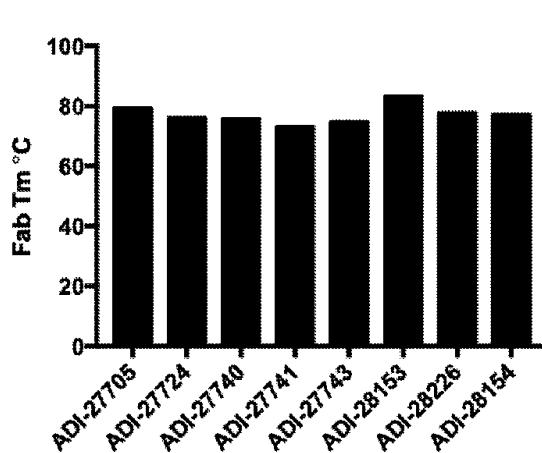
【図 17】

FIG. 17



【図 18】

FIG. 18



10

20

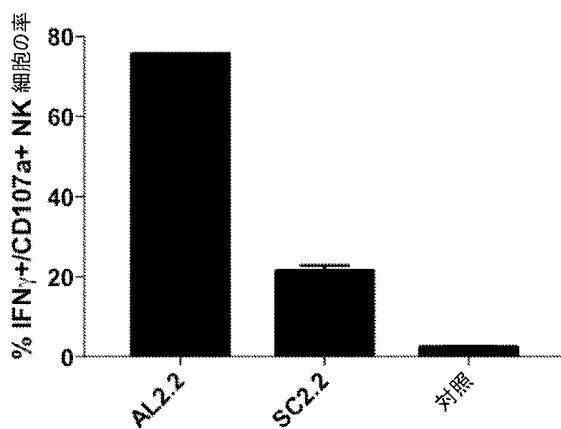
30

40

50

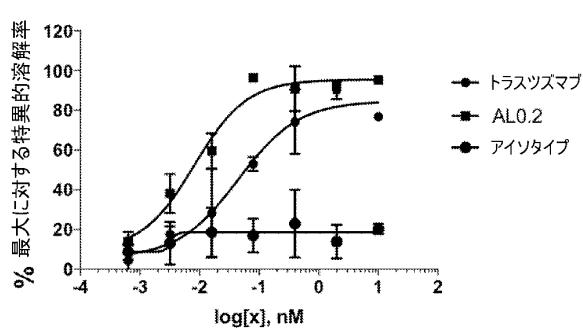
【図 19】

FIG. 19



【図 20】

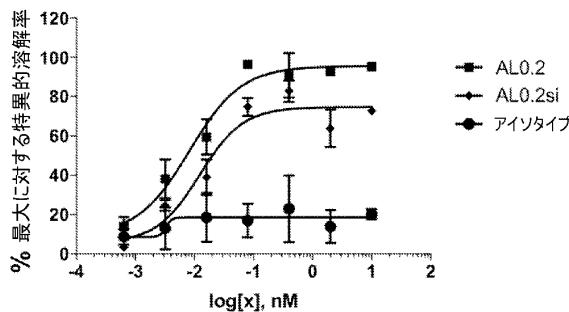
FIG. 20



10

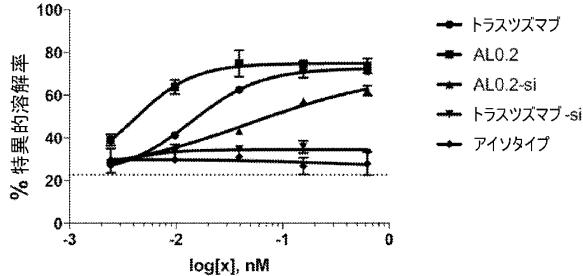
【図 21】

FIG. 21



【図 22】

FIG. 22



20

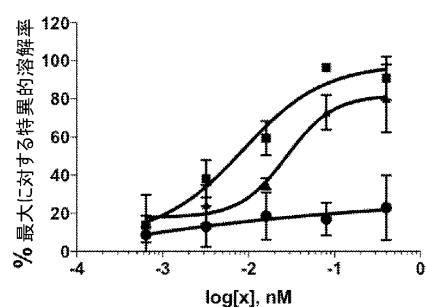
30

40

50

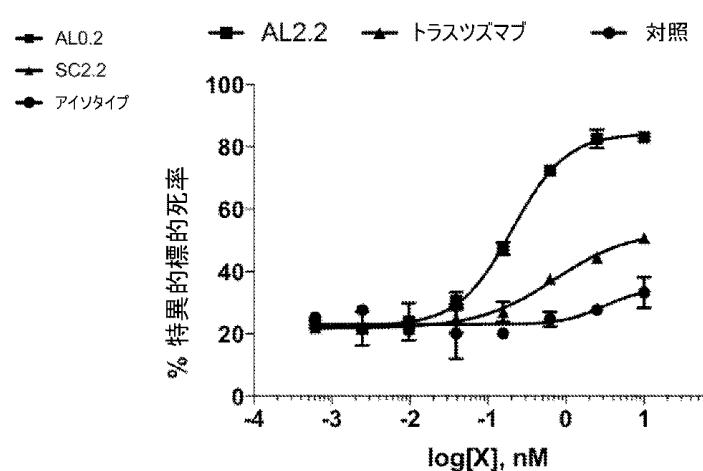
【図 2 3】

FIG. 23



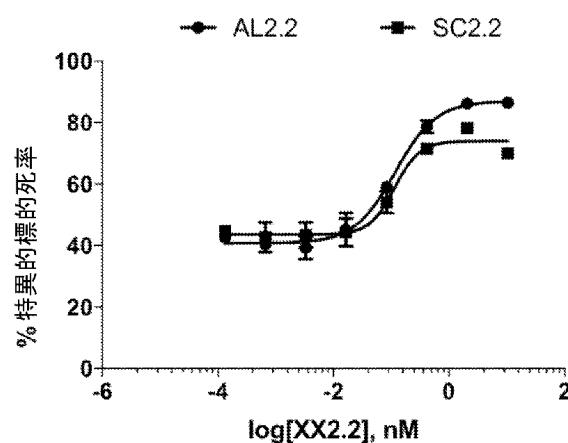
【図 2 4】

FIG. 24



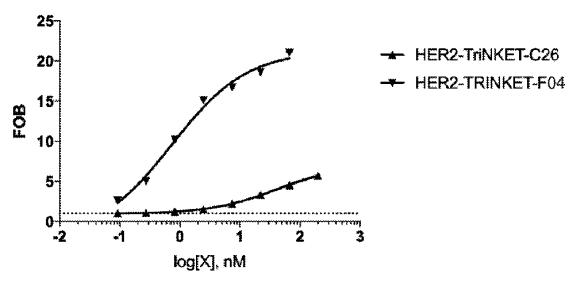
【図 2 5】

FIG. 25



【図 2 6】

FIG. 26



10

20

30

40

50

【図 27-1】

FIG. 27A

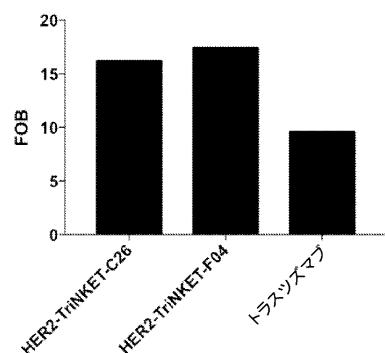
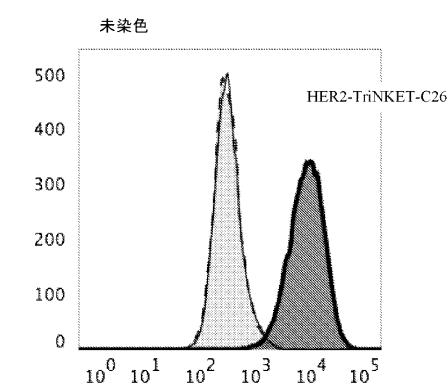
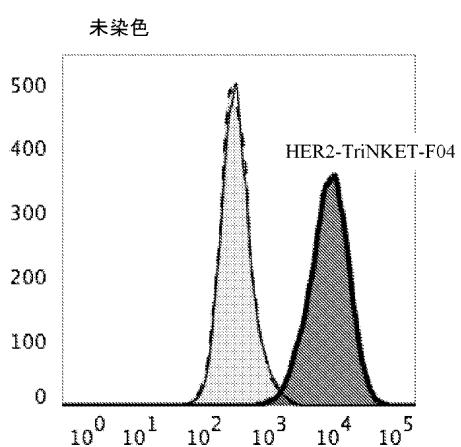


FIG. 27B



【図 27-2】

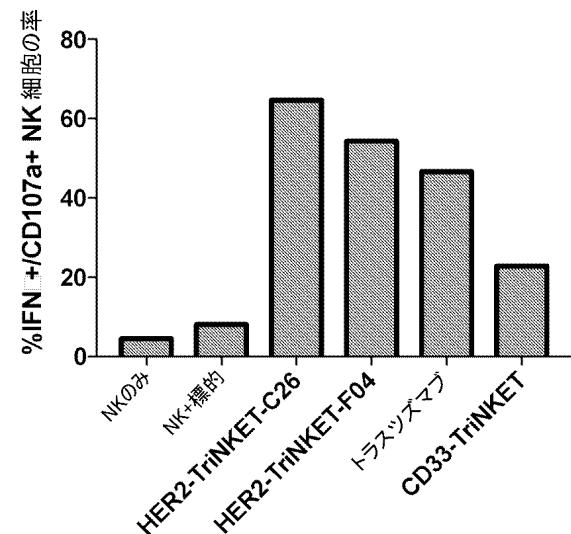
FIG. 27C



10

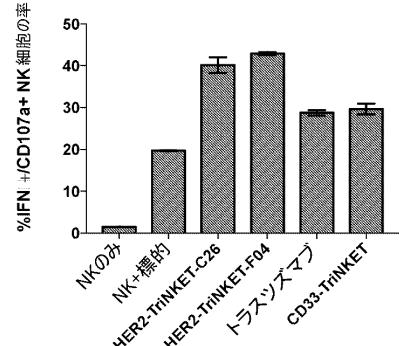
【図 28-1】

FIG. 28A



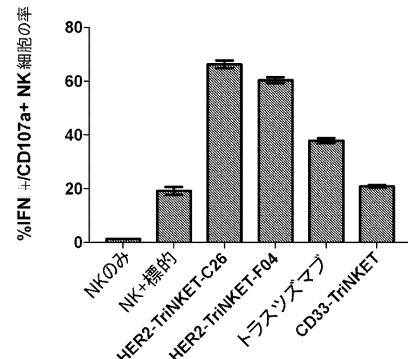
【図 28-2】

FIG. 28B



20

FIG. 28C



30

40

50

【図 29】

FIG. 29A

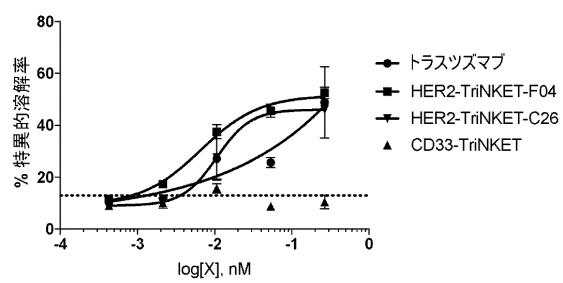
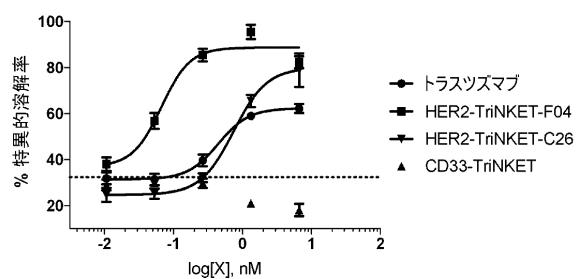
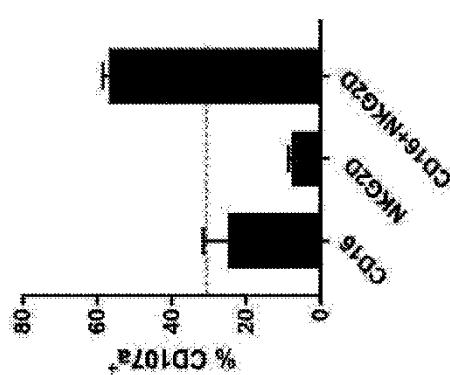


FIG. 29B



【図 30 A】

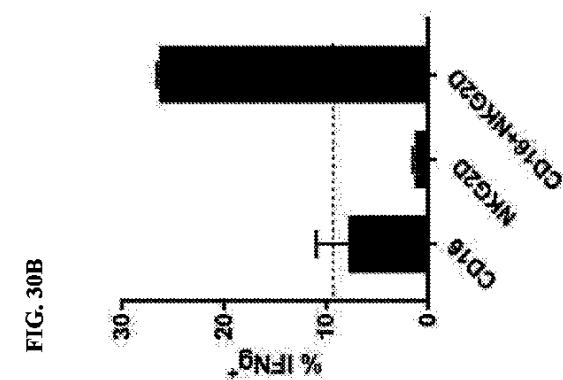
FIG. 30A



10

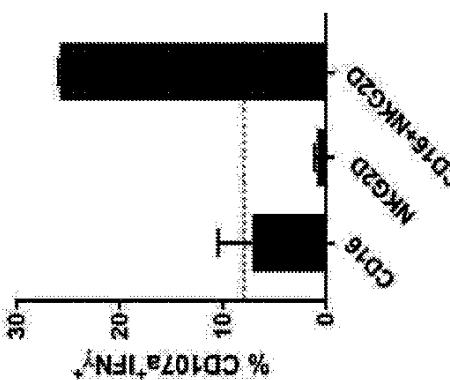
【図 30 B】

FIG. 30B



【図 30 C】

FIG. 30C



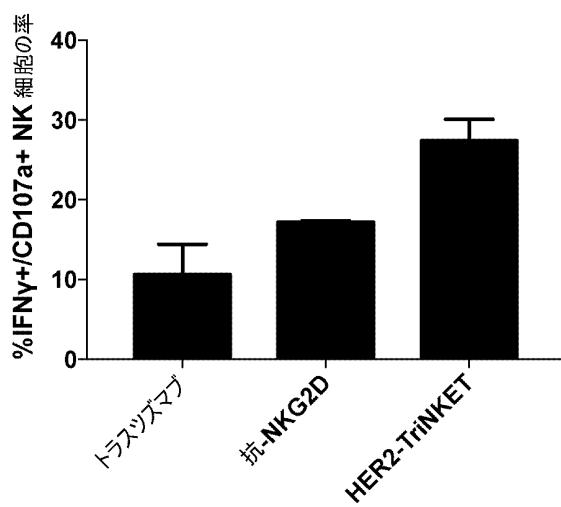
30

40

50

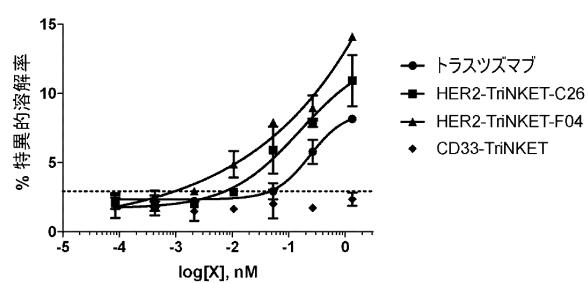
【図 3 1】

FIG. 31



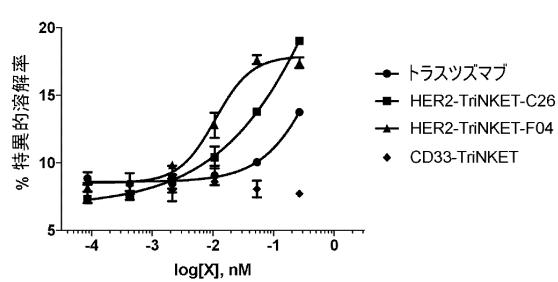
【図 3 2 - 1】

FIG. 32A



10

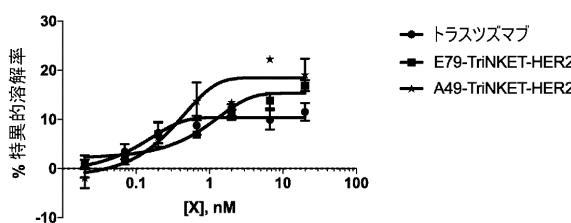
FIG. 32B



20

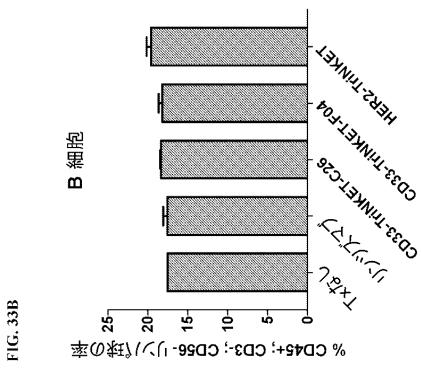
【図 3 2 - 2】

FIG. 32C



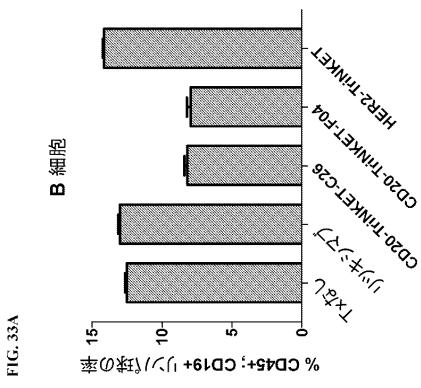
【図 3 3 - 1】

FIG. 33B



30

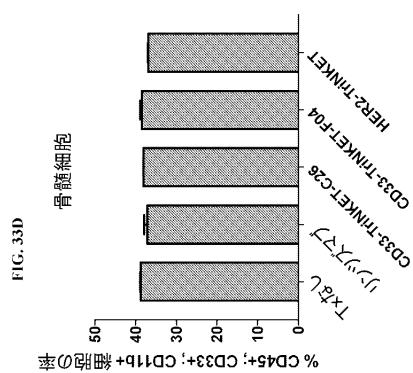
FIG. 33A



40

50

【図 3 3 - 2】



【図 3 4】

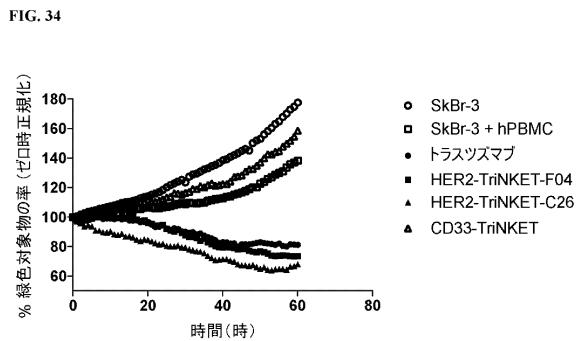
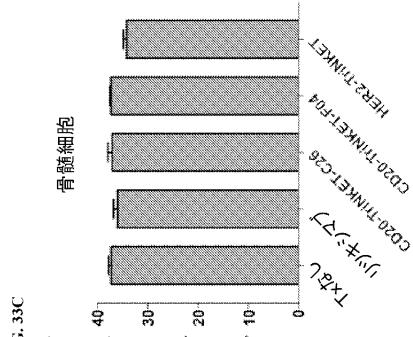


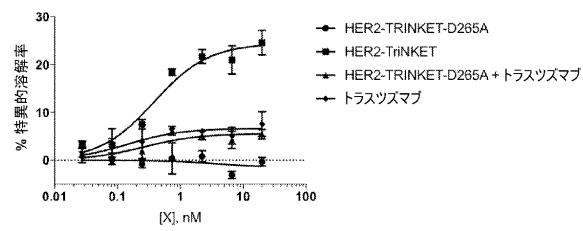
FIG. 33C

% CD45+; CD3+; CD11b+ 骨髄細胞の率



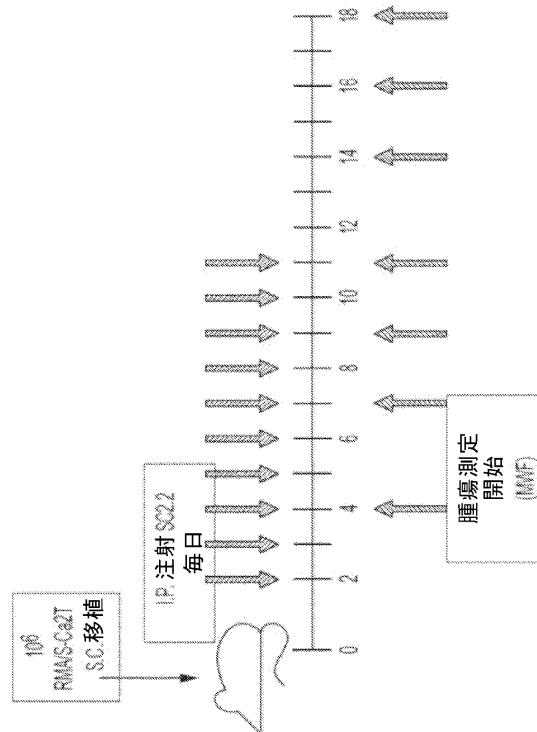
【図 3 5】

FIG. 35



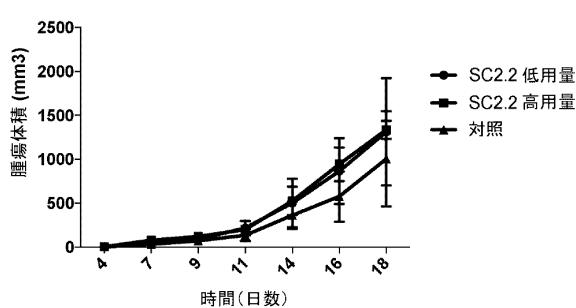
【図 3 6】

FIG. 36



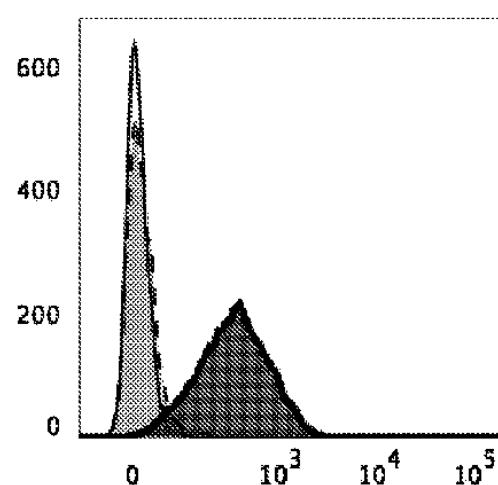
【図 3 7】

FIG. 37



【図 3 8 A】

FIG. 38A

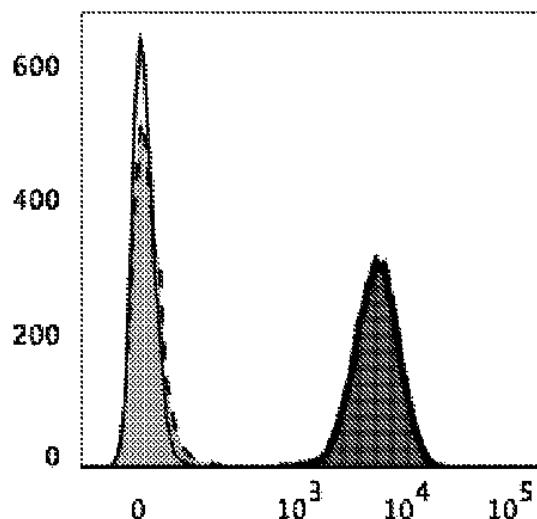


10

20

【図 3 8 B】

FIG. 38B

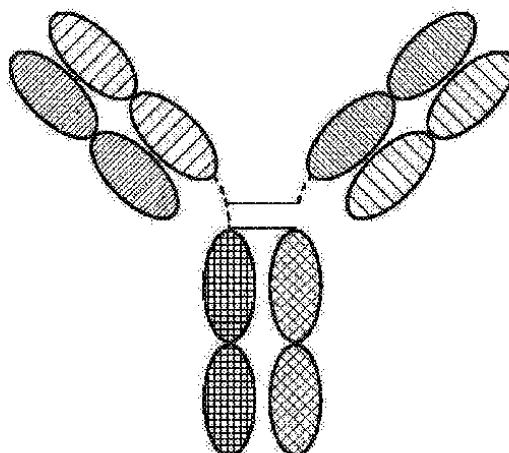


30

40

【図 3 9】

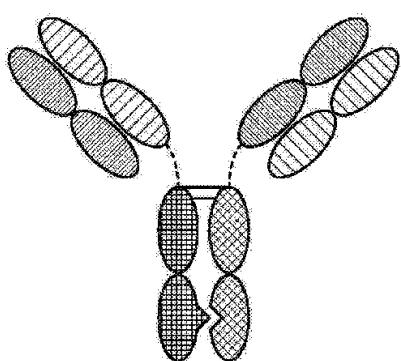
FIG. 39



50

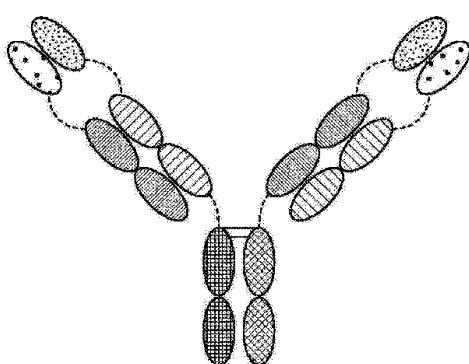
【図 4 0】

FIG. 40



【図 4 1】

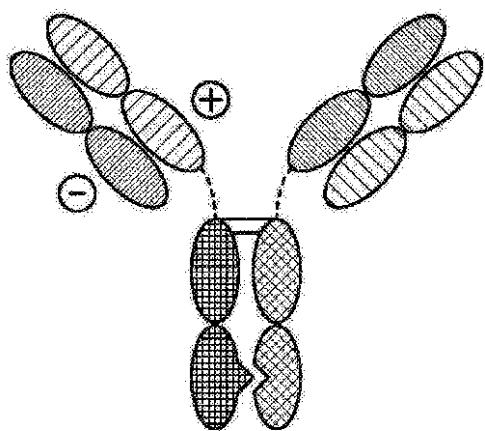
FIG. 41



10

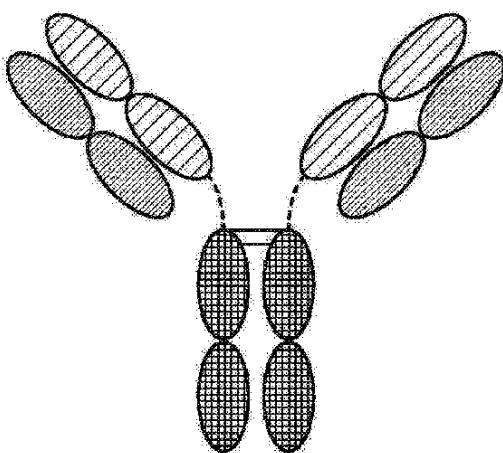
【図 4 2】

FIG. 42



【図 4 3】

FIG. 43



20

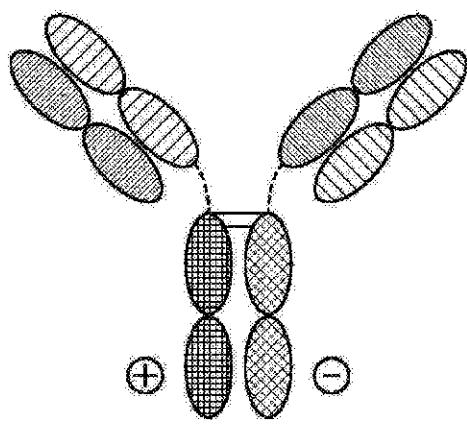
30

40

50

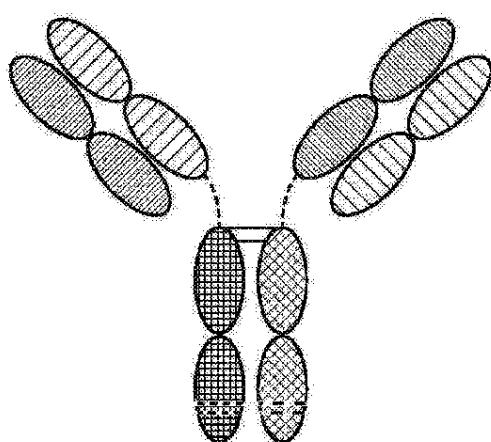
【図 4 4】

FIG. 44



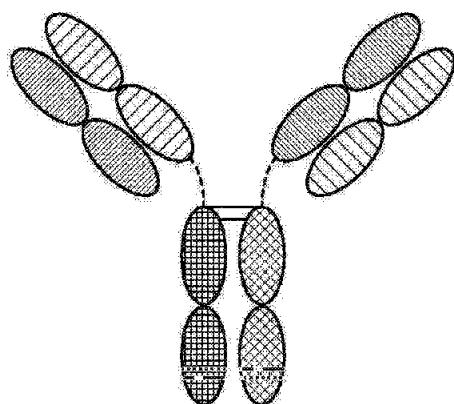
【図 4 5】

FIG. 45



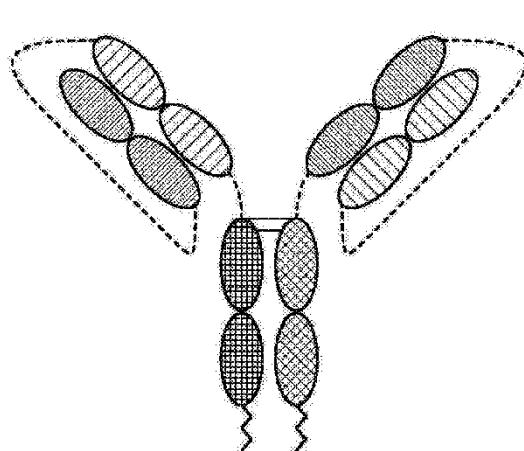
【図 4 6】

FIG. 46



【図 4 7】

FIG. 47



10

20

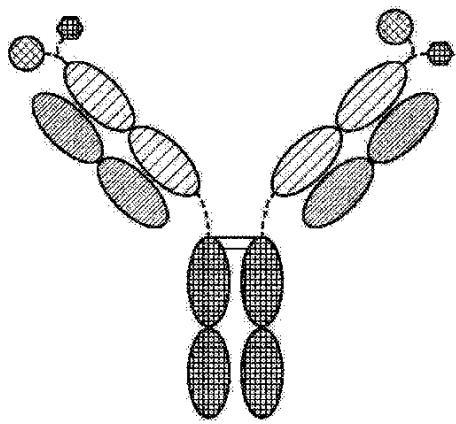
30

40

50

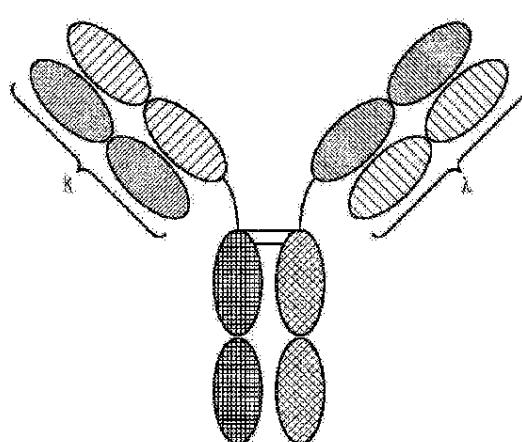
【図 4 8】

FIG. 48



【図 4 9 A】

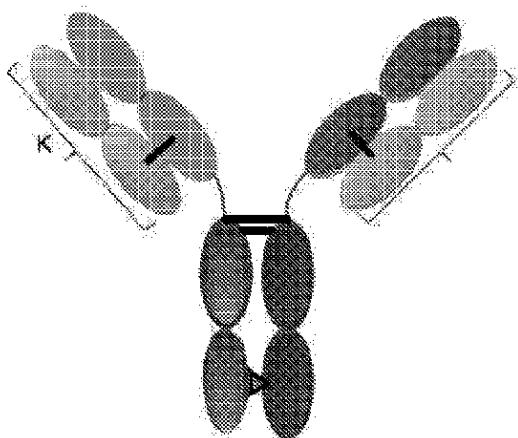
FIG. 49A



10

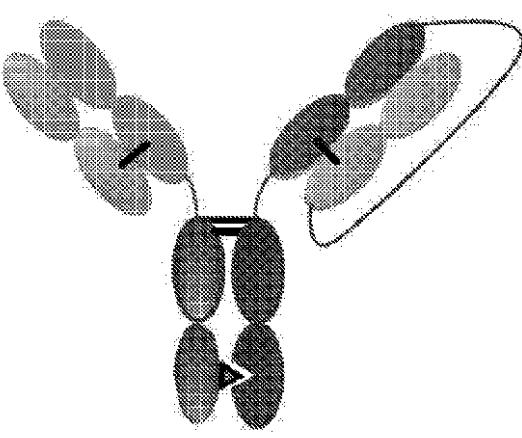
【図 4 9 B】

FIG. 49B



【図 5 0】

FIG. 50



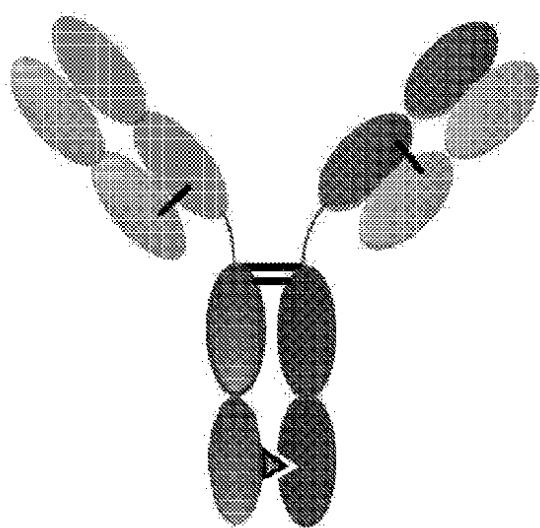
20

30

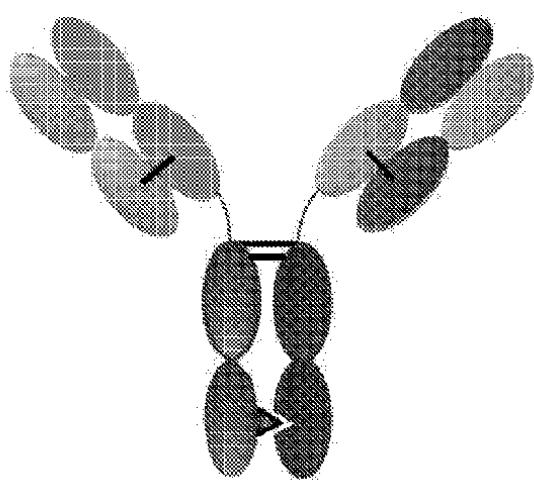
40

50

【図 5 1】

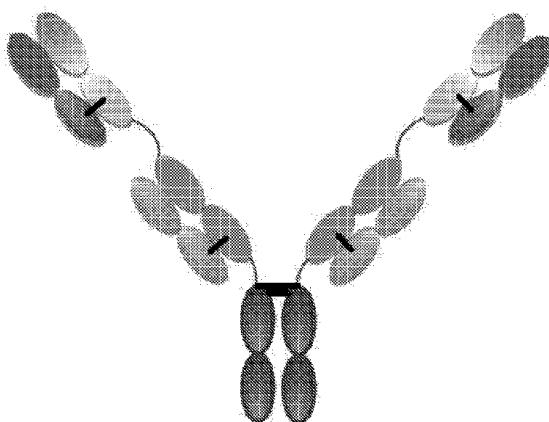
FIG. 51

【図 5 2】

FIG. 52

10

【図 5 3】

FIG. 53

20

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 1 2 N	1/19 (2006.01)
C 1 2 N	1/21 (2006.01)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)
C 1 2 N	15/13 (2006.01)
C 1 2 P	21/08 (2006.01)
C 0 7 K	16/46
C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10
C 1 2 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 02155, メドフォード, サンダース ストリート 143

(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 01773, リンカーン, モーニングサイド レーン 25

(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 01778, ウェイランド, リンカーン ロード 61

(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 03766, 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 03766, 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2013-500721号公報(JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/90

JST7580/JSTPlus/JMEDPlus(JDream3)

PubMed

BIOSIS/CAPLUS/MEDLINE/EMBASE(STN)

Uniprot/GeneSeq